



جامعة دمشق

كلية الهندسة الزراعية

قسم المحاصيل الحقلية

دراسة كيميائية خلوية و جزيئية لإنتاج قلويدات التربان من مزارع  
الكالوس لنبات البنج الذهبي (*Hyoscyamus aureus* L.)

*Chemical, Cellular and Molecular Study for Tropane  
Alkaloids Production in Callus Cultures of Golden  
Henbane (*Hyoscyamus aureus* L.)*

رسالة أعدت لنيل درجة الدكتوراه في علوم المحاصيل الحقلية  
(قسم المحاصيل الحقلية)

إعداد

شذى حسن بشر

إشراف

د. رلى يعقوب

كلية الزراعة / جامعة دمشق

(مشرفاً رئيساً)

د. يوسف العموري

الهيئة العامة للتقانة الحيوية

(مشرفاً مشاركاً)

دمشق 2019

## شكر وتقدير

بداية أحمد الله عز وجل وأشكره على توفيقه لي وإعائته لي في إتمام عملي هذا ووصولي إلى هذه المرحلة التي طالما انتظرتها، وكل الشكر والتقدير للذين قدموا لي يد العون والمساعدة للوصول إلى الغاية المرجوة من هذا العمل .

كما أتوجه بالرحمة لروح الأستاذ الدكتور محمود صبح الذي مرافقني في بداية مشواري وكان خير صديق ومعلم وأب حنون، لكن كانت مشيئة الله أقوى، فالعزاء لعائلته الكريمة ولكل من عرفه .

أتقدم بخالص شكري وامتناني للدكتورة مرلى يعقوب لتفضلها بمتابعة الإشراف على هذا البحث والتي لم تبخل أبداً بجهودها الشخصية والعلمية للوصول بنهاية المطاف إلى هذا العمل، كما أتقدم بخزبل الشكر وعظيم الامتنان للدكتور يوسف العموري لتفضله في الأشراف على هذا البحث ووعطائه المتفاني ومرعايته الصادقة وتقديمه النصح والتشجيع المستمر للوصول إلى نهاية هذا العمل .

كما أتقدم بخالص شكري وامتناني لأستاذة قسم المحاصيل الحقلية في كلية الزراعة بجامعة دمشق لما قدموه طوال سنوات الدراسة الجامعية وأخص بالشكر الأستاذ الدكتور أيمن الشحاذة العودة رئيس قسم المحاصيل الحقلية وجميع السادة أعضاء الهيئة التدريسية والفنية والمخبرين .

أتوجه بخزبل الشكر والعرفان للسادة أعضاء لجنة الحكم الأستاذ الدكتور سليم حسين زريد، والأستاذ الدكتور أيمن الشحاذة العودة، والدكتورة سلام لاوند، والدكتورة مراما عزير لما قدموه من توجيهات علمية قيمة أغنت البحث لإخراجه بأفضل صورة .

كما أتقدم بخالص شكري وتقديري لإدارة الهيئة العامة للتقانة الحيوية وأخص بالشكر الأستاذ الدكتور عصام قاسم مدير عام هيئة التقانة لما قدمه من تسهيلات لإنجاز هذا البحث . ولا يفوتني أن أتوجه بعميق تقديري وامتناني للسادة رؤساء الأقسام وللإخوة الأعزاء والأصدقاء الأوفياء في الهيئة العامة للتقانة الحيوية الذين لم يخلوا بوقتهم وجهدهم لمساعدتي في إنجاز هذا العمل فالشكر الخزبل لهم .

## إهداء

أسمى آيات الحب والتقدير والاحترام والاعتراف بالجميل إلى صاحب الفضل العظيم الدكتور يوسف  
نور الدين العموري الذي أحاطني بالرعاية والتشجيع الدائم طيلة مراحل دراستي ، فعسى الله أن يجعله  
ذخراً لنا ويطيل في عمره وأتمنى أن يوفقني الله لرد بعض أفضاله علي .

إلى ملائكة غابا عني مبكراً ، وما نزلت مروحهما تحرساني في مشوار حياتي ، خالدين في  
الذاكرة والوجدان ، أتضرع للرحمن أن يتغمدهما بواسع رحمته وأن يسكنهما فسيح جناته مروح أبي  
وأمي الغالين .

إلى سرّ قوتي وسعادتي وفخري ، إلى أُملي في هذه الحياه وأُغلى ما في الوجود أخوتي الأحباء إليكم  
أهدي نجاحي وما تبقى من حياتي .

إلى من كانوا معي على طريق الخير والنجاح دعاء صادقاً نطق به قلوبهم قبل أن يخرج من أفواههم  
أصدقائي الأوفياء لكم محبتي .

شذى حسن بشر

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم المحاصيل الحقلية،  
كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق

**This thesis has been submitted as partial fulfillment of the  
requirement for Ph. D Degree in Field Crops Sciences.  
Faculty of Agriculture, Damascus University.**

### لجنة الحكم

أ.د. أيمن الشحادة العودة

قسم المحاصيل الحقلية، كلية الهندسة الزراعية، جامعة دمشق. (عضواً)

أ.د. سليم زيد

قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق. (عضواً)

د. رلى يعقوب

قسم المحاصيل الحقلية، كلية الهندسة الزراعية، جامعة دمشق. (عضواً ومشرفاً)

د. سلام لاوند

قسم المحاصيل الحقلية، كلية الهندسة الزراعية، جامعة دمشق. (عضواً)

د. راما عزيز

قسم البستنة، كلية الهندسة الزراعية، جامعة دمشق. (عضواً)

نُوقشت هذه الرسالة وأجيزت بتاريخ 2019/9/17

## شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة  
شذى حسن بشر بإشراف الدكتورة رلى يعقوب، الأستاذ المساعد في قسم المحاصيل  
الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، والدكتور يوسف العموري، الباحث في الهيئة  
العامة للتقانة الحيوية، وأن أية مراجع أخرى ذكرت في هذه الرسالة موثقة في  
النص.

|             |                      |                    |
|-------------|----------------------|--------------------|
| المرشحة     | المشرف المشارك       | المشرف الرئيس      |
| شذى حسن بشر | الدكتور يوسف العموري | الدكتورة رلى يعقوب |

## Certificate

We hereby certify that the work described in this thesis is the result of a scientific research performed by the Researcher **Shaza Hasan Beshar** under the supervision of Dr. Roula Yacoub, associate professor, Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Damascus University and Dr Youssef AL-Ammouri, Researcher, National Comossion for Biotechnology. All reference books resorted by the researcher has been checked by the text.

|                    |                        |                  |
|--------------------|------------------------|------------------|
| Candidate          | Co-supervisor          | Supervisor       |
| Shaza Hasan Beshar | Dr. Youssef AL-Ammouri | Dr. Roula Yacoub |

## تصريح

أصرح بأن البحث الموصوف في هذه الأطروحة تحت عنوان " دراسة كيميائية خلوية وحزئية لإنتاج قلويدات التروبان من مزارع الكالوس لنبات البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus* " لم يسبق أن قَدّم للحصول على أية درجة جامعية أخرى، وغير مقدم حالياً لذلك، وأن كافة الأعمال والنتائج المذكورة فيه هي نتاج جهودى الشخصية وبتوجيه من المشرفين العلميين، وأية معلومات أو نتائج أخرى ذكرت في الأطروحة قد نسبت إلى مصادرها ومؤلفيها في النص وفي قائمة المراجع.

المرشحة

شذى حسن بشر

## Declaration

To whom it may concern, I declare that the present research work entitled: " **Chemical, Cellular and Molecular Study for Tropane Alkaloids Production in Callus Cultures of Golden Henbane (*Hyoscyamus aureus*)**" is a new research work, and that has never been studied by any other researchers for any other degree, and currently it is not submitted by any one for any degree. All the mentioned results are my own efforts, and done by the direct supervision of my guides, Dr. Roula yacoub and Dr. Youssef Al-Ammouri. All the referred literature are cited, and well –documented in the list of references.

Candidate

Shaza Hasan Beshar

## فهرس المحتويات

| الرقم   | الموضوع                                            | الصفحة |
|---------|----------------------------------------------------|--------|
|         | الملخص العربي                                      | 1      |
| 1       | مقدمة                                              | 4      |
| 2       | مبررات البحث                                       | 10     |
| 3       | أهداف البحث                                        | 11     |
| 4       | الدراسة المرجعية                                   | 12     |
| 1.4     | الدراسة الكيميائية                                 | 14     |
| 1.1.4   | نواتج الاستقلاب الثانوية في النبات                 | 14     |
| 2.1.4   | المحتوى الكيميائي لنبات البنج <i>Hyoscyamus</i>    | 16     |
| 3.1.4   | قلويدات التروبان Tropane Alkaloids                 | 16     |
| 1.3.1.4 | الأهمية الطبية لقلويدات التروبان                   | 22     |
| 2.3.1.4 | التمثيل الحيوي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين      | 23     |
| 3.3.1.4 | التحديد الكمي والنوعي لقلويدات التروبان            | 26     |
| 4.3.1.4 | تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)  | 27     |
| 4.1.4   | الزراعة النسيجية لنبات البنج <i>Hyoscyamus spp</i> | 29     |
| 1.4.1.4 | مزارع الكالوس كوسيلة للحصول على قلويدات التروبان   | 33     |
| 5.1.4   | الدراسة الجزيئية Molecular study                   | 42     |
| 1.5.1.4 | تقنية التكرارات البسيطة الترادفية البينية ISSR     | 45     |
| 6.1.4   | دراسة التعبير المورثي Gene expression              | 46     |
| 7.1.4   | دراسة التضاعفات الصبغية Polyploid                  | 49     |
| 5       | مواد البحث وطرائقه                                 | 55     |
| 1.5     | مكان تنفيذ البحث                                   | 56     |
| 2.5     | المادة النباتية                                    | 56     |
| 3.5     | تنمية الكالوس على الأوساط المغذية المختبرة         | 57     |
| 4.5     | دراسة بعض الصفات الشكلية للكالوس المستحدث          | 57     |
| 5.5     | تقدير النمو في مزارع الكالوس                       | 57     |

|    |                                                                                                                     |         |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 59 | الدراسة الكيميائية Chemical study                                                                                   | 6.5     |
| 59 | استخلاص القلويدات Alkaloids extraction                                                                              | 1.6.5   |
| 60 | الدراسة الجزيئية Molecular study                                                                                    | 7.5     |
| 60 | دراسة التباينات الجسمية بين مزارع الكالوس                                                                           | 1.7.5   |
| 60 | عزل DNA بطريقة CTAB                                                                                                 | 1.1.7.5 |
| 62 | التقدير الكمي والنوعي للحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA                                                       | 2.1.7.5 |
| 62 | تضخيم الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA                                                                       | 3.1.7.5 |
| 64 | الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير                                                                                 | 4.1.7.5 |
| 65 | دراسة التعبير المورثي                                                                                               | 8.5     |
| 66 | استخلاص الـ RNA الكلي Total RNA extraction                                                                          | 1.8.5   |
| 66 | تركيب cDNA وتقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي<br>Real Time PCR Technique                            | 2.8.5   |
| 69 | التأكد من مضاعفة للمورثات المدروسة                                                                                  | 3.8.5   |
| 69 | معالجة معطيات الـ PCR الكمي                                                                                         | 4.8.5   |
| 69 | دراسة التضاعفات الصبغية                                                                                             | 9.5     |
| 70 | قتل وتثبيت الخلايا                                                                                                  | 1.9.5   |
| 70 | تصبغ الخلايا وتحضير الشرائح<br>Cells staining and slides preparation                                                | 2.9.5   |
| 71 | التحليل الإحصائي Statistical analysis                                                                               | 10.5    |
| 72 | النتائج والمناقشة                                                                                                   | 6       |
| 73 | الوصف المظهري للكالوس الناتج على الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو                                            | 1.6     |
| 75 | ديناميكية نمو الكالوس في الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو                                                    | 2.6     |
| 81 | التحديد الكمي والكيفي لقلويدات التروبان Tropane Alkaloids                                                           | 3.6     |
| 81 | تركيز الهيوسيامين Hyoscyamine في الخطوط الخلوية Cellular lines<br>لكالوس نبات البنج الذهبي H.aureus خلال 50 يوماً:  | 1.3.6   |
| 83 | تركيز السكوبولامين Scopolamine في الخطوط الخلوية Cellular Lines<br>لكالوس نبات البنج الذهبي H.aureus خلال 50 يوماً: | 2.3.6   |
| 93 | الدراسة الجزيئية Molecular study                                                                                    | 4.6     |
| 93 | التحديد الكمي والنوعي للـ DNA                                                                                       | 1.4.6   |

|     |                                                                                                                                     |       |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 94  | التعددية الشكلية Polymorphism الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR                                                                           | 2.4.6 |
| 100 | التحليل العنقودي Cluster Analysis للخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج <i>H. aureus</i> والنبات الأم النامي في الزجاج <i>In Vitro</i> : | 3.4.6 |
| 104 | دراسة التعبير المورثي                                                                                                               | 5.6   |
| 105 | تغير تعبير مورثة PMT في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي <i>H. aureus</i> خلال 50 يوماً                                      | 1.5.6 |
| 110 | تغير تعبير مورثة H6H في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي <i>H. aureus</i> خلال 50 يوماً                                      | 2.5.6 |
| 114 | تغير تعبير مورثة TR I في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي <i>H. aureus</i> خلال 50 يوماً                                     | 3.5.6 |
| 116 | تغير تعبير مورثة TR II في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي <i>H. aureus</i> خلال 50 يوماً                                    | 4.5.6 |
| 120 | دراسة التضاعفات الصبغية                                                                                                             | 6.6   |
| 120 | معامل الانقسام الخيطي Metotic Index                                                                                                 | 1.6.6 |
| 122 | تباينات العدد الصبغي Chromosome number في مزارع الكالوس                                                                             | 2.6.6 |
| 131 | الاستنتاجات والتوصيات                                                                                                               | 7     |
| 134 | المراجع                                                                                                                             | 8     |
| 163 | الملخص باللغة الإنكليزية                                                                                                            |       |

## فهرس الجداول

| الرقم | العنوان                                                                                                                                                          | الصفحة |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1     | أملاح الأتروبين وأهم خواصها                                                                                                                                      | 19     |
| 2     | أملاح الهيوسيامين وأهم خواصها                                                                                                                                    | 20     |
| 3     | أملاح الهيوسين وأهم خواصها                                                                                                                                       | 21     |
| 4     | أملاح الأتروسين وأهم خواصها                                                                                                                                      | 22     |
| 5     | أهم نواتج الاستقلاب الثانوية المنتجة في مزارع الكالوس                                                                                                            | 36     |
| 6     | تركيب الأوساط المغذية المستعملة في تنمية كالوس البنج الذهبي ( <i>H. aureus</i> ) انطلاقاً من الخط الخلوي 5C <sub>01</sub>                                        | 58     |
| 7     | التسلسل النكليوتيدي للمرئسات المستعملة في تطبيق تقنية ISSR ودرجة حرارة التحامها                                                                                  | 64     |
| 8     | مكونات تفاعل Real time PCR                                                                                                                                       | 67     |
| 9     | البرنامج الحراري المستعمل في تطبيق تقنية Real time PCR باستعمال Power Sybr Green RNA-to-C <sub>T</sub> <sup>TM</sup> 1-Step kit                                  | 67     |
| 10    | تسلسل القواعد النيوكليوتيدية في المرئسات المتخصصة للمورثات ومورثة الأكتين                                                                                        | 67     |
| 11    | بعض الصفات المظهرية لكالوس نبات البنج الذهبي على الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو                                                                         | 73     |
| 12    | متوسط الوزن الرطب في التجمعات الخلوية خلال مراحل عمرية مختلفة                                                                                                    | 76     |
| 13    | تركيز الهيوسيامين في الخطوط الخلوية المدروسة خلال مراحل عمرية مختلفة                                                                                             | 82     |
| 14    | تركيز السكوبولامين في الخطوط الخلوية المدروسة خلال مراحل عمرية مختلفة                                                                                            | 83     |
| 15    | محتوى الأوساط الكلي من السكرورز والعناصر المعدنية الكبرى والصغرى                                                                                                 | 86     |
| 16    | تراكيز ونقاوة عينات الـ DNA في كالوس البنج والنبات النامي في الزجاج                                                                                              | 94     |
| 17    | عدد الحزم الناتجة مع كل خط خلوي وعدد الحزم الكلي وعدد الحزم المتعددة شكلياً والنسبة المئوية للتعددية الشكلية                                                     | 95     |
| 18    | مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق PDV بين الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي والناتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزنة UPGMA بتطبيق تقانة ISSR | 98     |
| 19    | تركيز ونقاوة عينات الـ RNA في المزارع الخلوية خلال مراحل عمرية مختلفة                                                                                            | 104    |
| 20    | قيمة تعبير مورثة PMT في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي <i>H. aureus</i> خلال 50 يوماً                                                                   | 106    |
| 21    | نسبة شوارد الأمونيوم إلى شوارد النترات في الأوساط المغذية المدروسة                                                                                               | 108    |
| 22    | قيمة تعبير مورثة H6H في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي <i>H. aureus</i> خلال 50 يوماً                                                                   | 111    |

|     |                                                                                                                                  |    |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 115 | قيمة تعبير مورثة TR I في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي ( <i>H. aureus</i> )<br>خلال 50 يوماً                           | 23 |
| 117 | قيمة تعبير مورثة TR II في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي ( <i>H. aureus</i> )<br>خلال 50 يوماً                          | 24 |
| 121 | % لقيمة معامل الانقسام الخيطي في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي<br>( <i>H. aureus</i> ) خلال مراحل عمرية مختلفة         | 25 |
| 125 | متوسط عدد الصبغيات في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي ( <i>H. aureus</i> )<br>خلال أطوار النمو المختلفة                  | 26 |
| 126 | النسبة المئوية للصبغة الصبغية السائدة في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج<br>الذهبي ( <i>H. aureus</i> ) خلال مراحل عمرية مختلفة | 27 |

## فهرس الأشكال

| الرقم | العنوان                                                                                                                         | الصفحة |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1     | نبات البنج الذهبي                                                                                                               | 14     |
| 2     | أهم مجموعات نواتج الاستقلاب الثانوية                                                                                            | 15     |
| 3     | البنية الهيكلية لحلقة التروبان وقلويدي الهوسيامين والسكوبولامين                                                                 | 17     |
| 4     | مسار التخليق الحيوي للقلويدات التروبانية                                                                                        | 24     |
| 5     | تراكيز قلويدات التروبان حسب عمر المزرعة النسيجية لنبات <i>D.stramonium</i>                                                      | 39     |
| 6     | الخط الخلوي 5C01                                                                                                                | 56     |
| 7     | العلاقة بين عدد الخلايا وفترة التحضين                                                                                           | 57     |
| 8     | البرنامج الحراري المطبق بتقانة Real Time-PCR                                                                                    | 68     |
| 9     | طريقة حقن العينات عند استخدام تقانة RT-PCR وباستعمال مورثة الأكتين مع التجمعات الخلوية من عمر اليوم الأول 0 للزراعة وحتى 50 يوم | 68     |
| 10    | نمو الكالوس على الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو المقارنة مع الشاهد بعمر 50 يوم                                          | 73     |
| 11    | تنمية ونحضين الكالوس على الأوساط المدروسة                                                                                       | 74     |
| 12    | ديناميكية نمو الخلايا في مزارع الكالوس لنبات البنج الذهبي خلال 50 يوماً                                                         | 76     |
| 13    | تركيز الهوسيامين في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي خلال مراحل عمرية مختلفة                                             | 82     |
| 14    | تركيز السكوبولامين في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي خلال مراحل عمرية مختلفة                                           | 84     |
| 15    | المخطط الكروماتوغرافي بواسطة جهاز HPLC لكل من الهوسيامين والسكوبولامين في الخط الخلوي 5C01 عند اليوم 30 من طور الأسى            | 84     |
| 16    | نواتج ترحيل PCR للتأكد من النوعية الجيدة للـ DNA المعزول من مزارع الكالوس والنبات النامي في الزجاج بعمر 30 يوم                  | 93     |
| 17    | عدد الحزم الكلية والحزم المتعددة شكلياً الناتجة عن تطبيق تقنية PCR-ISSR                                                         | 96     |
| 18    | عدد الحزم الكلية وعدد الحزم ذات التعددية الشكلية والنسبة المئوية للتعددية الشكلية في الخطوط الخلوية والنبات النامي في الزجاج    | 97     |
| 19    | ترحيل نواتج PCR مع المرئسات oligo 44، oligo 46، oligo 51، oligo 52 بوجود DNA Marker 1000bp على هلامه أغاروز 2%                  | 97     |
| 20    | نواتج ترحيل DNA النبات الأم مع المرئسات المستعملة في تطبيق تقنية ISSR وبوجود DNA Marker 1000bp على هلامه أغاروز 2%              | 98     |
| 21    | التحليل العنقودي للخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج والنبات الأم النامي في الزجاج الناتج عن تطبيق تقانة ISSR                      | 100    |
| 22    | نواتج ترحيل RNA المعزول من الخط الخلوي 5C01 خلال مراحل عمرية مختلفة على هلامه أغاروز 1% للتأكد من النوعية الجيدة                | 104    |
| 23    | قيم Ct الناتجة باستعمال المرئسة الخاصة بالمورثة المرمزة لأنزيم PMT                                                              | 106    |

|     |                                                                                                                              |    |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 107 | قيمة تعبير مورثة مورثة PMT في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي <i>H. aureus</i> خلال 50 يوماً                         | 24 |
| 110 | قيم Ct الناتجة باستعمال المرئسة الخاصة بالمورثة المرزمة لأنزيم H6H                                                           | 25 |
| 111 | قيمة تعبير مورثة مورثة H6H في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي <i>H. aureus</i> خلال 50 يوماً                         | 26 |
| 114 | قيم Ct الناتجة باستعمال المرئسة الخاصة بالمورثة المرزمة لأنزيم TR I                                                          | 27 |
| 115 | قيمة تعبير مورثة مورثة TR I في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي <i>H. aureus</i> خلال 50 يوماً                        | 28 |
| 118 | قيمة تعبير مورثة مورثة TR II في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي <i>H. aureus</i> خلال 50 يوماً                       | 29 |
| 121 | النسبة المئوية لمعامل الانقسام الخيطي MI في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي <i>H. aureus</i> خلال مراحل عمرية مختلفة | 30 |
| 123 | العدد الصبغي في جذور نبات البنج الذهبي (2n=34)                                                                               | 31 |
| 124 | تباين العدد الصبغي في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي <i>H. aureus</i> خلال أطوار النمو المختلفة                     | 32 |
| 127 | النسبة المئوية للصيغة الصبغية السائدة في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي <i>H. aureus</i> خلال أطوار النمو المختلفة  | 33 |
| 128 | خلية كالوس بطور الهجرة Anaphase وبالطور التمهيدي Prophase                                                                    | 34 |
| 129 | العدد الصبغي في بعض خلايا الكالوس لنبات البنج الذهبي <i>H.aureus</i>                                                         | 35 |

## فهرس الاختصارات العلمية

| الاختصار      | المرادف الانكليزي                      | المرادف العربي                              |
|---------------|----------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>TAs</b>    | Tropane Alkaloids                      | قلويدات التروبان                            |
| <b>ISSR</b>   | Inter Simple Sequence Repeats          | التكرارات البسيطة الترادفية البينية         |
| <b>CNS</b>    | Central Nervous System                 | الجملة العصبية المركزية                     |
| <b>PNS</b>    | Parasympathetic Nervous System         | الجملة العصبية نظيرة الودية                 |
| <b>DNA</b>    | Deoxyribonucleic Acid                  | الحمض النووي الريبوزي منزوع الأكسجين        |
| <b>cDNA</b>   | Complementary DNA                      | الحمض النووي الريبوزي منزوع الأكسجين المكمل |
| <b>RNA</b>    | Ribonucleic Acid                       | الحمض النووي الريبوزي                       |
| <b>mRNA</b>   | Messenger Ribonucleic Acid             | الحمض النووي الريبوزي الرسول                |
| <b>tRNA</b>   | Transfer RNA                           | الحمض النووي الريبوزي الناقل                |
| <b>PMT</b>    | N-Putrescine Methyle Transferase       | ن- بوتريسين ميثيل ترانسفيراز                |
| <b>H6H</b>    | Hyoscyamine 6 $\beta$ Hydroxylase      | هوسيامين 6 ب هيدروكسيلاز                    |
| <b>ODC</b>    | Ornithine Décarboxylase                | أورنيثين دي كربوكسيلاز                      |
| <b>Arg DC</b> | Arginine de Carboxylase                | أرجينين دي كربوكسيلاز                       |
| <b>DAO</b>    | Diamine Oxidase                        | ديامين أوكسيداز                             |
| <b>TR I</b>   | Tropinon Reductase I                   | تريبينون ريديكتاز 1                         |
| <b>TR II</b>  | Tropinon Reductase I                   | تريبينون ريديكتاز 1                         |
| <b>MS</b>     | Murashige and Skoog (1962)             | موراشيجي وسكوج (1962)                       |
| <b>HPLC</b>   | High Performance Liquid Chromatography | الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء        |
| <b>TLC</b>    | Thin Layer Chromatography              | كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة                |
| <b>GC-MS</b>  | Gas Chromatography- Mass spectrometry  | الكروماتوغرافيا الغازية مطيافية الكتلة      |
| <b>RT</b>     | Retention Time                         | وقت الاستبقاء                               |
| <b>BAP</b>    | Benzyl Amino Purine                    | بنزيل أمينو بورين                           |
| <b>IAA</b>    | Indol Acetic Acid                      | إندول حمض الخل                              |
| <b>Kin</b>    | Kinetin                                | كينيتين                                     |

|               |                                                 |                                                |
|---------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>2,4-D</b>  | 2,4-DiChloro Phynoxy Naphthalene acetic acid    | 2،4- دي كلورو فينوكسي حمض الخل                 |
| <b>PP</b>     | Nicotine acid                                   | حمض النيكوتين                                  |
| <b>B6</b>     | Pyridoxine                                      | بيروكسيدين                                     |
| <b>B1</b>     | Thiamine – HCl                                  | ثيامين هيدروكلوريد                             |
| <b>NAA</b>    | Naphthalene Acetic Acid                         | نفتالين حمض الخل                               |
| <b>BA</b>     | Benzyl Adenine                                  | بنزيل أدنين                                    |
| <b>GA3</b>    | Gebrelac acid                                   | حمض الجبريليك                                  |
| <b>PCR</b>    | Polymerase Chain Reaction                       | تفاعل بوليميراز التسلسلي                       |
| <b>RT-PCR</b> | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction | تفاعل بوليميراز التسلسلي مع أنزيم النسخ العكسي |
| <b>ATP</b>    | Adenosine Tr`iphosphate                         | أدينوزين ثلاثي الفوسفات                        |
| <b>dNTPs</b>  | Deoxynucleotide Triphosphates                   | النكليوتيدات ثلاثية الفوسفات في DNA            |
| <b>RAPD</b>   | Randomly Amplified. Polymorphic DNA.            | التعددية الشكلية للـ DNA المضخم عشوائياً       |
| <b>CTAB</b>   | Ctyle Trimethyl Ammonium Bromide                | سيتيل تري ميثيل أومنيوم برومايد                |
| <b>MI</b>     | Mitotic Index                                   | معامل الانقسام الخيطي                          |
| <b>PPO</b>    | Poly-Phenoloxidase                              | بولي فينول أوكسيداز                            |
| <b>POD</b>    | Peroxidase                                      | بيروكسيداز                                     |

*Damascus University*  
*Faculty of Agriculture*  
*Department of Field Crops*



*Chemical, Cellular and Molecular Study for  
Tropane Alkaloids Production in Callus Cultures of  
Golden Henbane (*Hyoscyamus aureus* L.)*

*Dissertation Submitted for Ph.D Degree in Field Crops Sciences  
(Department of Field Crops)*

*BY*

*Shaza Hasan Beshier*

*Supervision*

*Dr. Youssef Al-Ammouri*

*National Commission for  
Biotechnology  
Damascus*

*Dr. Roula Yacoub*

*Department of Field Crops  
Faculty of Agriculture  
Damascus University*

*Damascus 2019*

## الملخص

نفذ هذا البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية، خلال الفترة 2015 - 2019، بهدف تحديد استجابة كالوس نبات البنج الذهبي (*Hyosyamus aureus*)، ودراسة ديناميكية نموه على أوساط مغذية مختلفة التركيب وخالية من منظمات النمو النباتية، بالاعتماد على الوزن الرطب للكتلة الخلوية كمؤشر على قوة نمو الكالوس، بالإضافة إلى دراسة التباينات الجسمية Somaclonal variation التي يمكن أن تحدث نتيجة اختلاف تركيب الوسط المغذي للكالوس بالمقارنة مع النبات الأم، باعتماد تقنية التكرارات البسيطة الترادفية البينية ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) باستعمال 25 مرئسة، كما هدف البحث إلى معرفة تأثير مكونات الوسط المغذي إضافة إلى تأثير تغيير تعبير أهم المورثات المرمزة للأنزيمات الداخلة في مسار التخليق الحيوي لقلويدات التربان مثل: N-Putrescine (PMT)، Hyoscyamine 6 $\beta$  Hydroxylase (H6H)، Methyle Transferase (TRI)، Tropinon Reductase I وTropinon Reductase II (TR II) في المحتوى القلويدي في الخطوط الخلوية Cellular lines لكالوس نبات البنج الذهبي، وذلك عن طريق تقدير مستويات التراكم النسخي لـ mRNA الخاص بهذه المورثات، باستعمال تقنية تفاعل بوليمراز التسلسلي في الوقت الحقيقي Real Time PCR، إضافة إلى معرفة التضاعفات الصبغية الحاصلة في المزارع الخلوية خلال أطوار نمو الكالوس.

بيّنت نتائج الدراسة الشكلية أن منحنى النمو لخلايا الكالوس اتخذ شكل المنحنى السيني Sigmoid في جميع الأوساط المختبرة، حيث بلغت سرعة نمو الخلايا أقصى معدلاتها في طور الأسّي Exponential Phase (من اليوم 15 حتى اليوم 35) في جميع الأوساط، مع تفوق الشاهد في وزن الكتلة الخلوية، ويُفسّر نجاح تشكل الكالوس ونموه في الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو إلى احتواء هذه الأوساط (5C، 6C، 10C) على مستوى مرتفع من العناصر المغذية، وتراكيز مرتفعة من السكروز Sucrose (50، 60، 100 غ. ل<sup>-1</sup>) على التوالي، بالإضافة إلى ظاهرة التطبع الهرموني Hormone habituation التي تحصل نتيجة استمرار نمو الكالوس في وسط الإدامة بوجود منظمات النمو، حيث تتمكن خلايا الكالوس بمرور الزمن من النمو في وسط خالٍ من منظمات النمو.

بيّنت نتائج الدراسة الكيميائية تفوق معاملة الشاهد 5C<sub>01</sub> بمحتواها من قلويدات التروبان Tropane Alkaloids على الخطوط الخلوية 5C و 6C و 10C، حيث كان تركيز القلويدات الأعلى في الطور الأسّي (15-35 يوم) (0.49 %) و (0.36 %) و (0.29 %) و (0.21 %) في الخطوط الخلوية 5C<sub>01</sub> و 5C و 6C و 10C على التوالي بالنسبة للهيوسيامين Hyoscyamine، بينما كان تركيز السكوبولامين Scopolamine ضئيلاً بالمقارنة مع الهيوسيامين، ويعود ذلك إلى حقيقة أن نبات البنج يعد من الأنواع النباتية الفقيرة بالسكوبولامين. كما تفوق الخططين الخلويين 5C و 6C على الخط الخلوي 10C معنوياً بمحتواه من القلويدات خلال مرحلتي الطور الأسّي Exponential Phase و طور الثبات Platue Phase.

أثبتت نتائج الدراسة الجزيئية فعالية جميع المرئسات المستعملة في إعطاء تعددية شكلية بين الخطوط الخلوية المدروسة، كما أظهر التحليل العنقودي Cluster analysis انفصال النبات الأم (المانح Donor) عن الخطوط الخلوية للكالوس بمسافة قدرها 0.7614، بينما انفصلت الخطوط الخلوية للكالوس إلى تحت مجموعتين، ضمت المجموعة الأولى الخط الخلوي 10C منفرداً، في حين ضمت الثانية الخطوط الخلوية (5C<sub>01</sub>، 5C، 6C) بمسافة قدرها 0.4416 بينهما، وكان الخطان الخلويان 5C<sub>01</sub>، 5C الأقرب إلى بعضهما وراثياً. تبين هذه النتائج وجود تباين وراثي بين الخطوط الخلوية لمزارع الكالوس مع أنها أخذت من المصدر نفسه (الخط الخلوي الأم 5C<sub>01</sub>)، ويُعزى هذا إلى دور مكونات وسط النمو في إحداث تغير في التركيب الوراثي للمادة النباتية، ما يؤكد أن مزارع الكالوس يمكن أن تكون مصدراً للاختلافات الوراثية، وأن تقنية ISSR أداة فعّالة في كشف هذه الاختلافات.

وعند قياس تعبير المورثات المرمزة للأنزيمات الداخلة في مسار تخليق القلويدات، تبين أن مرحلة الطور الأسّي قد شهدت أعلى قيمة لتعبير المورثة المرمزة للأنزيم PMT (4.563) و (7.728) ضعف أكبر في الخطوط الخلوية 5C و 10C على التوالي بالمقارنة مع الشاهد 5C<sub>01</sub>، بينما كانت أكبر قيمة لها في الخط الخلوي 6C بعمر 5 أيام (3.117) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد، وبالنسبة للمورثة المرمزة للأنزيم H6H تحققت أعلى قيمة لتعبيرها في بداية الطور المتكئ Lag Phase (5 أيام)، حيث بلغت (2.676) و (3.364) و (2.297) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد 5C<sub>01</sub> في كل من الخطوط الخلوية 5C، 6C، 10C على التوالي.

لكن لم يترافق هذا التفوق في التعبير المورثي مع زيادة في تركيز القلويدات المنتجة، ويعود ذلك بشكل أساسي إلى انحراف مسار التفاعل في بداية طريق التخليق الحيوي لقلويدات التربان من بوتريسين - تربان (Putrescine - Tropane) إلى بوتريسين - سبيرميدين (Putrescine - Spermidine)، ما أثر سلباً في كمية قلويدات التربان المنتجة.

وعلى الرغم من تباين الصيغة الصبغية في الخطوط الخلوية بالمقارنة مع النمط الصبغي الثنائي  $2n=34$  في النبات الأم (المانح Donor)، كانت الهيئة الشكلية السائدة للصبغيات هي الصيغة الصبغية الثنائية مع انحرافات Aneuploidy، حيث شكلت ما نسبته 78% و 76% و 60% و 73% في الخطوط الخلوية  $5C_{01}$ ،  $5C$ ،  $6C$ ،  $10C$  على التوالي في الطور المتكئ، مع وجود نسبة قليلة للصيغة الصبغية الثلاثية Triploidy (3x) والرابعة Tetraploidy (4x)، في حين غابت الخلايا ذات الصيغة الصبغية المتعددة Polyploidy، بينما انخفضت نسبة الصيغة الصبغية الثنائية Diploidy في الطور الأسّي مع بقائها سائدة في جميع الخطوط الخلوية المدروسة باستثناء الشاهد  $5C_{01}$ ، وارتفعت بالمقابل كل من الصيغ الصبغية الثلاثية Triploidy (3x) والرابعة Tetraploidy (4x) والمتعددة Polyploidy، وكذلك الأمر في طور الثبات.

الفصل الأول

**Chapter One**

المقدمة

**Introduction**

## 1- مقدمة Introduction:

تعد الطبيعة أغنى مصدر للتنوع الحيوي والكيميائي، فلا تزال المنتجات الطبيعية ترفد معظم دول العالم بمجموعة واسعة من الأدوية والمستحضرات الدوائية (Rensheng وزملاؤه، 2010)، حيث أنّ فكرة استعمال المنتجات الطبيعية للنباتات الطبية في المجال الطبي معروفة منذ القدم، ويعرف الآن ما يزيد على 2000 نوعاً من المملكة النباتية تصنف كمصدرٍ للمنتجات الطبية ولها فعالية دوائية (Narula وزملاؤه، 2004؛ Celine و Michele، 2005، ساعور وزملاؤه، 2000). ولكن لا تعتمد الصناعات الدوائية دائماً على المصادر النباتية الطبيعية كمصدر للمواد الحيوية الفعالة وذلك لعدة أسباب، منها وفرتها المحدودة وعدم استقراريتها الوراثية وتباين الإنتاجية، بالإضافة إلى تدمير البيئة الطبيعية للنبات، وصعوبة تطبيق التكنولوجيا في العمليات الزراعية (Pand و Srivastava، 1998). ويهدف تحقيق الاستفادة من نواتج الاستقلاب الثانوية أصبح البحث في كيفية زيادة هذه المركبات في النباتات مجالاً قائماً بذاته، خاصة بعد الثورة التي أحدثتها منظمات النمو النباتية Plant growth regulators في زيادة تراكم المواد الفعالة في النباتات وتنشيط الخلايا وتماييزها، ولتخفيف التكاليف الباهظة التي كانت تصرف في إنتاج هذه المركبات في النظم البيئية الطبيعية *In Vivo* أصبحت تنتج مخبرياً *In Vitro* في زراعات خلوية يتحكم بها وبكمية إنتاجها (Verppote وزملاؤه، 1991).

احتلت تقانة زراعة الأنسجة النباتية Plant tissue culture مركزاً مهماً وبارزاً بين الطرائق المختلفة للزراعة، فقد فتحت مجالاً غير محدود للتطبيقات الزراعية، ومن هنا برزت أهميتها كطريقة بديلة للطرائق التقليدية في إكثار وتحسين النبات، وأهم ما يميز النباتات الناتجة عن هذه الطريقة أنها متماثلة فيما بينها ومشابهة للنبات الأم، كما تسهم هذه التقانة في حفظ الأصول الوراثية للنبات المدروس وبخاصة النباتات المهددة بالانقراض نتيجة الرعي Grazing والجمع الجائر، وتسمح بتطبيق معاملات خاصة ضمن المخبر بهدف زيادة نواتج الاستقلاب الثانوية في النباتات الطبية، حيث يمكن التحكم بظروف الزراعة بالمقارنة مع الإكثار التقليدي الذي يتم تحت ظروف بيئية متباينة تؤدي إلى تباين تركيز المركبات المستخلصة من النباتات الطبية والعطرية (المغازي، 2001).

تعتمد زراعة الأنسجة النباتية على ظاهرة القدرة الذاتية الكامنة للخلايا التي تسمى (Totipotency) التي ذكرت من قبل Haberlandt عام (1902)، والتي تعني أن كل خلية حية من خلايا النبات لها المقدرة الذاتية على الانقسام والاستطالة والتمايز، وإنتاج نباتات كاملة مطابقة للأصل، إذا ما توافرت لها الظروف الملائمة من حيث الحرارة والضوء والرطوبة فضلاً عن المغذيات ومنظمات النمو، إذ يمكن بواسطتها زراعة مختلف الأجزاء النباتية في أوساط مغذية، والحصول منها على نباتات كاملة فضلاً عن استعمالها في مجالات بحثية وتطبيقية، منها تربية النبات وتحسينه وإنتاج الأدوية والعقاقير الطبية، وإنتاج شتلات خالية من الإصابات المرضية، والإكثار الدقيق للنباتات Micropropagation (Hartman وزملاؤه، 1990).

وقد لوحظ من خلال الدراسات أن المزارع الخلوية المستحدثة من أجزاء نباتية مختلفة تنتج بعض المواد المهمة طبيياً، وعند عزل سلالات الخلايا المنتجة لهذه المواد وإكثارها أمكن الحصول على مركبات أيضاً اقتصادية مهمة يتم استعمالها في صناعة الأدوية والعقاقير (Hara وزملاؤه، 1987; Stockigt وزملاؤه، 1995).

ولكي تحقق زراعة الأنسجة الغرض المطلوب منها لا بد من مراعاة متطلباتها من اختيار الأوساط المغذية الكفوءة وقليلة التكاليف، حيث تعد الأوساط المغذية الصناعية من حيث طبيعتها وتركيبها أهم عوامل نجاح الزراعة النسيجية، وتؤثر بصورة مباشرة في نمو الأجزاء النباتية المختلفة منذ بدء النمو وحتى وصولها إلى مرحلة الانقسام والتمايز (الكعي وحسين، 2011). وتوفر تقانات زراعة الأنسجة النباتية إمكانية التحويل في المسارات الأيضية لإنتاج المركبات المهمة اقتصادياً، ومن ضمنها المركبات الحيوية الفعالة وهذا الأمر يصعب تحقيقه في النباتات النامية في الطبيعة (Purohit، 1999).

ومن المعلوم أن نمو النبات هو محصلة لنمو جميع خلاياه وأنسجته وأعضائه، وبالتالي هناك مواداً عضوية تنتج داخل النبات تعمل على تنظيم النمو والتطور يطلق عليها منظمات النمو Growth regulators الطبيعية. وتتكون هذه المواد العضوية بكميات صغيرة جداً في أماكن معينة من النبات ثم تنتقل إلى أماكن أخرى لإحداث تأثيرها الفيزيولوجي. واستعملت منظمات النمو المصنعة منذ زمن في تنظيم مراحل النمو في النبات مثل الإنبات Germination والنمو Growth والنضج Maturity، ولكن الدراسات والمعلومات حول

تأثيرها في تخليق نواتج الاستقلاب الثانوية لا تزال قليلة نسبياً (Povh و One، 2006)، إلا أنها أثبتت أنّ النظام الهرموني من الأنظمة التي تستجيب في المتعضية لظروف الإجهاد وعمليات التكيف، ما يؤثر في التعبير الوراثي. عموماً، تحدد الهرمونات النباتية مستوى الطفرات الطبيعية مشكلة بذلك السبب الرئيس للتباين الوراثي في المزارع الخلوية النباتية (Kunakh، 2005<sup>b</sup>)، ففي الأنسجة النباتية المتميزة تختلف الخلايا اعتماداً على وظائفها، ولا تقتصر هذه الاختلافات على التغيرات المورفولوجية والكيميائية الموجودة في الخلايا تحت تأثير منظمات النمو النباتية، بل أيضاً للتغيرات الوراثية في مورثاتها دوراً مهماً، تؤدي في النهاية إلى قيام الخلايا بوظائف محددة، إلا أنّ هذا الأمر مختلف في حالة الزراعة الخلوية في ظروف *In Vitro*، حيث تنقسم وتتكاثر بسرعة نتيجة لاختلال التوازن الهرموني، وتحول الخلايا من الحالة المتميزة إلى الحالة الميرستيمية (المنقسمة) وتشكل الكالوس الأولي (Kunakh، 2005<sup>b</sup>).

تعد تقنية مزارع الكالوس من التقنيات الحديثة المهمة كمصدر جديد لنواتج الاستقلاب الثانوية، وأكثر كفاءة من الاعتماد على النبات مباشرة. وإن القليل من الدراسات التي تناولت المقارنة بين نواتج الاستقلاب الثانوية Secondary metabolism products المنتجة من قبل النبات الأصل والكالوس المستحدث من أجزاء مختلفة منه، حيث تفيد في اختيار خطوط خلوية Cellular lines ذات إنتاجية جيدة من المواد الحيوية الفعالة (Zenk وزملاؤه، 1977). ولتحقيق هذا الهدف، توجهت الدراسات الحديثة إلى البحث عن العوامل المحفزة لنمو وإنتاجية المزارع الخلوية من المواد الحيوية الفعالة، كونها تقدم مزايا عديدة بالمقارنة مع النباتات المنتشرة في الطبيعة، كعزل المركبات الكيميائية من الخلايا والأنسجة المزروعة بشكل سريع وسهل بالمقارنة مع استخلاصها من النبات الأصل، بالإضافة إلى إنتاجها بشكل مستمر على مدار العام دون أي تأثير للعوامل البيئية غير المناسبة وضمن ظروف مسيطر عليها (Fumihiko وزملاؤه، 2000)، ما يعطي الأفضلية لتقنية مزارع الكالوس حتى لو لم تكن قادرة على إنتاج المركبات الحيوية الفعالة بمستوى إنتاجها نفسه في النبات الأم.

تستعمل تقنيات الزراعة الخلوية ومزارع الكالوس بشكل واسع لأغراض البحث العلمي والتجارب العملية جنباً إلى جنب مع طرائق الانتخاب التقليدية، حيث ينتشر هذا النهج لتسريع الحصول على طرز وراثية Genotypes جديدة لأنواع النباتية ذات خصائص جيدة، معتمدة

في ذلك على التباينات الجسمية Somaclonal variations أو تباين السمات الفيزيولوجية والكيميائية والوراثية للخلايا النباتية المزروعة في الزجاج (*In Vitro*) Maidanyuk وزملاؤه، (2007).

يؤدي تغيير ظروف التنمية لمزارع الكالوس خصوصاً محتوى الوسط من العناصر المعدنية المغذية Nutrients والسكروز Sucrose، ونوع الوسط (صلب أو سائل) إلى تغير وراثي في مزارع الكالوس على المستوى الجزيئي، حيث يمكن كشفه باستعمال إحدى تقنيات تفاعل بوليميراز التسلسلي Polymerase Chain Reaction، إذ من المرجح اختلاف نسبة التعددية الشكلية الناتجة عن المرئسات المستعملة في كل مرة يتغير فيها واحد أو أكثر من ظروف التنمية تلك (Spiridonova وزملاؤه، 2007)، ما يؤكد وجود اختلاف وراثي بين المزارع الخلوية بالمقارنة مع النبات الأم المانح Donor، وتعود أهمية دراسة هذه التباينات الجسمية بأنها تعطي فكرة عن ثباتية مجين النبات المدروس، حيث يمكن استعمال هذه المزارع الخلوية التي تعطي نسبة تعددية شكلية Polymorphism مرتفعة بالمقارنة مع النبات الأم لتطوير واستنباط أصناف جديدة (Maidanyuk وزملاؤه، 2007).

يعد عدد الصبغيات Chromosome number مؤشراً على وجود تضاعف صبغي Polyploidy، كما يعكس الاختلاف في عدد الصبغيات الأساسي بين النباتات، وغالباً ما نجد أن النوع نفسه يمكن أن يملك أنماطاً خلوية ذات تضاعفات صبغية مختلفة، ويمكن أن تتمتع النباتات بخصائص زراعية وطبية جيدة بسبب هذه التضاعفات الصبغية (Sundara و Raghavan، 1957). ويحدث التضاعف الصبغي نتيجة تضاعف العدد الأساسي من الصبغيات (X) بما يزيد على تضاعفين ( $2n=2X$ )، فتنشأ بذلك التضاعفات الثلاثية Triploidy والرابعة Tetraploidy والخامسة Pentaploidy...إلخ.

يمكن للتضاعف الصبغي أن يحدث بشكل طبيعي أو بشكل اصطناعي باستعمال العديد من المواد الكيميائية مثل الكولشيسين Colchicine والأوريزالين Oryzoline وغيرها من المواد التي تؤدي دوراً مهماً أثناء الانقسام الخلوي Cell division، بحيث تعيق إتمام طور الهجرة Anaphase بالرغم من حدوث تضاعف للصبغيات التي تبقى ضمن الخلية نفسها، وبذلك يتضاعف العدد الصبغي لهذه الخلية، وتستعمل هذه المواد بتركيز مختلفة (Redha وزملاؤه،

1998) وأزمة مختلفة (Anderson وزملاؤه، 1991) وطرائق مختلفة حسب الجزء النباتي (Petersen وزملاؤه، 2002).

نفذت هذه الدراسة على أحد الأنواع البرية التابعة للعائلة الباذنجانية Solanaceae المنتشرة في البيئة السورية، نبات البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus*، الذي يمتاز بأهميته الطبية والعلاجية في دساتير الأدوية العالمية، التي أكدتها كتب التراث ومنشورات البحث العلمي لمحتواه من قلويدات التروبان Tropane alkaloids المعروفة بأهميتها كونها شالة للجملية العصبية نظيرة الودية Parasympathetic Nervous System ومسكنة للجملية العصبية المركزية Central Nervous System (السامرائي، 1983).

## 2. مبررات البحث: Research justifications:

انطلاقاً من غنى الفلورا السورية بالنباتات الطبية ذات القيمة الدوائية المهمة وغير المستفاد منها في الصناعات الدوائية، وكون هذه النباتات مصدراً لكثير من المواد الحيوية الفعالة والتي تدخل في صناعة الكثير من الأصناف الدوائية، وانطلاقاً من إدراج بعض النباتات ذات الأهمية الطبية الدستورية في القائمة الحمراء للنباتات المهددة The IUCN Red List of Threatened Plants (IUCN، 2000) نتيجة استنزاف المصادر الطبيعية لها، دفعنا ذلك للبحث عن طرائق بديلة للحفاظ على هذه النباتات والاستفادة منها كمصدر للمواد الحيوية الفعالة. من هنا يبرز دور التقانات الحيوية في ضمان التزود المستمر بالمواد الحيوية الفعالة الضرورية ذات المنشأ النباتي، ما يوفر المساحات الزراعية وكمية المياه اللازمة للزراعة، بالإضافة إلى توفير الجهود اللازمة لاستخلاص هذه المواد، وبهذا تكون تقانات زراعة الأنسجة أكثر جدوى من الناحية الاقتصادية.

### 3. أهداف البحث: Research objectives

يهدف البحث إلى الحصول على خط خلوي Cellular line من كالوس نبات البنج الذهبي (*H.aureus*) ذو إنتاجية جيدة من قلويدات التروبان Tropane alkaloids، ولتحقيق هذا الغرض لا بد من دراسة النقاط الآتية:

- دراسة سلوك واستجابة الكالوس المستحدث من سويقات نبات البنج الذهبي أثناء تنميته على أوساط مغذية مختلفة التركيب وخالية من منظمات النمو.
- دراسة ديناميكية تراكم قلويدات التروبان وتحديد تابع النمو للخلايا خلال مراحل عمرية مختلفة لمزارع الكالوس Callus cultures.
- دراسة التباينات الجسمية Somaclonal variations بين التجمعات الخلوية النامية في المعاملات المدروسة باستعمال تقنية التكرارات البسيطة الترادفية البينية (ISSR Inter Simple Sequence Repeats).
- دراسة تغير تعبير بعض المورثات المرمزة للأنزيمات الداخلة في مسار تخليق قلويدات التروبان كمورثة (N- Putrescine Methyl Transferase (PMT: EC 2.1. 1. 53) المسؤولة عن إنتاج الهيوسيامين، ومورثة (Hyoscyamine 6B- (H6H: EC 1.14.11.11) Hydroxylase المسؤولة عن تحويل الهيوسيامين Hyoscyamine إلى سكوبولامين Scopolamine، بالإضافة إلى مورثة (Tropinone (TR-I: EC 1.1.1.206) Reductase I المسؤولة عن إنتاج التروبين Tropine ومورثة (Tropinone Reductase II (TR-II: EC 1.1.1.236) المسؤولة عن إنتاج البسيدوتروبين Psedotropine، وذلك عن طريق تقدير مستويات التراكم النسخي لـ mRNA الخاص بهذه المورثات باستعمال تقنية تفاعل بوليمراز التسلسلي في الوقت الحقيقي Real Time PCR .
- دراسة التضاعفات الصبغية في الخطوط الخلوية خلال مراحل عمرية مختلفة لمزارع الكالوس.

الفصل الثاني

**Chapter Two**

الدراسة المرجعية

**Literature Review**

#### 4. الدراسة المرجعية Literature Review:

يتبع جنس البنج *Hyoscyamus* الفصيلة الباذنجانية Solanaceae (Robbers وزملاؤه، 1996)، ويعد أهم جنس فيها بعد *Datura* و *Atropa*، ويضم 20 نوعاً معظمها محلي في منطقة البحر المتوسط (Saidon، 2008)، إضافة إلى انتشاره في شمال أفريقيا وآسيا ووسط أوروبا وجنوبها. وأهم الأنواع المعروفة في العالم: *H. niger*، *H. reticulate*، *H. muticus*، *H. pusillus*، *H. major*، *H. minor*، *H. albus*، *H. desertorum* والنوع *H. aureus* الذي هو مادة الدراسة الحالية.

اكتشف نبات البنج *Hyoscyamus* في إنكلترا في أواخر القرن السابع عشر، ثم أدخل إلى المجال الصيدلاني سنة 1809 (Trease و Evans، 1996)، وأطلق عليه عدة تسميات حسب المنطقة التي عرف فيها، فابن سينا أطلق عليه اسم البنج، وعرف بالسكران في مصر، ويطلق عليه في معظم الدول الغربية باسم البنج، أما باللاتينية فيسمى *Hyoscyamus* وبالإنجليزية Henbane (Arroo وزملاؤه، 2007 ; Bernard، 2001). ويشير Mouterde (1983) إلى وجود ستة أنواع تتبع جنس البنج *Hyoscyamus* موجودة في الفلورا السورية، تنتشر في المناطق الجافة وشبه الجافة والرطبة. ونبات البنج الذهبي (*H. aureus*) نبات عشبي ارتقاعه من 30 - 90 سم، ذو لون أخضر شاحب ورائحة كريهة، ذو ساقاً منتصبية تحمل أوراقاً معنقة ومغطاة بشعيرات كثيفة، الأزهار ناقوسية الشكل، صفراء اللون مع بقع بنفسجية في قاعها، خماسية السبلات ومنضغطة على الثمرة في شكل أقماع (Pudersell، 2006) (الشكل رقم، 1). يصنف جنس البنج نباتياً حسب (Mouterde، 1983) كما يلي:

Kingdom: Planta

Class: Dicotyledones

Order: Scrophulariales

Family: Solanaceae

Genus: *Hyoscyamus*

Speceis: *H. aureus* L.



الشكل رقم (1): نبات البنج الذهبي

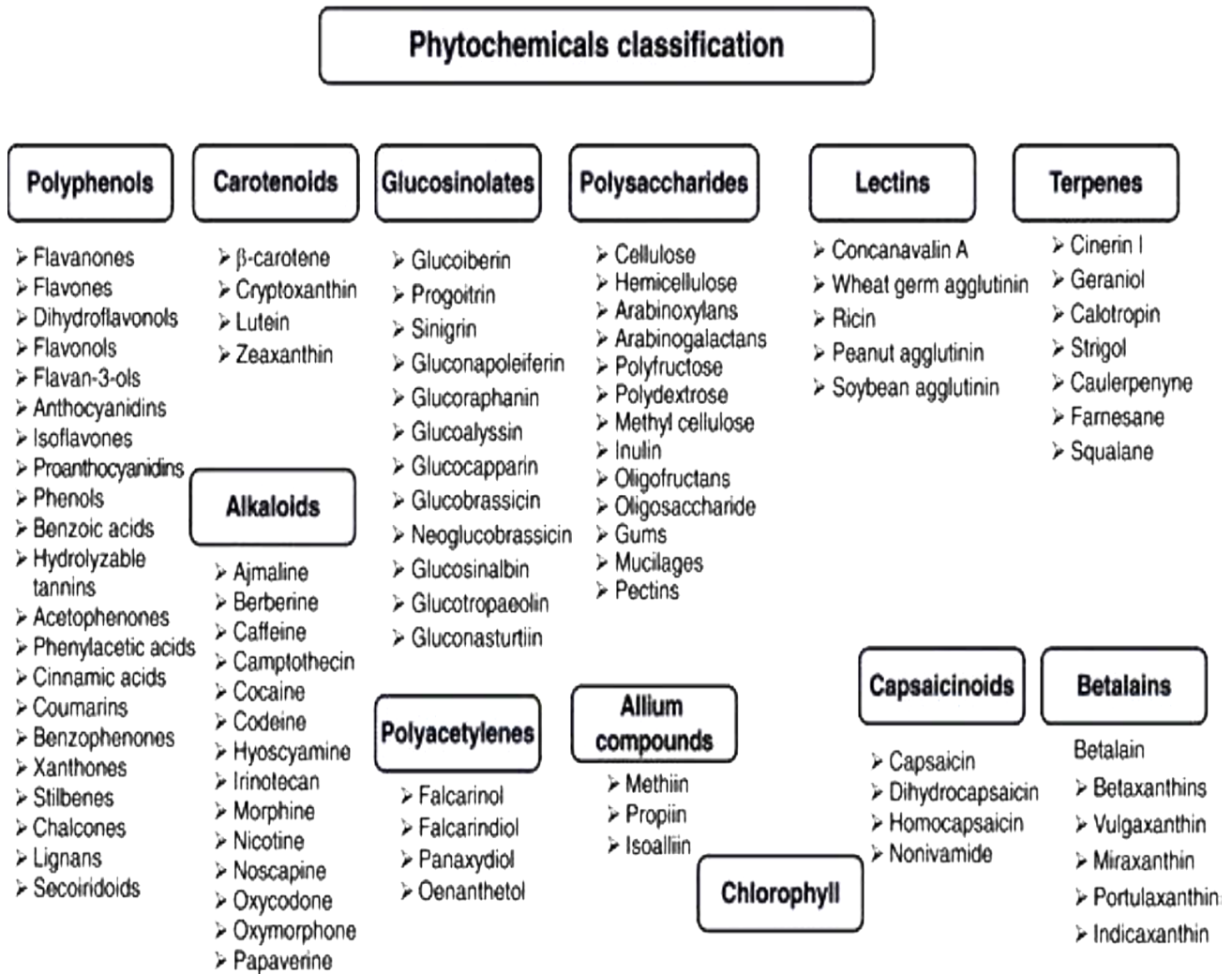
#### 1.4 . الدراسة الكيميائية Chemical study:

##### 1.1.4. نواتج الاستقلاب الثانوية Secondary metabolism products في النبات:

تعرف نواتج الاستقلاب الثانوية بأنها مركبات كيميائية عضوية، تنتج بكميات ضئيلة في النباتات الراقية، حيث تعد مركبات استقلاب نهائية تخزن في أنسجة خاصة (Sachan، 2004)، تنتج أساساً من التفاعلات الكيميائية لمركبات الاستقلاب الأولية Primary metabolism products التي تعد المصدر الرئيس لها مثل: الأحماض الأمينية Amino acids، والسكريات Carbohydrates، والأحماض الدهنية Fatty acids وغيرها، التي تعد نواتج أولية لعمليات الهدم والبناء التي تحدث داخل النبات والناجمة عن عمليات التنفس Respiration والتركيب الضوئي Photosyntheses، حيث تتوسط هذه العمليات للوصول إلى نواتج الاستقلاب الثانوية تفاعلات مثل عمليات الأكسدة وتحلل السكريات السداسية مثل الجلوكوز ونزع الكربون وغيرها (Tolonen، 2003).

تحافظ نواتج الاستقلاب الأولية Primary metabolism products للنباتات على وظائف الحياة الأساسية للخلية، مثل الانقسام والنمو والتنفس والتخزين والتكاثر، وعلى النقيض من ذلك، لا تمتلك نواتج الاستقلاب الثانوية دوراً مباشراً في النبات مثل النمو والتكاثر، بل تؤدي دوراً رئيساً في تكيف النباتات في بيئتها (Kossel، 1891) والمحافظة على استمراره وبقائه مثل: الدفاع، والمقاومة والتأقلم مع الظروف البيئية غير الملائمة (Taiz و Zeiger، 2002)، إضافة إلى دخولها في تركيب أنواع عديدة من الأدوية (Richter، 1993). حيث استعملت نواتج الاستقلاب الثانوية للنباتات منذ قرون عديدة في برامج تطوير الأدوية في مجال الصناعات الصيدلانية، ما أعطاهم اهتماماً كبيراً للاستعمال في المجال الطبي (Sasson، 1991).

ويوضح الشكل رقم (2) أهم مجموعات نواتج الاستقلاب الثانوية.



الشكل رقم (2): أهم مجموعات نواتج الاستقلاب الثانوية

وبذلك نجد أن نواتج الاستقلاب الثانوية ستستمر بكونها أحد المصادر الأساسية للأدوية الجديدة لأنّها:

- تمتلك تنوعاً بنيوياً لأمثل له، لكن تطور العديد من التقنيات الجديدة والنوعية سهل إجراء عمليات البحث والاستقصاء والعزل وتحديد الهوية للمركبات الفعالة بشكل سريع ودقيق.
- تؤدي دوراً مهماً بوصفها مواداً بيولوجية فعالة يمكن استعمالها في علاج الكثير من الأمراض، وكونها توفر جانباً آمناً للاستعمال البشري بالمقارنة مع الآثار الجانبية الضارة للأدوية المصنعة (الكيميائية) (Davuluri وزملاؤه، 2005).

#### 2.1.4. المحتوى الكيميائي لنبات البنج *Hyoscyamus*:

يحتوي نبات البنج على الجليكوزيدات والفلافونيدات الجليكوزيدية، وبعض الأمينات الطيارة والدهون وبعض الأحماض غير المشبعة مثل حمض الأوليك والبروتينات (Pudersell، 2006)، والعديد من العناصر المعدنية مثل Ca، Zn، K، Mg (Arroo وزملاؤه، 2007). وكمحتوى أساسي قلويدات التروبان (TAs) التي تختلف نسب تراكمها من عضو نباتي إلى آخر، حيث تتراوح نسبتها من 0.5-1.5% من الوزن الجاف، وبشكل الهيسوسيامين Hyoscyamine القلويد الرئيس فيها، بالإضافة إلى مشتقات قلويدية مثل الأتروزين Atroscine والسكوبين (Michael) Scopolamine وزملاؤه، 2004).

#### 3.1.4. قلويدات التروبان *Tropane Alkaloids*:

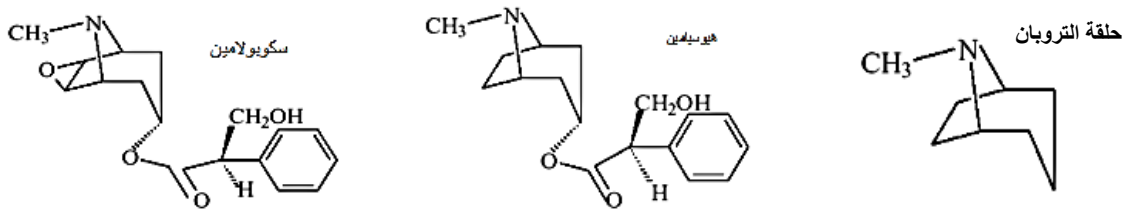
تعد قلويدات التروبان (TAs) *Tropane alkaloids* (الهيسوسيامين Hyoscyamine) والسكوبولامين Scopolamine والأتروبين Atropine) من المركبات المهمة التي تنتج في العديد من الأجناس النباتية العائدة للفصيلة الباذنجانية *Solanaceae* مثل الداتورة *Datura*، الأتروبا *Atropa*، البنج *Hyoscyamus*، السكوبوليا *Scopolia* والدوبوسيا *Douboisia* (Kang وزملاؤه، 2004 ; Milcent، 2003)، وتنتج العائلة الباذنجانية ما يقارب 0.5-0.8 غرام لكل 100 غرام وزن جاف من قلويد السكوبولامين Scopolamine (ذو الفعالية الطبية الأكبر بين قلويدات التروبان) (Celine و Michele، 2005). ويتراوح دور قلويدات التروبان من نواتج استقلاب ثانوية إلى أماكن تخزين احتياطية للنتروجين وبدائل للعناصر المعدنية في

النبات، بالإضافة إلى دورها في حماية النبات من الحشرات والحيوانات المفترسة (أبو زيد، 2006).

وتعرف القلويدات بأنها مركبات عضوية، آزوتية، حلقة، غير متجانسة، تنتج في النباتات بكميات ضئيلة (سعيد، 2001)، كما تعد مركبات قاعدية، متوسطة الكتلة الجزيئية، وتعد الأحماض الأمينية طلائع تخليق هذه القلويدات (Facchini وزملاؤه، 2004).

تشتمل قلويدات التربوان على قلويدات الباذنجانيات (Solanaceous Alkaloids) وقلويدات فصيلة حمراوات الخشب Erythroxylaceae، ورغم أن مصطلح قلويدات الفصيلة الباذنجانية يقتصر على قلويدات نواة التربوان، إلى أن بعض أفراد هذه الفصيلة تحتوي قلويدات غير تربوانية مثل قلويد Nicotine من نبات التبغ (Nicotina tabacum) و Capsicin من الفليفلة (Capsicum Annum) Peper و Solanine من السولانوم (Solanum dulcamara) (حرامي، 2002).

تنشأ قلويدات التربوان من الأحماض الأمينية الأورنيثين Ornithine، والهستيدين Histidine، والأرجينين Arginine، والتيروسين Tyrosine والليسين Lysine (De luca و Pierre، 2000). وتتميز بوجود حلقة التربوان المبينة في الشكل رقم (3)، وهي حلقة ثمانية غير متجانسة  $C_8H_{15}N$  والناجمة عن اندماج حلقتي البيريدين والبيروليدين في الموضعين 1 و 5 بمجموعة N-ميثيل (Leete، 1990)، وعلى الرغم من أن التربوان يحتوي على ذرتي كربون غير متناظرتين عند  $C_1$ ،  $C_2$  إلا أنه غير فعال ضوئياً (Shafik، 1981).



الشكل رقم (3): البنية الهيكلية لحلقة التربوان وقلويدي الهوسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine

❖ **الأترابين Atropine**: هو إستر لحمض التروبيك Tropic acid مع قاعدة التروبين، يوجد هذا القلويد بكميات أساسية (0.8-1.2%) في نباتات الأتروبا *Atropa belladonna*، ويتميز بالقوام البللوري (بلورات إبرية الشكل مستقيمة) وهو غير نشط ضوئياً، سهل الذوبان في الكحول والكلوروفورم وقليل الذوبان في الإيثر، ويزوب بصعوبة في الماء، ويملك الصيغة الكيميائية  $C_{17}H_{23}O_3N$  (أبو زيد، 2006). و يوضح الجدول رقم (1) أهم أملاح الأترابين Atropine salts ومشتقاته.

❖ **الهوسيامين Hyoscyamine**: هو إستر لحمض التروبيك Tropic acid مع قاعدة التروبين، وهذا القلويد صلب القوام على هيئة بلورات بيضاء اللون خيطية حريرية الطبيعة، كما أن هذا القلويد فعال ضوئياً فهو يساري الدوران =-22، ويملك الصيغة الكيميائية  $C_{17}H_{23}NO_3$  (أبو زيد، 2006)، وهو قلويد قابل للتحويل إلى الهوسين Hyoscyamine المشابه للداتورين Daturine في الداتورة *Datura* والدوبوسين Doubosine في الدوبوسيا *Doubosia*. كما أنه المركب الرئيس في أوراق وخلصات بذور أنواع البنج المختلفة *Hyoscyamus spp* (Pepin و Gaillard، 1999). ويعد الهوسيامين Hyoscyamine والأترابين Atropine متماكين راسيمين فهما متماثلان بالصيغة الكيميائية لكنهما مختلفان بخواصهما الفيزيائية كدرجة الانصهار والشكل، ويوضح الجدول رقم (2) أهم أملاح الهوسيامين Hyoscyamine salts ومشتقاته.

❖ **السكوبولامين (الهوسين) Scopolamine (Hyoscyamine)**: هو إستر لحمض التروبيك Tropic Acid مع قاعدة السكوبولين، يتواجد في صورة لزجة القوام أو على هيئة بلورات صلبة عديمة اللون، درجة انصهاره 59 درجة مئوية وهي غير ثابتة، إذ بمجرد ترك البلورات فترة من الزمن تتحول تدريجياً إلى القوام اللزج، وهو فعال ضوئياً، يساري الدوران ويملك الصيغة الكيميائية  $C_{17}H_{21}NO_4$  (أبو زيد، 2006)، ويوضح الجدول رقم (3) أهم أملاح السكوبولامين Scopolamine Salts ومشتقاته.

❖ **الأتروسين Atroscine**: إستر حمض التروبيك Tropic Acid وقاعدة السكوبين، وهو الشكل الراسيمي للهوسين Hyoscyamine أو السكوبولامين Scopolamine، ويوضح الجدول رقم (4) أهم أملاح الأتروسين Atroscine Salts ومشتقاته

الجدول رقم (1): أملاح الأتروبيين وأهم خواصها (حرامي وزملاؤها، 2002) نقلاً عن (Kenneth وزملاؤه، 1979؛ James، 1982، 1983، 1993؛ Merk وزملاؤه، 1976)

| الانحلالية                                                                          | درجة الانصهار | الشكل                                                                                    | الوزن الجزيئي | الصيغة              | الملح                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------|-------------------------------------------|
| ينحل بالماء، وبشكل ضئيل بالكحول،<br>غير منحل في الكلوروفورم والإيثر                 | 215           | بلورات عديمة اللون والرائحة، أو<br>مسحوق بلوري أبيض عديم الرائحة ذو<br>طعم مر            | 384.3         | C18H26BrNO3         | <b>Atropine methobromide</b>              |
| ينحل بالماء، وبشكل ضئيل بالكحول،<br>غير منحل عملياً في الكلوروفورم والإيثر          | 167           | بلورات عديمة اللون والرائحة، أو<br>مسحوق بلوري أبيض عديم الرائحة                         | 366.4         | C18H26N2O6          | <b>Atropine methonitrate</b>              |
| ينحل بالماء والغليسيرول، وبشكل<br>متوسط بالكحول، غير منحل في<br>الكلوروفورم والإيثر | 190           | بلورات عديمة اللون والرائحة، أو<br>مسحوق بلوري أبيض عديم الرائحة<br>مرة الطعم، سامة جداً | 694.82        | (C17H23NO3)2.H2SO4  | <b>Atropine sulphate</b>                  |
| منحل بالماء والكحول                                                                 | 162           | بلورات حبيبية                                                                            |               | C17H24CLNO3         | <b>Atropine hydrochloride</b>             |
|                                                                                     | 164-163       | بلورات                                                                                   |               | C17H24BrNO3         | <b>Atropine hydrobromide</b>              |
|                                                                                     |               | مواشير بلورية                                                                            |               | (C17H23NO3)2.H2C2O4 | <b>Atropine oxalate</b>                   |
|                                                                                     | 139-137       | بلورات من حمض كلور الماء الممدد                                                          |               |                     | <b>Atropine aurichloride</b>              |
|                                                                                     | 176-175       | صفائح بلورية مستطيلة الشكل                                                               |               |                     | <b>Atropine picrate</b>                   |
| منحل بالكحول والكلوروفورم، غير منحل<br>بالإيثر                                      | 128-127       | مسحوق بلوري                                                                              | 305.36        | C17H23NO4           | <b>Atropine-N-oxide</b>                   |
|                                                                                     |               |                                                                                          | 341.8         | C17H23NO4.Hcl       | <b>Atropine-N-oxide<br/>hydrochloride</b> |

الجدول رقم (2): أملاح الهيوسيامين وأهم خواصها (حرامي وزملاؤه، 2002) نقلاً عن (Kenneth وزملاؤه، 1979؛ James، 1982، 1983، 1993؛ Merk وزملاؤه، 1976)

| الانحلالية                                                                              | درجة الانصهار | الشكل                                                      | الوزن الجزيئي | الصيغة              | الملح                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------------------------------|---------------|---------------------|-----------------------------|
| ينحل بسهولة في الماء، ومتوسط الانحلالية في الكحول والكلوروفورم، وصعب الانحلال في الإيثر | 149           | بلورات بيضاء اللون عديمة الرائحة، أو تكون بشكل مسحوق بلوري | 370.3         | C17H23NO3.HCL       | Hyoscyamine hydrochloride   |
|                                                                                         |               | بلورات بيضاء اللون عديمة الرائحة، أو تكون بشكل مسحوق بلوري | 712.9         | (C17H23NO3)2.H2SO4  | Hyoscyamine sulphate        |
|                                                                                         | 165           | صفائح سداسية ذهبية من الايثانول أ حمض كلور الماء الممدد    |               | C17H23NO3.HAuCL4    | Hyoscyamine aurichloride    |
|                                                                                         | 180           | إبر لامعة حمراء قائمة                                      |               | C17H23NO3.HAuBr.H2O | Hyoscyamine auribromide     |
|                                                                                         | 206           | مواشير بلورية برتقالية اللون                               |               |                     | Hyoscyamine Platinichloride |
|                                                                                         | 165           | صفائح بلورية                                               |               |                     | Hyoscyamine picrate         |
|                                                                                         | 176           | مواشير بلورية                                              |               |                     | Hyoscyamine oxalate         |

الجدول رقم (3): أملاح الهيوسين وأهم خواصها (حرامي وزملاؤه، 2002) نقلاً عن ( kenneth وزملاؤه، 1979؛ James، 1982، 1983، 1993؛ Merk وزملاؤه، 1976)

| الانحلالية                                                              | درجة الانصهار | الشكل                                                                      | الوزن الجزيئي | الصيغة                                                                 | الملح                          |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| ينحل بالماء والكحول والكلوروفورم ولا ينحل بالإيثر                       | 144-140       | مسحوق بلوري أبيض اللون ذو طعم مر جداً                                      | 440.4         | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> BrNO <sub>4</sub>                      | Hyoscine butylbromide          |
| ينحل بالماء والكحول ولا ينحل بالكلوروفورم أو الإيثر                     | 197           | بلورات عديمة اللون وعديمة الرائحة أو مسحوق بلوري أبيض اللون                | 438.3         | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> .HBr.3H <sub>2</sub> O | Hyoscine hydrobromide          |
| ينحل بالماء والكحول والمحلول الميثيلي ولا ينحل بالكلوروفورم أو الأسيتون | 225           | بلورات أو مسحوق بلوري أبيض اللون عديم الرائحة                              | 398.3         | C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> BrNO <sub>4</sub>                      | Hyoscine methobromide          |
| ينحل بالماء والكحول ولا ينحل بالكلوروفورم أو الإيثر                     | 199-194       | بلورات عديمة اللون وعديمة الرائحة أو مسحوق بلوري أبيض اللون ذو طعم مر جداً | 380.4         | C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>          | Hyoscine methnitrate           |
|                                                                         | 209-208       | إبر مسننة الحواف                                                           |               | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> HAuCL <sub>4</sub>     | Hyoscine aurichloride          |
|                                                                         | 192-191       | يتبلور بشكل وريقات بنية اللون باستعمال HCL المغلي تركيزه 2.5%              |               | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> HAuBr <sub>4</sub>     | Hyoscine auribromide           |
|                                                                         | 188-187       | إبر صفراء شاحبة                                                            |               |                                                                        | Hyoscine picrate               |
|                                                                         | 80            | مسحوق بلوري أبيض                                                           | 319.35        | C <sub>17</sub> h <sub>21</sub> no <sub>5</sub>                        | Hyoscine –N- oxide             |
| ينحل بالماء وبشكل ضئيل في الكحول والأسيتون                              | 136-135       | مواشير بلورية                                                              |               | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>5</sub> .HBr                   | Hyoscine –N-oxide hydrobromide |

الجدول رقم (4): أملاح الأتروسين وأهم خواصها (حرامي وزملاؤه، 2002) نقلاً عن (Kenneth وزملاؤه، 1979؛

James، 1982، 1983، 1993؛ Merk وزملاؤه، 1976)

| الانحلالية                                                  | درجة الانصهار | الشكل  | الصيغة            | الملح                                            |
|-------------------------------------------------------------|---------------|--------|-------------------|--------------------------------------------------|
| ينحل بالماء،<br>وبشكل ضئيل<br>بالكحول، غير<br>منحل بالإيثير | 185-182       | بلورات | C17H22BrNO4       | <b>Atroscine<br/>hydrobromide<br/>trihydrate</b> |
|                                                             | 178-177       | بلورات | C17H21NO4C6H3N3O7 | <b>Atroscine picrate</b>                         |

#### 1.3.1.4. الأهمية الطبية لقلويدات التروبان Tropane Alkaloids:

تمتاز قلويدات التروبان (TAs) بأهميتها الدوائية واستعمالاتها الطبية العديدة حيث تعد:

▪ مهدئة Anodyne ومسكنة للآلام Sedative لا سيما للجملة العصبية المركزية (CNS) وشالة للجملة العصبية نظيرة الودية (PNS) (Tytgat و Guido، 2007).

▪ مضادة للتشنجات Antispasmodic الخاصة بمرض الشلل الرعاشي لاسيما في المراحل الأولى منه (Chevallier، 1996).

▪ مدرة للبول Diuretic (Leikin وزملاؤه، 1998).

▪ مهلوسة Hallucinogenic ومحدثة للإضطرابات في الجهاز العصبي (Roddick، 1991).

▪ منومة Hypnotic ومعالجة للأرق ومخدرة Narcotic (Frank و Rene، 2008).

▪ لعلاج قرحة المعدة ودوار السفر ومرض المنغوليا والصرع (Launert، 1981؛ Grieve، 1984؛ Bown، 1995).

▪ مضادات للتعرق وترياق للسموم ولعلاج داء باركنسون Parkinson's disease (Cordell، 1978).

▪ موسعة لحدقة العين Mydriatic ولمعالجة مرض الربو Asthma والسعال الديكي (Whooping cough، Oksman، 2007).

▪ تستعمل موضعياً لتخفيف آلام العضلات والمفاصل وفي تخفيف آلام الأسنان النخرة (الدليمي، 1976؛ Miller و Morris، 1988؛ الشماع، 1989؛ الدجوي، 1996) والتهاب القولون التشنجي والتهابات المعدة والأمعاء (Glaus وزملاؤه، 1974).

- تستعمل كمضادات كولينية Anticholinergic agent، أي في حالات التسمم بالمواد المثبطة للأنزيمات المحللة للأستيل كولين Cholinesterase Inhibitors (الشماع، 1989).
- أشار المياح (2001) إلى استعمالها في المستحضرات الطبية لعمليات التخدير الصغرى
- كما يحوي النبات أيضاً مركبات غير قلويدية مثل Grossamide و Cannabisins للذين يبديان سمية معتدلة في مزارع خلايا سرطان البروستات (CY وزملاؤه، 2002).

#### 2.3.1.4. التمثيل الحيوي لقلويدات الهوسيامين Hyoscyamine والهوسين Hyoscyne:

يبدأ تخليق قلويدات التروبان (TAs) في النبات في المجموع الجذري (المنطقة الواقعة خلف القلنسوة)، ثم تنتقل إلى الأجزاء الهوائية عبر الخشب (Xylem) (Waller و Nowaohi، 1978) وتمتلك الشعيرات الجذرية في نباتات العائلة الباذنجانية Solanaceae قدرة كبيرة على تجميع تلك القلويدات (Oksman و Aroo، 2000). وتتركز القلويدات بشكل أساسي في الفجوات Vacuoles، ولنواة الخلية دور أساسي في استقلالها (Simola، 1974). وتوجد القلويدات عادة في حويصلة الخلية على شكل أملاح عضوية قابلة للذوبان في الماء تابعة للأحماض Tannic acid، Oxalic acid، Citric acid وعند انتقال هذه الأملاح إلى الأجزاء الهوائية تحدث لها عمليات استقلابية مختلفة لتكوّن قلويدي الهوسيامين Hyoscyamine والهوسين Hyoscyne.

تنشأ قلويدات التروبان (TAs) أساساً من الحمض الأميني الأورنيثين Ornithine أو الأرجينين Arginine كما يبين الشكل رقم (4)، حيث يتحول الأول إلى مركب البوتريسين Putrescine بعد نزع مجموعة الكربوكسيل بفعل نشاط أنزيم Ornithine de Carboxylase (Orn DC)، في حين يتحول الثاني إلى إجماتين Agmatine بفعل أنزيم Arginine de Carboxylase (Arg DC) وهذا يتحول بدوره إلى البوتريسين Putrescine. ومن المعلوم أن مركبات عديد الأمين Polyamines كالبوتريسين Putrescine لها دور تنظيمي في عمليات النمو وانقسام الخلايا وأيض الأحماض النووية، وتسهم في تأخير الشيخوخة Senescence في أنسجة النبات وخصوصاً المعرضة للإجهاد الملحي والحرارة المرتفعة (Altman و Uriel، 1981). يتحول مركب البوتريسين تلقائياً بوجود الأنشطة الحيوية للأنزيمات المختلفة ليكون في

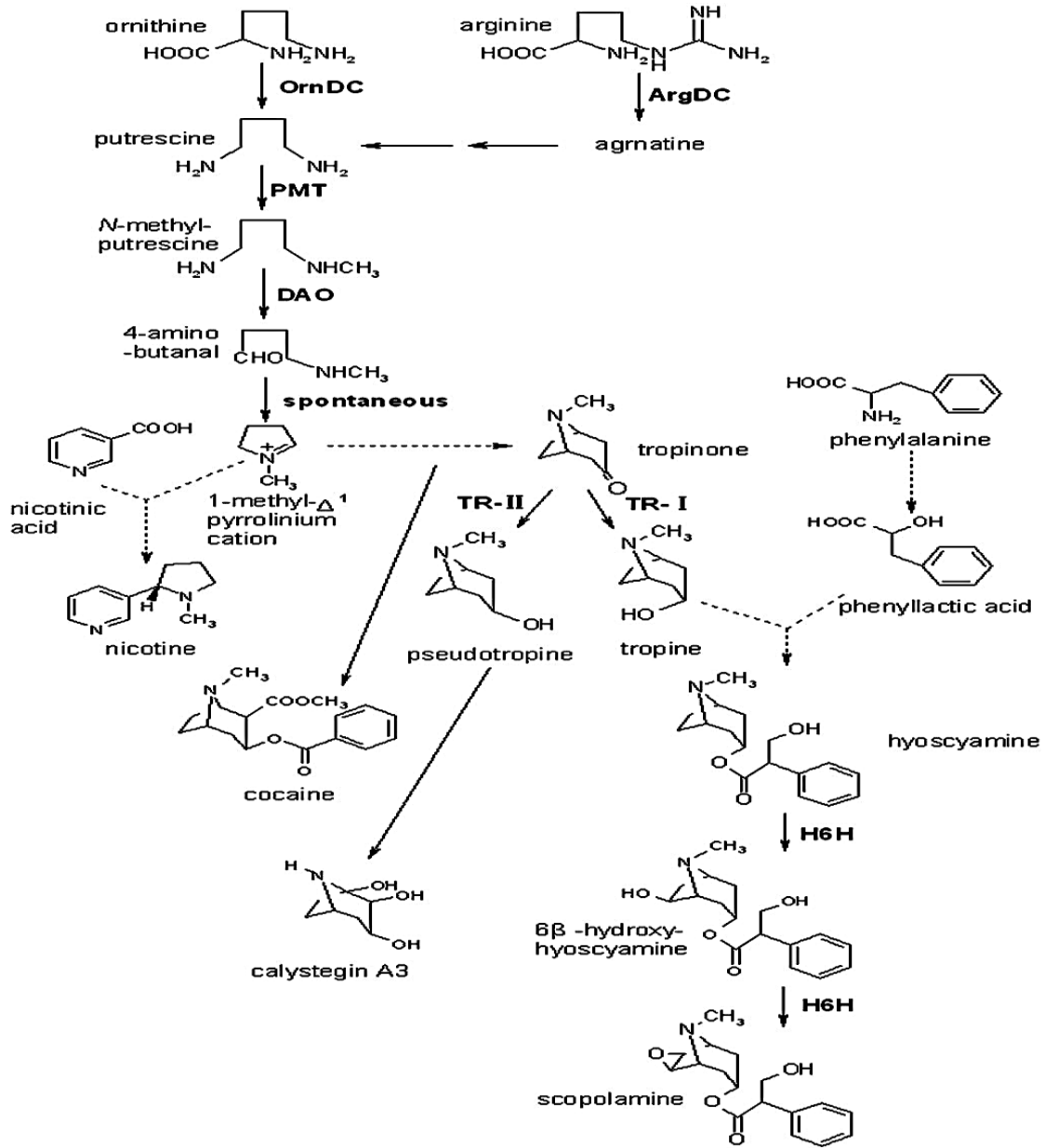
النهاية إما قلويد الهيوسيامين Hyoscyamine أو الهيوسين (السكوبولامين) Hyoscine، أو الكوكاين Cocain وذلك بوجود العديد من الأنزيمات أهمها:

1- Putrescine N- Methyltransferase (PMT).

2- Diamine Oxidase (DAO).

3- Tropinone Reductase I (TR-I) و Tropinone Reductase II (TR-II).

4- Hyoscyamine 6B-Hydroxylase (H6H).



الشكل رقم (4): مسار التخليق الحيوي للقلويدات التروبانية (Lei وزملاؤه، 2004)

حيث تحدث عملية إضافة جذر الميثيل Methylation لمركب البوتريسين Putrescine بوجود أنزيم PMT لتكوين مركب N-Methyl Putrescine (MP) المكتسب لمجموعة الميثيل كما في الشكل رقم (4)، وتعد هذه العملية الخطوة الأولى في تخليق قلويدات التروبان (TAs)، ثم تنزع منه مجموعة الأمين وتتم أكسدته لإعطاء مركب 4-Aminobutanal، وهذا بدوره تتم عليه عملية الحلقة Cycliation بصورة تلقائية وذاتية الحدوث لتكوين مادة 1-Methyl Pyroline وذلك بوجود أنزيم DAO، ثم يتأيز إلى مركب Ketone Tropinone الذي يعد أول مركب وسطي بحلقة التروبان القلويدية، ويقع عند نقطة التفرع لمسار التخليق البيولوجي لقلويدات الهوسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine والكوكاين Cocaine والنيكوتين Nicotine، ويوجد نوعان مختلفان من الأنزيمات التي تعمل على اختزال مجموعة الكيتون لمركب التروبينون Tropinone، تتمثل في الأنزيم الأول Tropinone Reductase I (TR-I) المكون لقلويد التروبين Tropine والمحتوي على مجموعة 3-β بيتا الهيدروكسيل (Hydroxyle)، بينما الأنزيم الثاني Tropinone Reductase II (TR-II) الذي ينتج جاما - التروبين Y-Tropine.

يتفاعل مركب Tropine مع حمض التروبيك Tropic acid (الذي يصطنع من الحمض الأميني فينيل آلانين Phenylalanine) ليعطي قلويد الهوسيامين Hyoscyamine ومن ثم يتحول إلى هيوسين (سكوبولامين) Hyoscyne (Scopolamine) بخطوتين من التفاعل يتوسطهما أنزيم H6H (Hashimoto وزملاؤه، 1993 ; Jouhikainen وزملاؤه، 1999):

1. Hydroxylation تحدث عند الوضع 6β لحلقة التروبان لتكوين مركب 6B-

Hydroxy Hyoscyamine بوجود أنزيم H6H.

2. عملية الاختزال تتم بإزالة ذرة الهيدروجين في الوضع 7β لتكوين قلويد الهوسين

Hyoscyne بوجود الأنزيم نفسه.

#### 3.3.1.4. التحديد الكمي والنوعي لقلويدات التروبان Tropane Alkaloids:

يعد تحديد المذيبات الفعالة ذات أهمية بالغة في عمليات الاستخلاص والتنقية للمركبات القلويدية (Jorgenson و Daniels، 1982)، كما أن تحديد قابلية الذوبان بالمذيبات العضوية يعد خطوة مهمة في تحديد الطبيعة الكيميائية للمركب المراد استخلاصه (Bucket و Stenalke، 1975). والفكرة الأساسية من عملية استخلاص وتنقية القلويدات تتضمن عزل الأحماض والراتنجات والدهون والصبغات وغيرها من المكونات الموجودة في المستخلص النباتي (الغانمي، 2000). ويفضل أن تصاحب عملية الاستخلاص عمليات الرج والخلط، أما خلال عملية فصل الأطوار فيفضل أن تكون بطيئة لإعطاء فرصة لزيادة الكمية المستخلصة (الغانمي، 2000).

تعزل نسبة كبيرة من العقاقير في الطب الصيدلاني الحديث بشكل مباشر من أجزاء محددة من النبات أو تصنع بتحويل بعض المركبات الأساسية في الجزء النباتي، وعند توافر هذه المركبات الفعالة بيولوجياً فإن طرائق التحليل الكيميائي لهذه المركبات تعد مهمة من الناحية الاقتصادية والطبية (Tolonen وزملاؤه، 2003).

تشكل النباتات القلويدية والمستحضرات المشتقة منها مجموعة مهمة من المواد الدستورية المستعملة بشكل كبير في المعالجة الحديثة للعديد من الأمراض، لذلك يعد التحديد الدقيق لكمية القلويدات الموجودة في النباتات الطبية جزءاً مهماً في التحليل الصيدلاني، فيمكن أن يسبب النقص الضئيل للقلويدات في المستحضر الدوائي تناقصاً كبيراً في التأثير الفيزيولوجي، كما يمكن أن ينتج عن الزيادة الضئيلة للقلويد في المستحضر تأثيرات سامة أثناء المعالجة (حرامي وزملاؤه، 2002). ولذلك فقد استعملت مجموعة من التقنيات التي تفيد في التحديد الكمي والنوعي لقلويدات التروبان (TAs) مثل تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) High Performance Liquid Chromatography وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) Thin Layer Chromatography والكروماتوغرافيا الغازية مطيافية الكتلة (GC-MS) Gas Chromatography- Mass spectrometry، بالإضافة إلى إمكانية الكشف عنها باستعمال جهاز المطياف الضوئي UV-Spectrophotometer، ومعايرتها حجماً من خلال تحديد الراسب القلويدي حجماً عبر تحديد النتروجين القاعدي الكلي (Glenn، 1989).

#### 4.3.1.4. تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) High Performance

##### :Liquid Chromatography

يعد استعمال جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) واحدة من التقنيات المستعملة في تقدير كمية ونوعية المركبات القلويدية في نباتات العائلة الباذنجانية Solanaceae، نظراً لقابلية منظومة الجهاز على فصل مكونات المستخلص النباتي الخام، أو مستخلص خلايا الكالوس عند أطوال موجية محددة، والتعرف عليها باستعمال 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.

يعتمد مبدأ هذه التقنية في فصل مكونات خليط ما على وجود طورين هما الطور الثابت (حبيبات السيليكا) والطور المتحرك (مذيبات عضوية)، حيث أنّ عدد من مكونات الخليط تدمص على حبيبات الطور الثابت وبعضها لا يدمص، وعندما ينسكب الطور المتحرك يجرف معه بعض مكونات الخليط وفقاً لقوة جريان هذا الطور، ما يؤدي لفصل مكونات هذا الخليط. ثمّ يكشف عنها بواسطة كواشف مختلفة منها كاشف الأشعة فوق البنفسجية UV وذلك عند أطوال موجية مختلفة لتتم المقارنة مع مواد قياسية Standards معروفة. وتعتمد كفاءة الفصل على مواصفات العمود وقطر جزيئات المادة المعبأة (العودة، 1990).

ويتم الفصل والتمييز بين المركبات تبعاً لزمن الاستبقاء (Retention time (Rt)، والذي يعرف على أنه (الزمن المستغرق من بدء الحقن إلى الزمن الذي تصل فيه القمة إلى نهايتها العظمى) (ماكثير وبونيللي، 1979). وإنّ اختلاف الصفات الفيزيائية والكيميائية بين مختلف مكونات المزيج المحقون في الجهاز، بالإضافة للامتزاز الحاصل على حشوة العمود (الطور الثابت) يؤدي لاختلاف زمن احتباس كل مكون عن الآخر (زمن الاستبقاء)، كما يتأثر ذلك بالكتلة الجزيئية، وبالتالي فإن المكون الذي زمن احتباسه أقل يخرج أولاً من العمود الشعري. كما تعد سرعة الجريان Flow rate (التدفق) للطور المتحرك ذات أهمية، فسرعة الجريان المرتفعة جداً تعطي فصلاً غير كامل والسرعة البطيئة جداً تعطي زمن احتباس طويل وقمة منتشرة (Evans، 2002).

أجرى Ibrahim وزملاؤه (2009) دراسة حول تأثير تراكيز مختلفة من الكينيتين Kin (Kinetine) ونفتالين حمض الخل NAA (Niphtaline acitic acid) كمظمات نمو على تحفيز تشكل الكالوس وتمايز الأعضاء بزرع أجزاء نباتية مختلفة للبنج المصري *H. muticus*، ومحتواه القلويدي، وقد تبين أن وسط MS (Murashige و Skoog ، 1962) مضافاً إليه 2 مع.ل<sup>-1</sup> NAA و 0.5 مع.ل<sup>-1</sup> Kin كان الأفضل، حيث اختبر تشكل الكالوس وإنتاجه من قلويدات التربان باستعمال تراكيز مختلفة من السكرز Sucrose وحمض التربيك Tropic acid ومستخلص الخميرة Yeast extract، وبين تحليل HPLC أن تركيز الهيوسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine في الأوراق المسترجعة وكالوس الورقة كان 80% و 18% من تركيزه في النبات الأم.

كذلك استعملت تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC لتحديد محتوى مزارع الجذور الشعرية Hairy Root Culture لنبات البنج المصري *H. muticus* من قلويدات التربان TAs ومقارنتها مع الجذور البرية للنوع نفسه، وبعد زراعتها على وسط B5 السائل كان الوزن الجاف للجذور الشعرية أكبر بأربع مرات من الأخرى، أما بالنسبة للمحتوى القلويدي كان متشابهاً في كليهما، ولكن الكالوس الناتج عن مستنبات الجذور الشعرية تناقص محتواه من الهيوسيامين Hyoscyamine بشكل كبير، في حين ازداد تركيز السكوبولامين Scopolamine فيه ليبلغ 2.72 ملغ.غ<sup>-1</sup> (Zolala وزملاؤه، 2007).

وبدراسة قام بها Kursinszki وزملاؤه (2005) حول تركيز كل من الهيوسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine و 6 ب-هيدروكسي هيوسيامين 6-β Hydroxy Hyoscyamine في مزارع الجذور المحورة وراثياً للأتروبا *Atropa belladonna L* (Solanaceae) باستعمال HPLC وبعد تحضير العينات بالشكل المناسب وضبط pH العينات بشكل دقيق، بين التحليل الكروماتوغرافي أن تركيز الهيوسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine و 6 ب-هيدروكسي هيوسيامين 6-β Hydroxy Hyoscyamine كان 0.8 و 0.6 و 0.6 نانو غرام على التوالي.

كما قام Iranbakhsh وزملاؤه (2007) بدراسة حول تغير المحتوى القلويدي في مختلف أجزاء نبات الداتورة *Datura stramonium* وخلال مراحل النمو المختلفة، بينت نتائج التحليل باستعمال HPLC، GC-MS، TLC أن الإنتاج القلويدي يبدأ في نهاية الأسبوع الثاني بعد إنبات البذور، ويزداد في مرحلة النمو الخضري حتى نهاية الأسبوع العاشر من النمو ليتناقص فيما بعد، وأن الأوراق والثمار تحوي أكبر محتوى قلويدي في مرحلتي النمو الخضري والإثمار، لكن يتناقص تركيز القلويدات في الأوراق بسرعة خلال طور الإثمار.

#### 4.1.4. الزراعة النسيجية لنبات البنج *Hyoscyamus spp*:

تؤدي المنتجات الطبيعية دوراً مهماً في برامج تطوير الأدوية في مجال الصناعات الصيدلانية (Baharathi وزملاؤه، 2010)، حيث يبقى المنتج النباتي منافساً قوياً للمنتج المصنع كيميائياً لقدرته على إنتاج جزيئات ذات فعالية ونوعية مرتفعة (Sasson، 1991)، فقد أعطي حديثاً اهتماماً كبيراً للاستعمال العلاجي لأدوية مستخلصة من الأعشاب الطبية لعوامل الفعالية والأمان والاقتصادية، حيث ظلت النباتات الطبية لقرون السلاح الأول في العلاج، ولا زالت في الخط الأمامي لعلاج كثير من الأمراض، فضلاً عن ذلك فإن الحقيقة الملموسة وهي أن هناك صيغاً في الطبيعة لا يمكن إيجاد بدائل عنها بالطرائق الكيميائية، لذا كان لا بد من إيجاد نظم جديدة وبديلة عن الطرائق التقليدية تضمن التزويد المستمر بمختلف أنواع نواتج الاستقلاب الثانوية (قلويدات، جليكوزيدات، زيوت طيارة..... إلخ).

يعد مصطلح زراعة الأنسجة النباتية *Plant tissue culture* مصطلحاً شاملاً لوصف كل التقانات التي تتعلق بزراعة الخلايا والأنسجة والأعضاء والأجنة في أوساط مغذية اصطناعية معقمة، ومن ثم تحضير الجزء المزروع في ظروف متحكم بها من حيث درجة الحرارة و الضوء والرطوبة لكي يتطور باتجاه الهدف المطلوب (George وزملاؤه، 2008; Khatun وزملاؤه، 2003). وقد أسهمت تقانات الزراعة النسيجية في زيادة المعرفة لدى الباحثين حول العديد من المعلومات الأساسية المتعلقة بانقسام الخلايا واستطالتها وتميزها فضلاً عن تأثير العوامل الخارجية في الخلايا وانقسامها (George وزملاؤه، 2008).

لقد أصبحت تقنيات زراعة الأنسجة النباتية من الطرائق الحديثة والمهمة في مجالات عدة، وقد خرجت هذه التقنيات من دائرة البحوث إلى دائرة التطبيق العملي، كما خرجت من الحيز

الضيق إلى الأفق الأوسع وهو المجال التجاري، وفي وقتنا الحاضر تستعمل تقنيات الزراعة النسيجية بكثرة وبنجاح في مجالات شتى كإنتاج الأجنة والهجن الجسدية والنباتات الأحادية Haploid من المتك Anthers أو حبوب اللقاح Pollen grains، كما استعملت تقنيات زراعة الانسجة وأهمها مزارع الكالوس Callus cultures ومزارع المعلقات الخلوية Suspension cultures في الحصول على العديد من المركبات الكيميائية المهمة، لاسيما تلك التي تدخل في تركيب العديد من الأدوية، دون الحاجة إلى زراعة النبات بأكمله، وبذلك يمكن توفير مساحات الأراضي وكميات المياه اللازمة لزراعة النباتات المنتجة لهذه المركبات، كذلك توفير المجهود الزراعي والمجهود اللازم لاستخلاص هذه المواد من النبات الكامل، وبهذا يكون هذا الأسلوب أكثر نفعاً من الناحية الاقتصادية (Mirzaee وزملاؤه، 2016).

ولتخليق نواتج الاستقلاب الثانوية على المستوى التجاري بتقنيات زراعة الأنسجة والزرع الخلوي Cell culture، لا بد من التحدث عن نوعين من الاستراتيجيات الفنية: أولهما إيجاد نظام زراعة أنسجة يضمن تخليق المركبات المرغوبة، وبالتالي اختيار وانتخاب خطوط خلوية Cellular lines قادرة على الإنتاج بدرجة مرتفعة لهذه المركبات، والتقنية الثانية هي تصميم المفاعلات الحيوية Bioreactors التي تدعم القدرة الوراثية والكيميائية للخلايا لتزيد مقدرتها على الإنتاج بمستويات مرتفعة، وقد توافر في الوقت الحالي العديد من المعلومات الضرورية والأساسية التي أصبحت ميسرة في مجال الكيمياء الحيوية التي يمكن أن تستعمل كقاعدة في التصنيع الحيوي Biosynthesis للمركبات الثانوية (Sharafi وزملاؤه، 2013<sup>ab</sup> ; Mirzaee وزملاؤه، 2016).

يعد تخليق نواتج الاستقلاب الثانوية عن طريق الزراعة النسيجية أسلوباً بديلاً لأسلوب الزراعة التقليدي، ويوفر المصدر الصناعي لمختلف أنواع نواتج الاستقلاب الثانوية، التي من أهمها القلويدات Alkaloids، الفينولات Phenols، التربينات Terpenoids والفيتامينات Vitamins وغيرها من المركبات الضرورية في الاستعمال الطبي (Bhalsing و Maheshwari، 1998). ومن الجدير بالذكر أن إنتاج المواد الطبية والعقاقير وغيرها باستعمال زراعة الأنسجة يتأثر بعدة عوامل منها (Mantell و Smith، 1984):

- طبيعة الجزء المستخدم للزراعة Explant ومصدره، وتركيز المادة الفعالة فيه.

- مكونات الوسط المغذي المستخدم للزراع.
  - ظروف حفظ الزروع من إضاءة وتهوية وحرارة، التي تؤثر جميعها بشكل مباشر في نواتج الاستقلاب الأولية (Youssef وزملاؤه، 1998)، ومن ثم تؤثر في نواتج الاستقلاب الثانوية (Bhalsing و Maheswari، 1998).
  - كما أن من أهم العوامل المحددة لنواتج الاستقلاب الثانوية المهمة دوائياً في مزارع الأنسجة النباتية هو نوع وتركيز منظمات النمو المضافة إلى الوسط المغذي المستخدم، بشكل خاص الأوكسينات Auxines، والسيتوكينينات Cytokinines المؤثرة في نمو وسمات المزعة النسيجية، وفي تخليق نواتج الاستقلاب الثانوية (Shilpa وزملاؤه، 2010).
- بذلت العديد من الجهود من أجل تطوير طرائق عملية واقتصادية لإنتاج قلويدات التربان بواسطة تقانات زراعة الأنسجة النباتية (Bensaddek وزملاؤه، 2001; Rothe و Drager، 2002; Kursinszki وزملاؤه، 2005). فقد أشارت إحدى الدراسات إلى إمكانية عزل قلويدي السكوبولامين Scopolamine والهيوسيامين Hyoscyamine من أنسجة الكالوس والنباتات المسترجعة منه لنبات الداتورة (*D. innoxia*) المنتشر في البيئة العراقية (الملاح ويونس، 2001).
- كما درس Kinsara و El-Naser (1990) إمكانية إنتاج قلويدات التربان (TAs) باستعمال مزارع المعلقات الخلوية لنبات البنج الأبيض (*H. albus* L.) في ثلاثة أوساط مختلفة التركيب مع دراسة تأثير تركيز السكروز Sucrose ودرجة حموضة الوسط (pH)، وقد توصلوا إلى أن 2,4-D و 1% سكروز يعزز إنتاج قلويدات التربان (TAs) بتركيز 0.75% في المعلقات الخلوية بالمقارنة مع النبات الأم (0.352%)، لكن عند زيادة تركيز السكروز في وسط الزراعة يزداد معدل النمو حتى حد معين ويقابله انخفاض في المحتوى القلويدي. كما تحقق أعلى معدل نمو عند (pH=5) في حين تحقق أقصى إنتاج قلويدي عند (pH=3.5) وأدنى إنتاج قلويدي كان عند (pH=6).

وحول استرجاع نبات البنج المصري (*H. muticus*) من بروتوبلاست Protoplast الأوراق قام Wernicke وزملاؤه (1979) بزراعة مآبر النبات والحصول على نباتات أحادية الصيغة الصبغية Haploid وإكثار هذه النباتات بزراعة البراعم الإبطية مخبرياً *In Vitro*، حيث عزل

بعد ذلك بروتوبلاست الأوراق وزرعه على أوساط مغذية لتتشكل كتل خلوية صغيرة سرعان ما أنتجت نباتات كاملة، وقد أشارت نتائج هذه الدراسة إلى إمكانية اعتماد هذه التقنية في الدراسات المورفولوجية والتغيرات الوراثية ودراسات التصنيع الحيوي لنواتج الاستقلاب الثانوية.

قام Hashimoto وزملاؤه (1986) بتقدير النمو وإنتاج قلويدات التروبان (TAS) في مزارع مستنباتات الجذور الشعرية Hairy root culture ومزارع الكالوس لسبعة أنواع من جنس البنج *Hyoscyamus*، حيث كان نمو الجذور جيداً في أوساط الزراعة الخالية من منظمات النمو، وتراوح تركيز الهيوسيامين Hyoscyamine فيها من 0.04% إلى 1.1% من الوزن الجاف، في حين تراوح تركيز السكوبولامين Scopolamine من 0.06% إلى 0.3% من الوزن الجاف وذلك حسب نوع النبات. أما نمو الكالوس فقد كان بطيئاً ومحتواه من القلويدات أقل بكثير مما هو عليه في مزارع الجذور المرافق لكل نوع، كما كان الهيوسيامين Hyoscyamine القلويد الرئيس فيها.

وقام Saker وزملاؤه (1997) باستحداث مزارع نسيجية لكل من البنج المصري (*H. muticus*) والأثروبيا (*A. belladonna*) والداتورة (*D. stramonium*) بعد شهر من زراعة بذورها المعقمة، لدراسة العوامل المؤثرة في معدلات النمو الخضري للخلايا والإنتاج القلويدي، حيث زراعت على وسط MS المحتوي على أحد الذائبات العضوية التي تزيد من الجهد الحلولي Osmotic potential، مثل مركب المانيتول Mannitol بتركيز من 0.5 حتى 2.5%، كما دعم وسط MS بـ 3% سكروز Sucrose، 0.7% آغار Agar، 1 ملغ.ل<sup>-1</sup> (2,4-D) (2,4-)، ويمكن (DiChloro phynoxy Nephthalene acetic acid)، و 1 ملغ.ل<sup>-1</sup> كينيتين Kin، ويمكن تلخيص أهم النتائج المتحصل عليها بأن إضافة المانيتول Mannitol إلى البيئة قلل معدل النمو الخضري للنباتات باستثناء البنج المصري (*H. muticus*)، التي زادت معدلات النمو الخضري فيه عند مستوى 0.5% من المانيتول Mannitol، تلاها انخفاض قليل في معدل النمو عند تركيز 1%، في حين كانت معدلات النمو الخضري لكل من الأثروبيا *A. belladonna* والداتورة *D. stramonium* مرتفعة في حالة البيئة الخالية من المانيتول Mannitol فقط. وعند زيادة تركيز المانيتول Mannitol قابله نقص شديد في النمو، ويعزى ذلك إلى زيادة الضغط الأسموزي الناتج بتأثير هذا المركب العضوي، مسبباً إجهاداً حلوياً في البيئة الزراعية يتمثل بخفض الجهد المائي وتقليل فرق التدرج في الجهد المائي بين وسط النمو والخلايا النباتية، الأمر

الذي يؤثر سلباً في كمية الماء الممتص والعناصر المعدنية المغذية الداخلة مع تيار الماء، معيقاً بذلك انقسام الخلايا واستطالة الخلايا الجديدة، أو إلى زيادة طاقة التنفس بفعل الإجهاد الحلوي، مما يتسبب في زيادة المقاومة لهذا الضغط البيئي دون الاتجاه إلى الانقسام الخلوي وتراجع معدل النمو (الشحادة العودة وزملاؤه، 2016). أما بالنسبة للإنتاج القلويدي، فقد كان تركيز القلويدات في نبات البنج المصري (*H.muticus*) عند تركيز 0.5% مانيتول Mannitol قرابة 23.9 ملغ.غ<sup>-1</sup> من المادة جافة، والتي تفوقت بمقدار 1.75 مرة بالمقارنة مع الشاهد، إلا أن تركيز القلويدات في نبات الأتروبا *A. belladonna* والداتورة *D. stramonium* عند التركيز نفسه ازداد قليلاً وبفروقات غير معنوية بالمقارنة مع الشاهد. وعند زيادة تركيز المانيتول إلى 1% قلل هذا من إنتاجية نبات البنج المصري (*H.muticus*) من القلويدات، وتسبب بزيادة غير معنوية لها في كل من نبات الأتروبا *A. belladonna* والداتورة *D. stramonium*، كما وجد زيادة تركيز المانيتول إلى 2% أدت إلى الإرتفاع الحاد في تركيز القلويدات في كل من الأتروبا *A. belladonna* والداتورة *D. stramonium*، حيث تحقق أعظم إنتاج قلويدي (12.5 و 19.0 ملغ.غ<sup>-1</sup> من المادة الجافة) عند تركيز 2% (Saker وزملاؤه، 1997).

#### 1.4.1.4 مزارع الكالوس Callus Culture كوسيلة للحصول على قلويدات التروبان :Tropane Alkaloids

يعرف الكالوس Callus بأنه كتلة من الخلايا غير المتميزة التي لم تتكشف بعد والتي ليس لها شكل وظيفي معين، مختلفة القوام، يتدرج لونها من الأصفر الباهت إلى البني الداكن وتكون نسبة المادة الجافة فيها قليلة. ينشأ من منطقة الكامبيوم وقد تشارك خلايا القشرة والنخاع في تكوينه، وتتميز هذه الخلايا فيما بعد لتشكل جذراً أو ساقاً أو نباتاً كاملاً تبعاً لحالة التوازن الهرموني الموجود بالخلية (الرفاعي والشوبكي، 2002). ويعتمد نشوء الكالوس على مناطق القطع أو الجروح في الأجزاء النباتية (Hopkins، 1999). وأوضح محمد وعمر (1990) أن عملية استحداث الكالوس على الجزء النباتي المزروع Explant تمر بثلاث مراحل مهمة وهي التحفيز Induction والانقسام Division والتميز Differentiation. وتعد الأنسجة الفتية الأكثر احتمالاً لنشوء الكالوس، في حين أشار Ramawat (2004) أنه أمكن الحصول على الكالوس من أجزاء نباتية ذات خلايا عالية التخصص (متميزة) لا تتميز بنشاط مرستيمي.

وقد وجد أن تركيز ونوعية منظمات النمو والنسبة بينهما في وسط النمو هو العامل المحدد الرئيس لعملية استحداث أنسجة الكالوس من الأجزاء النباتية (Centeno وزملاؤه، 1996)، وعملية السيطرة على التمايز وتكشف الأعضاء من خلايا الكالوس (Evans، 1989؛ Torres، 1989)، وعملية إنتاج وتراكم نواتج الاستقلاب الثانوية في الخلايا المزروعة (Tang وزملاؤه، 1997؛ Nakazawa و Toda، 1995)، حيث يعد التوازن بين نسبة الأوكسين Auxin إلى السيتوكينين Cytokinin في البيئة المغذية، التي يطلق عليها مصطلح Auxin / Cytokinin ratio عامل محفز لتكوين نسيج الكالوس على الأجزاء النباتية المزروعة، فالأوكسين Auxin يعمل على استطالة الخلية Cell elongation من خلال تأثيره على مرونة الجدار الخلوي (Collett وزملاؤه، 2000؛ Lee وزملاؤه، 2000) بوساطة إزالة بكتات الكالسيوم والمواد المعدنية المسؤولة عن صلابة الجدار الخلوي، وتحلل بعض المواد العضوية كالسيللوز والهيميسيللوز بفعل تنشيط الأنزيمات المحللة لها، إضافة إلى دورها في زيادة سرعة نفاذية الأغشية الخلوية، ما يسهل مرور المواد العضوية والمعدنية إلى داخل الخلية مقللة بذلك من قيمة الجهد الحلوي Osmotic potential داخل الخلايا، فتسمح بانتقال الماء إليها ليزيد ضغط الامتلاء داخل الخلايا وتزداد معه استطالة هذه الخلايا (الشحاذة العودة وزملاؤه، 2016)، بينما تشجع السيتوكينينات Cytokinines الانقسام الخلوي والبناء الحيوي للـ RNA والبروتينات (Ammirato وزملاؤه، 1983) وتراكم نواتج الاستقلاب الثانوية ومنها المركبات القلويدية، وتنشيط بعض الأنزيمات مثل أنزيم PMT الأنزيم المفتاحي في مسار تخليق قلويدات التروبان Tropane alkaloids في جنس البنج *Hyoscyamus* (Sarah و Elizabet، 2009)، والأنزيمات المختزلة للنترات Nitrate reductase enzymes وأنزيم H6H المسؤول عن تحول قلويد الهيوسيامين Hyoscyamine إلى السكوبولامين Scopolamine (Scalla، 1991)، وبالتالي تسهم السيتوكينينات Cytokinines في تجميع المغذيات وزيادة العمليات البنائية داخل الخلية (مور، 1982). وبناء الجزيئات الكبيرة كالبروتينات والكربوهيدرات و DNA الخ...، التي تساعد على عملية الانقسام الخلوي Cell Division ثم التمدد الخلوي Cell Enlargement. لكن استعمال التراكيز المرتفعة من السيتوكينينات Cytokinines يثبط عمليات الانقسام الخلوي Cell Division من خلال تنشيط أنزيم الأنفرتيز Invertase activity في الخلايا الذي يحول

الليبيدات Lipids إلى سكريات مختزلة نشطة حلولياً تؤدي إلى زيادة امتصاص الخلايا للماء وتضخمها دون انقسامها (صالح، 1990).

وتشير الدراسات إلى أن للوسط المغذي تأثير كبير في نشوء الكالوس وإدامته اعتماداً على مكونات الوسط المغذي من جهة ونوع ومصدر الجزء النباتي من جهة أخرى (المختار، 2008؛ عطية وزملاؤه، 2002؛ بكر وزملاؤه، 2001؛ فهمي، 2003؛ يونس ومزاحم، 2001؛ Ajungla وزملاؤه، 2009)،

هذا وتسلك خلايا الكالوس سلوكاً مشابهاً لخلايا نبات الأصل في عمليات النمو وإنتاج المركبات الاستقلابية (Mary، 2005). وغالباً تكون عملية النمو في المزارع النسيجية مصحوبة بزيادة في الوزن والحجم، ومشتمة على ظهور تراكم ووظائف جديدة وفقدان البعض منها، ولا يوجد هناك اصطلاح قياسي وثابت على ظاهرة النمو لكنها واحدة من الخواص التي تشارك بها جميع الكائنات الحية، ويتأثر هذا النمو والتطور بطريقة أو بأخرى بالبيئة التي تؤدي في بعض الحالات دوراً مهماً في السيطرة على عمليات النمو (Chatfield وزملاؤه، 2000).

والنمو كما هو معروف عبارة عن بناء مواد جديدة عن طريق التفاعلات الأيضية المختلفة المزودة بالطاقة التي تستعمل في عمليات البناء، وذلك بأخذ الجزيئات الصغيرة كالماء و  $CO_2$  من البيئة المحيطة وبناء الجزيئات الكبيرة كالبروتينات والكربوهيدرات و DNA الخ...، والتي تساعد على عملية الانقسام الخلوي ثم التمدد الخلوي، أو إنتاج خلايا تتنوع بالشكل والوظيفة خلال عمليات التمايز (Differentiation) (صالح، 1990)، عموماً، فإن الأنسجة النباتية المزروعة خارج الجسم الحي تعتمد على الطاقة لاستكمال العمليات الاستقلابية المتسلسلة، ويتم الحصول على الطاقة من إضافة السكروز Sucrose إلى الوسط المغذي بنسب معينة (2-4%)، حيث يتم تحلله إلى مركبات أبسط، ويرافق ذلك تحرر المركبات الغنية بالطاقة ك ATP الذي يستخدمه الجزء المزروع في فعالياته الحيوية (محمد وعمر، 1990). أما Welandar (1975) فقد بين أن زيادة مستوى السكروز في الوسط المغذي المستخدم في زراعة الأنسجة النباتية يؤدي إلى قلة في محتوى الآزوت Nitrogen وبالتالي انخفاض معدل بناء البروتين، وذلك من خلال التوازن بين نسبة الكربوهيدرات والآزوت C/N التي تحافظ بالحالة الطبيعية على قيمة = 1.

ذكرت العديد من المصادر أنه ليس الهدف الوحيد من تكوين مزارع الكالوس هو تكوين النباتات منه، وإنما الاستفادة من هذه المزارع في الحصول على نواتج الاستقلاب الثانوية المختلفة، التي تضم المركبات الكيميائية المهمة صناعياً وطبياً. وقد اتجهت العديد من الدراسات إلى الاستفادة من مزارع الكالوس في الحصول على هذه المركبات نظراً لاحتوائه على هذه المواد، التي تتواجد أحياناً بكميات أكبر وبدرجة نقاوة مرتفعة أكبر مما يحتويه الجزء النباتي ذاته الذي اشتق منه الكالوس (محمد وعمر، 1990). وبالرغم من الحصول على العديد من هذه المواد لكن لا تزال هذه النواتج ذات قيمة تجارية محدودة أحياناً (Dixon، 1985). ويبين الجدول (5) أهم نواتج الاستقلاب الثانوية المنتجة بواسطة مزارع الكالوس.

الجدول رقم (5): أهم نواتج الاستقلاب الثانوية المنتجة في مزارع الكالوس

| Plant name                                 | Active ingredient              | Reference                    |
|--------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <i>Agave amanuensis</i>                    | Saponins                       | (Andrijany وزملاؤه، 1999)    |
| <i>Allium sativum L</i>                    | Alliin                         | (David و Malpathak، 1986)    |
| <i>Ambrosia tenuifolia</i>                 | Altamisine                     | (Trippi و Goleniowski، 1999) |
| <i>Bupleurum falcatum</i>                  | Saikosaponins                  | (Huang و Wang، 1982)         |
| <i>Canavalia ensiformis</i>                | L-Canavanine                   | (Ramirez وزملاؤه، 1992)      |
| <i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>      | Pyrethrins                     | (Rajasekaran وزملاؤه، 1991)  |
| <i>Citrus sp.</i>                          | Naringin, Limonin              | (Barthe وزملاؤه، 1987)       |
| <i>Coffea arabica L.</i>                   | Caffeine                       | (Waller وزملاؤه، 1983)       |
| <i>Corydalis ophiocarpa</i>                | Isoquinoline alkaloids         | (Takao و Iwasa، 1982)        |
| <i>Croton sublyratus Kurz</i>              | Plaunotol                      | (Murai و Morimoto، 1989)     |
| <i>Duboisia leichhardtii</i>               | Tropane alkaloids              | (Endo و Yamada، 1984)        |
| <i>Eriobotrya japonica</i>                 | Triterpenes                    | (Taniguchi وزملاؤه، 2002)    |
| <i>Eucalyptus tereticornis SM</i>          | Sterols and Phenolic compounds | (Venkateswara وزملاؤه، 1986) |
| <i>Gentiana sp.</i>                        | Secoiridoid glucosides         | (Skrzypczak وزملاؤه، 1993)   |
| <i>Glycyrrhiza echinata</i>                | Flavanoids                     | (Ayabe وزملاؤه، 1986)        |
| <i>Glycyrrhiza glabra var. landulifera</i> | Triterpenes                    | (Ayabe وزملاؤه، 1990)        |
| <i>Hyoscyamus niger</i>                    | Tropane alkaloids              | (Hashimoto و Yamada، 1982)   |

|                              |                                         |                              |
|------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|
| <i>Mucuna pruriens</i>       | L-DOPA                                  | (1976 ،Brain)                |
| <i>Nandina domestica</i>     | Alkaloids                               | (1988 ،Itokawa و Ikuta)      |
| <i>Nicotiana rustica</i>     | Alkaloids                               | (1976 ،Hiraoka و Tabata)     |
| <i>Nothapodytes foetida</i>  | Camptothecin                            | (2003 وZملاؤه، Thengane)     |
| <i>Ophiorrhiza pumila</i>    | Camptothecin related alkaloids          | (1998 وZملاؤه، Kitajima)     |
| <i>Panax ginseng</i>         | Saponins and apogenins                  | (1973 وZملاؤه، Furuya)       |
| <i>Papaver bracteatum</i>    | Thebaine                                | (1986 وZملاؤه، Day)          |
| <i>Papaver somniferum L</i>  | Alkaloids                               | (1972 وZملاؤه، Furuya)       |
| <i>Polygala amarella</i>     | Saponins                                | (1999 وZملاؤه، Desbene)      |
| <i>Portulaca grandiflora</i> | Betacyanin                              | (1984 ،Bohm و Schroder)      |
| <i>Salvia fruticosa</i>      | Rosmarinic acid                         | (2003 وZملاؤه، Karam)        |
| <i>Salvia miltiorrhiza</i>   | Lithospermic acid B and Rosmarinic acid | (1994 وZملاؤه، Morimoto)     |
| <i>Sapium sebiferum</i>      | Tannin                                  | (1992 ،Ishimaru و Neera)     |
| <i>Scopolia parviflora</i>   | Alkaloids                               | (1972 وZملاؤه، Tabata)       |
| <i>Scutellaria columnae</i>  | Phenolics                               | (1999 ،Kisiel و Stojakowska) |

لكن من المعلوم أن نواتج الاستقلاب الثانوية تتراكم بكميات قليلة نسبياً في معظم مزارع الكالوس بالمقارنة مع النبات الأم، ويعزى ذلك إلى فقدان عملية الكشف المورفولوجي وتكون الأعضاء في الأنسجة غير المتكشفة في هذه المزارع، وبالتالي عدم قدرة الخلايا غير المتميزة على إدخال نواتج الاستقلاب الأولية في عملية تخليق نواتج الاستقلاب الثانوية، بالإضافة لحدوث بعض الظواهر الفيزيولوجية ومنها كبح نشاط أو غياب الأنزيمات اللازمة لتخليق وتكوين هذه المركبات الثانوية (Robins وZملاؤه، 1991؛ Ford وZملاؤه، 1996؛ Ophic وZملاؤه، 2004).

تعد عملية تراكم المنتجات الثانوية في أي مرحلة من مراحل نمو الخلايا عبارة عن مقياس التوازن بين عملية إنتاج وتخليق المركبات الثانوية وعملية هدمها، وبما أنه يوجد العديد من مسارات التخليق الحيوي، فإنه لا يوجد وقت محدد في دورة حياة الخلية للحصول على أعلى معدل من المركبات الثانوية، ففي المزارع الخلوية لنبات التبغ (*Nicotiana tobacco*) تتراكم

معظم المركبات الثانوية في المراحل النهائية من النمو، وفي مزارع الكاثرانثوس *Cathranthus* يحدث التراكم في مرحلة الطور الأسّي لنمو الخلايا. ونظراً لانخفاض المحتوى من نواتج الاستقلاب الثانوية في المزارع الخلوية، تم خلال العقود الماضية اعتماد استراتيجيات مختلفة لتعزيز إنتاج هذه المزارع من نواتج الاستقلاب الثانوية Secondary Metabolism Products (Srivastava و Srivastava، 2007؛ Zhang و زملاؤه، 2005). فعلى الرغم من أن مورثات النبات هي التي تسيطر على التخليق الحيوي للقلويدات، إلا أن بعض العوامل البيئية والتقنية يمكن أن تعزز أو تمنع إنتاج هذه القلويدات (Ghorbanpour و زملاؤه، 2013). وتعد التغذية المعدنية إحدى أهم هذه العوامل البيئية المؤثرة في تركيز هذه القلويدات (Al-Humaid، 2004)، حيث يعد الوسط الذي ينمو عليه الجزء النباتي بما يحتويه من عناصر كبرى Macro nutrients وعناصر صغرى Micro nutrients من أحد العوامل الأساسية المؤثرة في نمو وإكثار واستجابة الأجزاء النباتية المزروعة، وذلك لكونه المصدر الذي يوفر كل العناصر المغذية اللازمة لنمو وتطور المستأصل النباتي Explant واستمراره في النمو، إذ أن المستأصل النباتي المزروع ليس له القدرة على تصنيع الغذاء بنفسه، فعليه أن يعتمد في غذائه على مكونات الوسط المغذي (محمد وعمر، 1990؛ Mulabagal و Tsay، 2004).

فعلى سبيل المثال، ذكر أن شوارد معادن كل من الحديد  $Fe^{++}$  والزنك  $Zn^{++}$  والنحاس  $Cu^{++}$  والكوبالت  $Co^{++}$  والنيكل  $Ni^{++}$  لها دور مؤثر في تراكم نواتج الاستقلاب الثانوية، من خلال امتلاكها لتكافؤات متعددة وبالتالي تأثيرها في أنزيمات الأكسدة والإرجاع ومن ثم في تخليق نواتج الاستقلاب (Trejo و زملاؤه، 2001)، وعلى الرغم من أن هذه الشوارد المعدنية تصنف كعناصر صغرى إلا أنها تؤدي دوراً مهماً في أنشطة البروتينات المشاركة في الحفاظ على نمو النباتات، وبالمقابل وجودها بتركيز مرتفعة ضار للنبات (Viehweger، 2014) كما وتعد شوارد النيكل  $Ni^{++}$  والكوبالت  $Co^{++}$  والزنك  $Zn^{++}$  والمنغنيز  $Mn^{++}$  ضرورية لتنظيم النشاط الأنزيمي على الرغم من سميتها الكبيرة بالتركيز المرتفعة (Ovečka و Takač، 2014). كما وجد أن إضافة السكروز وشوارد الكبريتات  $SO_4^{--}$  والنترات  $NO_3^-$  والنحاس  $Cu^{++}$  إلى الوسط المغذي بتركيز مرتفعة عن المعدل تؤثر في إنتاج وتمثيل مركب Shikonine في نبات ليثوسبيرميوم *Lithospermum erythrorhizon*، أما التركيز المنخفض من السكروز يؤدي إلى زيادة إنتاج مركب Ubiquinone-10 (Coenzyme Q10) في خلايا نبات التبغ (N.

(*tobacco*) كذلك يؤثر وجود أو غياب الفوسفات في الوسط المغذي بشدة في عملية إنتاج وتراكم نواتج الاستقلاب الثانوية، فقد زاد تراكم مركب Anthraquinone بنسبة 50% في مزارع خلايا نبات الموريندا سيتريفوليا (*Morinda citrifolia*) (الفصيلة Rubiaceae) عند إضافة الفوسفات بتركيز 5 غ.ل<sup>-1</sup> (Zenk وزملاؤه، 1975)، في حين كان تراكم قلويدات الإندول Indole Alkaloid أعلى بغياب الفوسفات في مزارع الكثرانثوس *Cathranthus roseus* (Knobloch و Berlin، 1987).

أشارت الدراسات إلى تأثير منظمات النمو المضافة إلى الوسط المغذي في تنظيم عمليات بناء وتراكم نواتج الاستقلاب الثانوية، حيث يعزى هذا التأثير إلى دور منظمات النمو في تحفيز نمو النبات، ما يترتب عنه زيادة البناء الحيوي لهذه المركبات (Ortuno وزملاؤه، 1999)، ويعزى ذلك إلى عمر المزرعة، وهذا ما أكدته دراسة أخرى حيث يعتمد تراكم المنتجات أو المستقلبات الثانوية على المرحلة العمرية من عمر المزرعة، إذ من المحتمل وجود نشاط بعض الأنزيمات التي تعمل على تمثيل نواتج الاستقلاب الثانوية (Lawson و Wang، 2005). فقد بين Al-Hashimi (1999) دور عمر المزرعة النسيجية في زيادة تركيز قلويدات التروبان Tropane alkaloids المنتجة من مزارع مستنبتات الجذور الشعرية لنبات الداتورة سترامونيوم *D.stramonium*، حيث جففت مستنبتات الجذور الشعرية مدة 48 ساعة بدرجة حرارة 40 درجة مئوية، وطحنت واستخلصت بالهكسان كمذيب عضوي للتخلص من المركبات الدهنية، وقد بيّنت نتائج التحليل الكروماتوغرافي ازدياد تركيز القلويدات مع تقدم المزرعة النسيجية بالعمر، الشكل رقم (5).



الشكل رقم (5): تركيز قلويدات التروبان حسب عمر المزرعة النسيجية لنبات الداتورة *D.stramonium*

قام Al-Ammouri و Besher (2013) بدراسة حول استحداث كالوس البنج الذهبي *H. aureus* وذلك بزراعة سويقات وأوراق النبات على وسط MS المدعم بتركيز مختلفة من منظمات النمو وتحضين الزروعات في الظلام على درجة حرارة  $26 \pm 1$ ، وبعد أربعة أسابيع أخذت قراءات النمو على الكالوس المتشكل، حيث بينت النتائج أنّ السويقات كانت الأفضل بالمقارنة مع الأوراق في مواصفات الكالوس الناتج، وأن بعض الأوساط المستعملة في الزراعة كان مناسباً لنمو مستنباتات الجذور الشعرية وبعضها الآخر مناسباً لاسترجاع Regeneration النبات من خلايا الكالوس، في حين لم يكن بعضها مناسباً لنمو الكالوس حيث أعطت كالوس بني مسود اللون ذو قوام رخو وصغير الحجم، أما البعض الآخر فقد كان مناسباً لنمو الكالوس وتطوره، حيث أعطت كالوس كبير الحجم، أصفر اللون، متماسك القوام وذو شكل حبيبي، بالإضافة إلى محتواه الجيد من قلويدات التربان 0.686% هيوسيومين و 0.059% سكوبولامين.

كما تم استحداث كالوس نبات البنج الأسود (*H. niger*) وذلك بزرع قطع صغيرة من أوراق النبات على وسط MS المدعم بـ 0.5 ملغ.ل<sup>-1</sup> BA (بنزيل أدنين Benzyl Adenine) و 0 أو 1 أو 2 ملغ.ل<sup>-1</sup> NAA (نفتالين حمض الخل Naphthalene Acetic Acid)، وحضنت نصف الزروعات في ظروف نظام الإضاءة التعاقبي 8/16، في حين حضن النصف الباقي في ظروف الظلام الكامل، وكانت درجة حرارة التحضين لكل الزروعات  $25 \pm 1$  درجة مئوية. تم قياس الوزن الرطب والجاف بعد ستة أسابيع من بدء تشكل الكالوس، كما تم التحليل الكروماتوغرافي باستعمال HPLC لتحديد تركيز كل من الهيوسيومين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine، بينت النتائج أن أعلى قيمة للوزن الرطب والجاف بلغت 112 و 89.6 غ على الوسط الحاوي 0.5 ملغ.ل<sup>-1</sup> (BA) مع 2 ملغ.ل<sup>-1</sup> (NAA) والنامي في ظروف الظلام كون أوج نشاط الأوكسين يكون في الظلام، كما أن إضافة 50 أو 100 ملغ.ل<sup>-1</sup> الحمض الأميني برولين Proline زاد تركيز الهيوسيومين Hyoscyamine إلى 58.03 و 21.37% على التوالي بالمقارنة مع الشاهد، أما السكوبولامين Scopolamine فقد زاد إلى 129.03 و 166.94 و 205.51 و 149.2% بعد إضافة 50 غ.ل<sup>-1</sup> سكروز و 200 ملغ.ل<sup>-1</sup> كلوريد الصوديوم NaCl و 50 أو 100 ملغ.ل<sup>-1</sup> برولين Proline بالمقارنة مع الشاهد (Aljibouri وزملاؤه، 2012).

قام Zayed وزملاؤه (2006) بدراسة تشكل الأعضاء وتراكم قلويدات التروبان TAS في مزارع الكالوس Callus Cultures لنبات الداتورة (*D. innoxia*) حيث تم استحداث الكالوس من سويقات النباتات النامية في الزجاج على وسط MS المضاف إليه 0.1 ملغ.ل<sup>-1</sup> BA و 0.5 ملغ.ل<sup>-1</sup> IAA، وقد بدأ تمايز الكالوس بإعادة زراعته على وسط MS الصلب والخالى من الهرمون لفترة تزيد عن عشرة أسابيع، حيث تشكلت النموات الخضرية في البداية بعد إعادة الزرع بأربعة أسابيع تلاها ظهور الجذور بعد ستة أسابيع، وبالنسبة للمحتوى القلويدي فقد أنتج الكالوس كمية قليلة من القلويدات، كما احتوت النموات الخضرية الناتجة عن تمايز الكالوس السكوبولامين Scopolamine بشكل أساسي، في حين صنّعت الجذور الناتجة عن التمايز الهيوسيامين Hyoscyamine كقلويد رئيس.

وفي دراسة للحاتمي (2010) حول محتوى بذور وأوراق نوعي الداتورة *D. metel* و *D. innoxia* من قلويدات التروبان (TAS)، وفي أنسجة الكالوس المستحدثة من الأوراق باستعمال وسط MS المدعم بـ 1 ملغ.ل<sup>-1</sup> BA و 2,4-D لكل منهما، أشار إلى زيادة معنوية في محتوى أنسجة الكالوس من قلويدات الهيوسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine بالمقارنة مع محتواها في الأوراق والبذور النامية في الظروف الطبيعية، مع تفوق النوع *D. innoxia* بمحتواه من قلويدات التروبان بالمقارنة مع النوع (*D. metel*). كذلك وجدت Natasha وزملاؤها (1993) أن زراعة جذور الـ *D. innoxia* في وسط MS المدعم بالجبريلين GA<sub>3</sub> (Gebrelic Acid) مع الأوكسين IAA ثبط إنتاج قلويدات الهيوسيامين Hyoscyamine والهيوسين Hyoscine، وأن كميتها كانت أكبر في الوسط المغذي المدعم بتركيز أقل من IAA، أي أنه كلما انخفض تركيز الأوكسين في وسط النمو ازداد إنتاج وتجميع المركبات القلويدية في الجذور المزروعة، ويفسر ذلك بأن تركيز الأوكسين المنشط لنمو المجموع الخضري يعد مثبطاً لنمو المجموع الجذري.

كما توجد فائدة أخرى لاستعمال مزارع الكالوس أنها مصدرٌ للاختلافات الوراثية الصبغية التي تزيد بزيادة عمر مزرعة الكالوس، بالإضافة إلى أنها تسمح بالحصول على نباتات خالية من الفيروسات واستخلاص بعض المواد الخاصة بصناعة الأدوية والصناعات الغذائية، بالإضافة إلى

إمكانية انتخاب نباتات متحملة للإجهادات اللاإحيائية Abiotic stresses بتعرض الكالوس إلى العوامل المجهددة المختلفة.

#### 5.1.4. الدراسة الجزيئية Molecular study:

يعد استحداث الكالوس خطوة مهمة في إحداث التغيرات الوراثية التي تعد ضرورية في برامج التربية، إضافة إلى دوره في سهولة إنتاج عدد كبير من النبيتات المخبرية (Haque وزملاؤه، 2009)، ومصطلح التباينات الجسمية Somaclonal Variation استخدم كمؤشر للدلالة على التغيرات التي تحدث في النباتات المتجددة من زراعة الأنسجة والخلايا النباتية، ومن المعروف أن هذه التغيرات تحدث بكثرة عند عزل البروتوبلاست وزراعة الكالوس (Nistor وزملاؤه، 2009)، تصف التغيرات الجسمية Somaclonal Variation التغيرات الوراثية وغير الوراثية التي تحدث في النباتات (اختلاف السمات الفيزيولوجية والكيميائية والوراثية بين الخلايا النامية مخبرياً)، ومن الممكن ظهورها إما خلال أو بعد الزراعة المخبرية لخلايا وأعضاء النبات، أو الكالوس (Kaeppler وزملاؤه، 2000). يطلق على هذه السلالات الناتجة من المزارع الخلوية ذات التراكيب الوراثية الجديدة بسلالات الكالوس Calliclones، لأنها ناتجة عن تمايز الكالوس تحت ظروف الزراعة المخبرية. وقد تم تعريف هذه السلالات باسم السلالات الكالوسية (الخلوية) (Skirvin و Janick، 1976). كما وجد أن التباينات الوراثية الناتجة عن زراعة الكالوس (معدل الطفرات) تكون أكبر بمعدل 30% بالمقارنة مع الطفرات الطبيعية تحت الظروف الخارجية التي لا تتجاوز 0.00001 % (Smith وزملاؤه، 1993). وقد أظهرت نتائج الكثير من الباحثين أن الاختلافات الوراثية التي تحدث في خلايا الكالوس تكون على الصبغيات Chromosomes قد تنتج عن تباينات شبه وراثية Epigenetic وهي تغيرات في تعبير المورثات أكثر منها تغيرات في محتوى المعلومات الوراثية بسبب مثيلة الـ DNA أو تضاعف المورثات Gene Amplification، كما قد تنشأ عن حالات العبور الخيطي Mitotic Crossing Over، أو تغيرات في أعداد الصبغيات سواء كانت تامة (Polyploidy) أو ناقصة (Aneuploidy)، أو في تركيب الصبغيات مثل حدوث نقص أو تكرار أو انقلاب النيوكليوتيدات المكونة للمورثات المحمولة على الصبغيات (Marthur و Kumar، 2004).

هذا وتعد دراسة التباينات الوراثية ضمن الأنواع النباتية هدفاً أساسياً للمحافظة عليها من التدهور والإستفادة من مخزونها الوراثي (Arafeh وزملاؤه، 2002)، حيث تعد المعلومات الجزيئية أدوات مفيدة للمحافظة على المصادر الوراثية للنبات واستعمالها، وللكشف عن المورثات المسؤولة عن الصفات ذات الأهمية الإقتصادية والطبية، وكذلك تقييم التنوع في المجتمعات النباتية المتوفرة، إذ يستند عمل هذه المعلومات على معلومات مأخوذة من جزيئة الـ DNA ويمكن الاستدلال بها على موقع معين على الصبغي أو الجينوم، وتستعمل لدراسة العلاقات الوراثية بين الأفراد وإيجاد البصمة الوراثية لكونها تعكس الاختلافات في المعلومات الوراثية المخزونة فيهم، وهذه الاختلافات تكون ناتجة إما من الحذف Deletion أو الإدخال Insertion أو إعادة الترتيب Rearrangement للنوكليوتيدات في مجين الأفراد المدروسة لأي سبب كان كالتغيرات الوراثية، لذلك اعتمدت في دراسات التصنيف الجزيئي Molecular Taxonomy وفي بناء الخرائط الوراثية Genetic Mapping والدراسات التطورية Evolutionary Studies، كما أصبحت من الأدوات المهمة لدراسة التنوع الوراثي Genetic Diversity إذ تعد الاختيار الذي لا بديل له في تطوير الخطط الملائمة لحفظ الأنواع، وبما أن هذه المؤشرات تعكس الاختلافات مباشرة على مستوى القواعد المكونة للـ DNA، ونظراً لأن مجين الكائنات الحية الراقية يحتوي على الملايين من هذه القواعد، لذلك فإن أعداد هذه المؤشرات كبيرة جداً وبالتالي فإن لها القدرة على الكشف عن مئات المواقع (loci) ولعدة قرائن للموقع الواحد (سيد، 2001).

تمتاز المؤشرات الجزيئية بقدرتها على إظهار التغيرات الذي يحدث على مستوى DNA مباشرة، و كما هو معروف فإن DNA هو المادة الوراثية المستقرة التي لا تتأثر بالبيئة، لذا امتازت هذه المؤشرات بالاستقرارية Stability، وكذلك امتازت بكونها تعتمد على مادة DNA الموجودة في جميع خلايا الكائن وبشكل متساو، لذا فإن تحليل أي جزء من ذلك الكائن وفي أي مرحلة عمرية سوف يعكس بالنتيجة حالة الكائن الوراثية وعلى نحو دقيق، مما منح هذا النوع من المؤشرات الشمولية وجعلها تتفوق على المؤشرات المعتمدة على تحليل المحتوى البروتيني لذلك الكائن أو حتى على ما تمثله هذه البروتينات من متناظرات إنزيمية، ومن المميزات الأخرى لمؤشرات الـ DNA هي قدرتها على كشف أعداد كبيرة من التباينات Numerous، مما يجعلها قادرة على إيجاد أي اختلاف مهما كان طفيفاً وبين أقرب الأفراد Polymorphic، فضلاً عن قدرتها على تتبع التغيرات

الوراثية عبر الأجيال كونها تستند إلى قوانين ماندل في التوارث، كما تبرز أهمية مؤشرات DNA من خلال تطبيقاتها الواسعة وفي شتى المجالات، أهمها تحديد البصمة الوراثية DNA Fingerprinting لسلاسل الأصناف وتحديد القرابة بينها (Ayad وزملاؤه، 1997).

ومن الجوانب العلمية والتطبيقية في مجال إيجاد البصمة الوراثية هو تطوير العديد من مؤشرات DNA لاستعمالها في التحقق والتأكد من الثبات الوراثي للنباتات الناتجة من الزراعة النسيجية.

فتح التقدم السريع في مجال التقانات الحيوية مجالات كثيرة لدراسة التباينات الوراثية وللتمييز بين الأنواع القريبة من بعضها البعض وراثياً، وقد تم وصف تفاعل بوليميراز التسلسلي Polymerase Chain Reaction (PCR) لأول مرة من قبل الباحث Mullis عام 1985 (Mullis، 1990) على أساس عمل هذه التقنية هو تضخيم قطعة معينة من الـ DNA المنتجة من الجينوم الكلي أنزيمياً وخارج الجسم الحي *In Vitro* بوجود مرئسات ترتبط بالتتابع المكمل لها على الشريط القالب Template DNA. وتعد هذه التقنية محاكاة لما يحدث في الطبيعة في جميع الكائنات الحية والتي تتضاعف مادتها الوراثية أثناء الإنقسام، فالتفاعل بسيط ومحتوياته موجودة منذ قدم الحياة قبل أن ينفذها Mullis، وقد أحدث هذا الاكتشاف ثورة في علم الحيوية الجزيئية تضاهي تلك الثورة التي أحدثها اكتشاف التركيب المزدوج للـ DNA من قبل Crick و Watson (1953)، وعلى الرغم من عدم اهتمام الكثيرين به في البداية لكن اليوم يعد تفاعل PCR التقنية الأكثر رواجاً في مختبرات الوراثة الجزيئية في جميع أنحاء العالم، والأساس الذي تعتمد عليه الكثير من الدراسات على مستوى DNA (Graham و Newton، 1994).

يتم تفاعل PCR بوجود مركبات أساسية هي كلوريد المغنيزيوم  $MgCl_2$  والنكليوتيدات ثلاثية الفوسفات Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs) وأنزيم Taq- polymerase ويتم تضخيم DNA في جهاز المدور الحراري عبر عدد من الدورات يصل عددها إلى 40 دورة مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من DNA التي تتضاعف أسياً. وقد أدى تطور التقنيات الحيوية الجزيئية إلى ظهور عدد كبير من المؤشرات الجزيئية المهمة التي تسمح بتوصيف الكائنات الحية والتمييز بين الوحدات التصنيفية الصغيرة.

#### 1.5.1.4. تقنية التكرارات البسيطة الترادفية البينية (ISSR Inter Simple Sequence Repeats):

تعد تقنية التكرارات البسيطة الترادفية البينية ISSR واحدة من التقنيات المهمة المعتمدة على تفاعل بوليميراز التسلسلي PCR، والتي تعتمد على تضخيم المواقع (100-3000 bp) بين التتابع الدقيقة المتقاربة والمتوضعة بشكل متعاكس (Ziekiewicz وزملاؤه، 1994) باستعمال مرئسات وحيدة طولها (16-18 bp) ومؤلفة من نكليوتيدات متكررة، ومحاطة في معظم الأحيان بـ 2-4 نكليوتيدات إما في النهاية 5' أو 3' (Bronet وزملاؤه، 2002; Nagaraju وزملاؤه، 2002). وعادة ما يضخم ISSR 25-50 منتجاً في التفاعل الواحد. وتوصف تقنية ISSR بأنها أكثر تكرارية من تقنية RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) بسبب طول المرئسة المستعملة والتي تعكس درجة حرارة مرتفعة لمرحلة تشفع المرئسات (Chowdhury وزملاؤه، 2002; Borner و Branchard، 2001).

إن الفائدة الرئيسة لهذه التقنية هي أنها لا تتطلب وقتاً طويلاً لبناء المكتبة الوراثية، وعلى الرغم من حقيقة كونها تورث كمؤشرات سائدة وغير سائدة، إلا أنها ذات طبيعة عشوائية، فهي مناسبة بشكل خاص لدراسات القرابة الوراثية، التنوع الوراثي وتحديد الأصناف (Ziekiewicz وزملاؤه، 1994; Fang و Roose، 1997; Wolfe وزملاؤه، 1998; Blair وزملاؤه، 1999; Jain وزملاؤه، 1999; Cavan وزملاؤه، 2000; Raina وزملاؤه، 2001; Korbin وزملاؤه، 2002; Nagaraju وزملاؤه، 2002).

ولكون مؤشرات ISSR غزيرة فإنها تعطي عدداً كبيراً من الحزم، ومستوى التعددية الشكلية متوسط إلى عالي والقدرة على التضخيم متوسطة إلى مرتفعة، والتكاليف منخفضة كما أن جهد تنفيذها منخفض.

استعملت Nejadhabibvash وزملاؤه (2012) تقنية ISSR لدراسة التنوع الوراثي بين 24 طراز وراثي لنبات البنج *Hyoscyamus* تعود للأنواع: *H. kurdicus*، *H. arachoides*، *H. pusillus*، *H. reticulatus*، *H. niger* باستعمال 19 مرئسة من مرئسات ISSR، حيث بين التحليل العنقودي توزيع الطرز المدروسة في عنقودين رئيسيين، وقد تراوحت درجة التشابه الوراثي بين الطرز من 0.09 حتى 0.53. كما قامت بشر وزملاؤه (2014) بدراسة التباينات الوراثية بين عدة طرز بيئية لنبات البنج الذهبي *H. aureus* المنتشرة في المنطقة

الجنوبية من سورية باستعمال 18 مرئية ISSR، أثبتت 11 مرئية منها فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الطرز المدروسة، حيث نتج عن استعمال هذه المرئيات (56) حزمة، منها (49) حزمة ذات تعددية شكلية Polymorphic بنسبة 87.5%، أما نتائج التحليل العنقودي بينت توزع الطرز في عنقودين رئيسيين حسب مناطق انتشارها الجغرافية.

وفي دراسة لتقييم التباينات الجسمية Somaclonal Variation بين مزارع الكالوس Callus Cultures لنبات البنج الذهبي *H. aureus* مقارنة بالنبات الأم والنبات النامي في الزجاج، تم تطبيق تقنية ISSR باستعمال 20 مرئية، بينت نتائج الدراسة أن 19 مرئية من المرئيات المستعملة أعطت 254 حزمة بمتوسط 15.86 لكل مرئية، في حين أعطت 11 مرئية تعددية شكلية وأنتجت 164 حزمة بنسبة 53%، أما نتائج التحليل العنقودي فقد بينت الثباتية الوراثية للنبات النامي في الزجاج مقارنة مع النبات الأم حيث توضع على مسافة 0، في حين انفصلت مزارع الكالوس Callus Cultures بعنقود آخر على مسافة قدرها 0.348 عن النبات الأم، مما يدل على وجود تباين وراثي يعزى بشكل رئيسي إلى دور منظمات النمو المستعملة في الزراعة (Besher وزملاؤه، 2014). مما يثبت أن تقنية ISSR أداة فعالة في كشف التباينات الوراثية بين الطرز والأنواع النباتية التابعة لنفس الجنس من جهة، وبين المزارع الخلوية والنباتات النامية مخبرياً والنباتات النامية في بيئاتها الطبيعية من جهة أخرى.

كذلك استعملت تقنية ISSR لتحديد درجة القرابة الوراثية بين ثلاثة طرز وراثية من البنج المصري *H. muticus* جمعت من ثلاث مناطق (المغارة ووادي سدر وشالتين) في مصر باستعمال خمس مرئيات، أعطت المرئيات المختبرة 41 حزمة منها 15 حزمة ذات تعددية شكلية (36.59%)، وبينت نتائج التحليل العنقودي توضع الطرازين الوراثيين من المغارة وشالتين في عنقود واحد بينما توضع الطراز من وادي سدر بشكل منفرد (El-Shawaf وزملاؤه، 2003).

#### 6.1.4. دراسة التعبير المورثي Gene expression:

يؤدي تغير الظروف البيئية إلى حدوث تغيير في تعبير المورثات المرتبطة بتنظيم دورة الخلية، ونسخ العديد من المورثات وتفعيل مسارات عديدة للإشارات الخلوية التي تحت عدة أنظمة في الخلية (Neill وزملاؤه، 2002). لكن ظهور علم المورثات والتقنيات المتصلة به وفر الأدوات

اللازمة لتحديد المورثات الرئيسية التي تستجيب للتغيرات المختلفة، وتوضيح الأحداث المتعلقة بتنظيم عمل هذه المورثات (Bruce وزملاؤه، 2002). ويعد أحد أساليب الفحص لدراسة الاختلافات على مستوى الحمض النووي المكمل (cDNA) الناتجة عن RNA الرسول (mRNA) المعزول من العينات الخاضعة لظروف تجريبية، وذلك باستعمال تقانة Real Time PCR (Bustin، 2000؛ Bago وزملاؤه، 2002؛ Wurmbach وزملاؤه، 2003؛ Montrichard وزملاؤه، 2003؛ Shimada وزملاؤه، 2003).

أصبح التتميط التعبيري للمورثات أداة مهمة للتحقيق في كيفية استجابة كائن حي نحو تغير ما، وبالتالي كيف يمكن لهذه التغيرات المورثية النسخية أن تؤدي دوراً في الاستجابة نحو هذا التغير (Taji وزملاؤه، 2004). ويعتقد أن الآلية الدقيقة التي يستعملها النبات خلال تغير أحد شروط النمو إما أن تكون على مستوى تغيير في تعبير المورثات، أو مسالك متداخلة بين تعبير المورثات والأنزيمات الوظيفية (Scandalios، 1997). حيث يتم خلال عملية الاستجابة هذه تحريض عدد كبير من المورثات، وهذه المورثات يتم تصنيفها إلى مجموعتين رئيسيتين وذلك حسب طبيعة وظيفتها المفترضة :

**المجموعة الأولى:** تضم المورثات التي ترمز البروتينات البنائية، والتي تعمل في حالات الاستجابة للتغيرات المختلفة (Wang وزملاؤه، 2006).

**المجموعة الثانية:** تضم المورثات التي ترمز البروتينات التنظيمية، والتي تفعل الاستجابة المبكرة للنسخ وتضم عوامل النسخ وحركة البروتينات (Song وزملاؤه، 2005).

تعد المورثات المرمزة للأنزيمات PMT و  $H_6H$  من أكثر المورثات أهمية في مسار التخليق الحيوي لقلويدات التروبان Tas، حيث يؤدي الأنزيم PMT دوراً مفتاحياً في أعلى مسار التخليق لقلويدات التروبان Tas من خلال تحفيز إضافة جذر الميثيل N-methylation لتشكيل مركب N-Methylputrescine (Hibi وزملاؤه، 1994)، وقد تبين أن تنظيم التعبير الجيني للـ PMT ذو أهمية كبيرة لزيادة إنتاج قلويدات التروبان في المزارع الخلوية لبعض الأنواع النباتية مثل الجذور الشعرية للداتورة *D. metel* والبنج المصري *H. muticus* (Moyano وزملاؤه، 2003) لكنه لم يكن كافياً لزيادة إنتاج القلويدات في المزارع الخلوية لأنواع من هجن الدوبوسيا *Duboisia* (Moyano وزملاؤه، 2002) والأتروبا *A. belladonna* (Rothe وزملاؤه، 2003).

إن الدور المفتاحي لأنزيم PMT في تخليق قلويدات التروبان TAs جعله هدف أساسي للعديد من التجارب والأبحاث، حيث كانت هناك عدة محاولات لإنتاج السكوبولامين Scopolamine من خلال زيادة تعبير المورثة المرمزة لأنزيم PMT، وفي معظم حالات الدراسة تلك كانت النباتات المستهدفة قد طعّمت بجين خارجي المنشأ مثل إدخاله من نباتات التبغ *Nicotina tobacca* (Zhang وزملاؤه، 2005)، فمثلاً نباتات الأتروبا *A. belladonna* والتبغ *N. sylvestris* التي امتلكت تعبير مفرط Overexpression لمورثة PMT درست من قبل Sato وزملاؤه (2001)، وأشاروا إلى تأثير مضاد للتعبير المفرط Overexpression المحرض بالتحوير الوراثي بسبب عدم ملاحظة تغير في محتوى قلويدات نبات الأتروبا *A. belladonna*، في حين زاد محتوى النيكوتين Nicotine في أوراق نبات التبغ *N. sylvestris* بشكل معنوي (وذلك لاشتراك مسار تخليق قلويدات التروبان TAs ومسار تخليق قلويد النيكوتين Nicotine في مراحله الأولى وبالأنزيم المفتاحي PMT).

وفي دراسة لـ Zhang وزملاؤه (2007) حول زيادة تعبير مورثة PMT المدخل من التبغ *N. tobacca* إلى مزارع جذور البنج الأسود *H. nigre* المنتج للسكوبولامين Scopolamine، أظهرت النتائج زيادة تعبير PMT في سلالات الجذور المحورة وزيادة محتوى N-Methyl Putrescine لأكثر من خمسة أضعاف على الرغم من بقاء المحتوى القلويدي ثابت. بينما أشار Moyona وزملاؤه (2002) أن محتوى قلويدات التروبان TAs في جذور البنج المصري *H. muticus* الحاوية على مورثة PMT المدخلة من نبات التبغ *N. tobacca* تحسن عدة أضعاف، لكن التحسن شمل مستويات الهيوسيامين Hyoscyamine فقط دون السكوبولامين Scopolamine.

وبينت دراسة أخرى لمزارع الجذور المحورة لنبات الأتروبا *A. belladonna* والتي تحوي كل من PMT و H6H، أن الجذور أنتجت مستويات من السكوبولامين Scopolamine أعلى معنوياً بالمقارنة مع النبات البري والسلالات التي أدخلت إليها مورثة واحدة فقط (PMT أو H6H)، حيث أعطت أفضل السلالات أكثر من 10 أضعاف من السكوبولامين Scopolamine بالمقارنة مع النبات البري، وأكثر بضعفين من السلالة الحاوية مورثة H6H والتي أعطت أعلى تركيز من السكوبولامين Scopolamine، وأشارت النتائج إلى أن المساهمة

في زيادة تركيز قلويدات التروبان TAs الناتجة عن زيادة تعبير مورثة PMT محدودة، في حين أن زيادة تعبير H6H تؤدي دوراً مهماً في زيادة التخليق الحيوي للقلويدات عموماً والسكوبولامين Scopolamine خاصة (Yang وزملاؤه، 2011<sup>a</sup>).

بينما أكد Jouhikainen وزملاؤه عام (1999) أن زيادة تعبير مورثة H6H المرمزة لآخر أنزيم في مسار تخليق قلويدات التروبان TAs بإمكانه أن يزيد وبشكل ملحوظ إنتاج السكوبولامين Scopolamine في مزارع الجذور الشعرية لنبات البنج المصري *H. muticus*. ووفقاً لنتائج Zhang وزملاؤه (2004) فإن H6H أدى دوراً أكثر أهمية في تحفيز تراكم السكوبولامين Scopolamine بالتنسيق مع أنزيم المسار العلوي PMT. في حين بين Pramod وزملاؤه (2010) أنه لا يوجد ارتباط بين تركيز السكوبولامين Scopolamine ووجود H6H في مختلف أعضاء نبات الداتورة *D. metel*.

كما قام Vakili وزملاؤه (2011) بدراسة تأثير الكروم سداسي التكافؤ على تعبير مورثة أنزيم H6H في نبات الأتروبا *A. belladonna* المكاثراً مخبرياً وإنتاجه من قلويدات التروبان، حيث بينت النتائج أن المعاملة بالكروم قللت من مؤشرات نمو النبات (الوزن، الطول، المحتوى من الكلوروفيل)، ويعزى ذلك إلى التأثير السام للكروم عند زيادة تركيزه فيعمل على تثبيط أنزيمات الأكسدة، في حين زاد محتوى النبات من البرولين proline كما ازداد عدد نسخ الـ mRNA لمورثة أنزيم H6H تحت ظروف المعاملة بالكروم، كما أظهر تحليل HPLC ازدياد محتوى النبات من الهيوسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine، وأن التغير في تركيز السكوبولامين Scopolamine مرتبط إيجاباً بمستويات تغير تعبير مورثة أنزيم H6H تحت تأثير التراكيز المختلفة من الكروم.

#### 7.1.4 دراسة التضاعفات الصبغية Polyploid:

إن الدراسات التفصيلية للخلية وعضياتها المختلفة ولا سيما النواة Nucleus وبالذات الصبغيات Chromosomes، والتي تتضمن حساب عدد الصبغيات Chromosome Number ودراسة مورفولوجية الصبغيات Karyotype Morphology وسلوك الصبغيات Chromosomes Behavior في الانقسام الخيطي Mitosis والانقسام المنصف Meiosis، لها أهمية كبيرة في حل العديد من المعضلات (Sharma، 1993)، حيث توازي الدراسة الخلوية

بأهميتها الدراسة المورفولوجية أو أية دراسة أخرى، وتدعم إلى حد كبير الدراسات التصنيفية بغية الوصول إلى تصنيف أكثر إقناعاً للمراتب التصنيفية المدروسة (الجبوري، 2010)، كذلك استعمال العدد الصبغي Chromosome Number وصفات الهيئة الصبغية لما لهما من أهمية كبيرة في تفسير الظواهر التطورية والوراثية المؤدية إلى التنوع (Heywood) Speciation (1976).

وقد حظي التضاعف الصبغي باهتمام مربّي البنات لما له أهمية في تحسين الصفات المرغوبة في بعض نباتات الإزهار والمحاصيل الحقلية (Kehr، 1998؛ Gao وزملاؤه، 1996)، كما يستخدم التضاعف الصبغي من أجل إعادة الخصوبة للهجن العقيمة الناتجة عن التهجين بين الأنجاس، وكذلك الهجن ثلاثية الصيغة الصبغية (Goldy وزملاؤه، 1984)، ومضاعفة النباتات أحادية الصيغة الصبغية للحصول على سلالات نقية جديدة وخصبة (Yetisir و Sari، 2003؛ Zamani وزملاؤه، 2000)، كذلك يستفاد من التضاعف الصبغي في إنتاج نباتات ثلاثية الصيغة الصبغية عقيمة خاصة في نباتات الزينة حيث إنتاج الثمار عليها غير مرغوب (Hancock، 1997).

وعلى الرغم من أهمية الدراسة الصبغية في الدراسات التصنيفية إلا أن الدراسات في هذا المجال قليلة ولا سيما فيما يتعلق بالنوع النباتي موضوع الدراسة، وهذا يؤكد ما جاء به العديد من الباحثين في أن هناك ربع مليون نوع نباتي من النباتات المزهرة، لم يسجل العدد الصبغي Chromosome Number فيها إلا لعشرين ألف نوع، وعلى الرغم من أن هذه النسبة قليلة مقارنة بعدد الأنواع المعروفة والمكتشفة والتي ستكتشف لاحقاً، إلا أنها لا تخلو من الأخطاء ولا سيما أن آلافاً من الأنواع النباتية درس العدد الصبغي Chromosome Number فيها لمرة واحدة غير معروف مصدر البذور التي تكون قد تم الحصول عليها من النقل الخاطئ وهذا يتفق مع نتائج دراسة (الزبيدي، 1998).

وكما نعلم أن الخلايا في التجمعات الخلوية تتواجد بصورة غير متزامنة في الانقسام ومتباينة من الناحية الوراثية، ولهذا تعد مزارع الكالوس Callus Cultures مصدراً للاختلافات الوراثية خاصة الاختلافات الصبغية التي تزيد بزيادة عمر مزرعة الكالوس، حيث بينت العديد من

الدراسات اختلاف الخلايا المزروعة نسبياً بالخصائص البيوكيميائية والوراثية والحالة الفيزيولوجية، بالإضافة لاختلافها في الخصائص المورفولوجية وذلك لتواجد هذه الخلايا بمراحل متباعدة من الكشف، حيث تتكاثر الخلايا في المرحلة الابتدائية (الطور المتلكئ Lag Phase) للزراعة ومرحلة الطور المتوسط (الأسى Exponential Phase) بتواتر سريع نوعاً ما، لكن عندما تصبح المواد المغذية في وسط الزراعة محدودة يتباطأ معدل تكاثر الخلايا، وهذا يؤثر على عدد الخلايا التي تدخل في مرحلة الانقسام (Fumihiko وزملاؤه، 2000).

ولأن الجزء النباتي المستعمل في الزراعة يحتوي على مختلف الأنسجة النباتية تكون خلايا الكالوس المستحدث متغايرة حسب نوع النسيج الذي نشأت منه، أما الاختلافات الفيزيولوجية فتتحدد في كون الخلايا تكون بحالات فيزيولوجية مختلفة (الانقسام، النمو، الشيخوخة، الموت) ولهذا يكون انقسامها غير متزامن. في حين تفقد التغيرات الوراثية أو الطفرات إلى تغير الطابع الوراثي الموروث. لأن الطفرة (تغير في كمية أو تركيب DNA) تحدث على مستوى المورثات أو الصبغيات (Mayo, 1984; Гужов, 1987; Ульяев).

وتتسبب الطفرات في إحداث تغير بسيط أو كبير في الخصائص المورفولوجية والبيوكيميائية و الفيزيولوجية للخلايا. وتظهر الطفرات كنتيجة لتغيرات في التركيبات الصبغية (طفرات تركيبية) أو في العدد الصبغي (طفرات عددية) في النواة ما يؤدي إلى تغير في الصيغة الصبغية، ويمكن مصادفة كل التغيرات الوراثية في الخلايا المزروعة في الزجاج لكن أكثرها دراسة تغيرات العدد الصبغي. ويمكن القول أن خلايا النسيج نفسه المزروعة في الوعاء نفسه تختلف فيما بينها نسبياً بالعدد الصبغي (ثنائية Diploidy، ثلاثية Triploidy، متعددة Polyploidy) و يعزى هذا الاختلاف لأسباب عديدة منها (Мамаева، 1988):

- 1- فك الارتباطات القوية بين الخلايا عند عزل الجزء المستخدم في الزراعة من النبات الأم أي فقدان التحكم المنظم للخلايا (اختلال التوازن الهرموني واختلال التبادل والنقل المجاور).
- 2- تأثير مركبات وسط الزرع.
- 3- تأثير منتجات الخلايا من المركبات الثانوية المتراكمة في الوسط المغذي.
- 4- اختلاف المادة المصدر (الأم) واختلاف الأنسجة المكونة للمستأصل النباتي وانتخاب خلايا ذات طابع محدد.

هذا ويعزى اختلاف العدد الصبغي Chromosome number بشكل رئيس إلى عدم تشكل خيوط المغزل في الإنقسام الخيطي Metoisis، حيث تتحلزن الصبغيات وتتضاعف دون تشكل خيوط المغزل، فتبقى الصبغيات المضاعفة في وسط النواة دون أن تفترق عن بعضها، وهذا يؤدي الى زيادة أعداد الصبغيات وزيادة حجم النواة والخلايا، إذ يمكن القول بأن تشكل الصيغة الصبغية المتعددة Polyploidy للخلايا يحدث نتيجة اختلال في الانقسام الخيطي Metoisis وتحديدًا الافتراق غير الصحيح للصبغيات المضاعفة (Щербakov، 1992؛ Шевелукха، 1998).

كما تظهر هذه الاختلافات بين الخطوط الخلوية Cellular Lines والنباتات المسترجعة Regenerated Plants، وتسمى مجمل هذه التغيرات بالتباينات الجسمية Somaclonal Variations (Бутенко، 1964). لكن آلية ظهور هذه الاختلافات الجسمية وطبيعتها الوراثية لم تدرس بالشكل الكافي. ويمكن القول أن ظهور التباينات الجسمية Somaclonal Variations مرتبط بالاختلافات الوراثية للخلايا الجسمية ( $2n$ ) في الجزء النباتي المدخل، كما يمكن تحفيز الاختلافات الوراثية بتعديل ظروف التنمية وانتخاب الطابع الوراثي للجزء المدخل (Шевелукха، 1998).

ولهذا تعد الدراسة الخلوية للكالوس المستحدث من النباتات ذو أهمية كبرى، كون الخلايا المكونة للكالوس برانشيمة وقادرة على الإنقسام ومتراكمة بحدوث تغيرات على مستوى الصيغة الصبغية من أهمها التضاعفات الصبغية (Кунах، 1973؛ Кунах و Каухова، 1982). وقد وجد أن مستوى التضاعف الصبغي في الخلايا النباتية المنقسمة في المزرعة النسيجية يعتمد على مستوى ونوع الهرمونات النباتية المستعملة في الوسط الغذائي، وأن الاختلافات في مستوى التضاعف الصبغي يترتب عليه عدد من الاختلافات في الخلايا، قد تنعكس على زيادة قدرة هذه الخلايا في تخليق وتراكم نواتج الاستقلاب الثانوية Secondary Metabolism Products (الحديدي، 2002؛ Larkin و Scowcroft، 1981؛ Schmauder و Doebel، 1991).

وقد أظهرت الدراسة الخلوية للكالوس الأولي المستحدث من أوراق نبات *Haplopappus gracilis* بعمر ستة أشهر وجود خلايا ثنائية الصيغة الصبغية Diploidy تصل نسبتها إلى 54% من مجموع الخلايا، كما تبين وجود خلايا ثلاثية Triploidy ورباعية Tetraploidy

ومتعددة الصيغة الصبغية Polyploidy، وبعد خمس سنوات من التتمية لهذا الكالوس تبين أن الخلايا متعددة الصيغة الصبغية Polyploidy تراوح العدد الصبغي فيها من  $x=2$  وحتى  $x=48$  علماً أن  $2n=2x=4$  للنبات الأم (Кунах، 1970).

وجد Gupta (1972) في دراسته حول العلاقة بين عمر الكالوس وحدث الشذوذ الصبغي أن الشذوذ الصبغي يتناسب طردياً مع زيادة عمر مزرعة الكالوس، وأن الخلايا ثنائية المجموعة الصبغية تقل بزيادة عمر المزرعة في حين تزداد نسبة الخلايا متعددة المجموعة الصبغية .

وقد أُشير إلى تأثير تعدد الصيغة الصبغية على عدد من المؤشرات الكيميائية والوراثية والأنزيمية في المزارع الخلوية لعدد من النباتات من قبل العديد من الباحثين (Yang وزملاؤه، 2011<sup>b</sup>، Lvania، 2005)، إذ يمكن لتضاعفات الصيغة الصبغية أن تغير من إتاحة الحمض الأميني الأورنيثينين Ornethinine والفينيل آلانين Phenylalanine، أو أن تغير من تركيز وفعالية بعض الأنزيمات على طول مسار التخليق الحيوي لقلويدات التربان Tropane Alkaloids (Oksman وزملاؤه، 1986). فقد بيّن Dehghan وزملاؤه (2012) في دراسته حول تركيز قلويدات التربان Tropane Alkaloids في نباتات البنج المصري *H.muticus* ثنائية Diploidy ورباعية الصيغة الصبغية Tetraploidy ومزارع مستتبتات الجذور الشعرية الناتجة عن كل منهما، أن النباتات رباعية الصيغة الصبغية Tetraploidy وسلالاتها من مزارع الجذور الشعرية راكمت السكوبولامين Scopolamine بمقدار 3 أضعاف أكثر، في حين انخفض تركيز الهيوسيامين Hyoscyamine بمقدار النصف بالمقارنة مع النباتات ثنائية الصيغة الصبغية Diploidy وسلالاتها من مزارع الجذور الشعرية، بمعنى كفاءة تحويل الهيوسيامين Hyoscyamine إلى سكوبولامين Scopolamine كانت أكبر في النباتات رباعية الصيغة الصبغية Tetraploidy وسلالاتها من مزارع الجذور الشعرية، ويفسر ذلك بحدوث تغير على مستوى التعبير المورثي في مسار تخليق قلويدات التربان Tas.

كما أشار Brekov وزملاؤه (2003) في دراسته حول تركيز قلويدات التربان في مزارع الجذور الشعرية لنباتات الداتورة *D. stramonium* ثنائية الصيغة الصبغية Diploidy ورباعية الصيغة الصبغية Tetraploidy، إلى انخفاض تركيز الهيوسيامين Hyoscyamine من 78.75% في مزارع الجذور الشعرية للنباتات ثنائية الصيغة الصبغية Diploidy إلى 56.6%

في مزارع الجذور الشعرية للنباتات رباعية الصيغة الصبغية Tetraploidy، أما السكوبولامين Scopolamine فقد زادت نسبة تراكمه في مزارع الجذور الشعرية للنباتات رباعية الصيغة الصبغية Tetraploidy بنسبة 200%، بالمقارنة مع مزارع الجذور الشعرية للنباتات ثنائية الصيغة الصبغية Diploidy. وفي دراسة أخرى لـ Philipov و Brekov (2002) أشارا إلى ارتفاع نسبة السكوبولامين /Scopolamine الهيوسيامين Hyoscyamine من 3.65 في مزارع الجذور الشعرية لنباتات الداتورة *D. stramonium* ثنائية الصيغة الصبغية Diploidy إلى 6.58 في مزارع الجذور الشعرية للنباتات رباعية الصيغة الصبغية Tetraploidy، ويفسر ذلك بزيادة فعالية أنزيم H6H ورفع كفاءته في تحويل الهيوسيامين Hyoscyamine إلى سكوبولامين Scopolamine.

مما سبق تظهر أهمية الكالوس كمصدر للإختلافات الصبغية، كما تظهر علاقة رئيسة بين العدد الصبغي والتراكم القلويدي في خلايا الكالوس، وانطلاقاً مما سبق يتبين أهمية دراسة الصيغة الصبغية لكالوس النباتات المزروعة نسيجياً وربطه بمحتوى هذه الخلايا من نواتج الاستقلاب الثانوية، ليصار لانتخاب سلالات خلوية ذات محتوى جيد من المركبات الحيوية الفعالة (الجبوري والموسوي، 2011).

الفصل الثالث

**Chapter Third**

مواد البحث وطرائقه

**Materials and Methods**

## 5. مواد البحث وطرائقه **Materials and methods**:

### 1.5. مكان تنفيذ البحث:

نفذ البحث في مخبر النباتات الطبية ومخبر التقانات الصناعية الغذائية، بالإضافة إلى مخبر الحيويات الطبية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، خلال الفترة الممتدة بين 2015-2019.

### 2.5. المادة النباتية:

تم العمل على الخط الخلوي 5C<sub>01</sub> من كالوس نبات البنج الذهبي (*H. aureus*) (الشكل، 6) والذي تم الحصول عليه من دراسة سابقة نفذت في مخبر النباتات الطبية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية (بشر وزملاؤها، 2012)، حيث تم غرلة مجموعة من أوساط MS (Murashige وSkoog، 1962) وأوساط 5C (Vollosovich وزملاؤه، 1985) المدعمة بتوافقات هرمونية مختلفة، وكان الوسط 5C<sub>01</sub> الأفضل بينها جميعاً لاستحداث الكالوس وإدامته، إذ اتسم الكالوس المنمى عليه بقوة نموه ومحتواه الجيد من قلويدات التروبان لعدة سنوات بالمقارنة مع النبات البري، وهو الخط الخلوي الذي تمت متابعة العمل عليه في هذه الدراسة.



الشكل رقم (6): الخط الخلوي 5C<sub>01</sub>

### 3.5. تنمية الكالوس على الأوساط المغذية المختبرة:

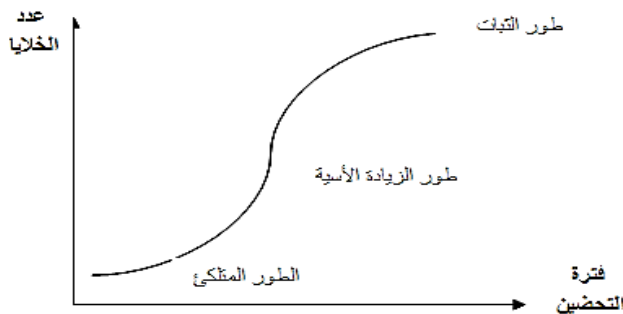
اختبرت تنمية الكالوس ومتابعة نموه وتطوره ومدى تأقلمه على أوساط مغذية مختلفة التركيب وخالية من منظمات النمو (الجدول، 6) (Vollosovich وزملاؤه، 1985) انطلاقاً من الخط الخلوي 5C<sub>01</sub> الذي اعتبر خط خلوي أم، وأخذت عليه كافة القراءات كشاهد في كل تجارب البحث.

### 4.5. دراسة بعض الصفات الشكلية للكالوس المستحدث:

أثناء تنمية الكالوس على الأوساط المغذية مختلفة التركيب والخالية من منظمات النمو (5C)، 6C، 10C) أعيدت زراعته على الأوساط نفسها لخمس مرات متتالية للتخلص من تأثير الوسط الأم (5C<sub>01</sub>) قبل أخذ مؤشرات النمو، ثم تم تنمية الكالوس على الأوساط السابقة مدة 50 يوماً، وهي الفترة التي درست فيها بعض الصفات الشكلية للكالوس الناتج، مثل لون الكالوس، قوام الكالوس، الشكل المظهري، وقوة نمو الكالوس وحجمه (AL-Ammouri، 2006، Turhan ; 2004)، بدءاً من اليوم الأول للزراعة 0 وحتى اليوم 50 بفارق 5 أيام بين كل قراءة والتي تليها.

### 5.5. تقدير النمو في مزارع الكالوس:

من المعلوم أن الزيادة في النمو بمزارع الكالوس تتبع نظام معين كما هو موضح في الشكل رقم (7)، الذي يوضح العلاقة بين عدد الخلايا وفترة التحضين، في هذه الدراسة تم اعتبار الوزن الرطب للكتلة الخلوية المتشكلة مؤشراً على قوة نمو الكالوس على أوساط الاستحداث المدروسة. ولدراسة ديناميكية النمو في مزارع الكالوس لنبات البنج الذهبي (*H. aureus*) أخذت عينة مؤلفة من ثلاثة مكررات كل خمسة أيام وعلى مدار 50 يوماً وذلك لرسم تابع النمو لخلايا الكالوس المستحدث على الأوساط المدروسة، وأخذت القراءات على ثلاثة نقلات متتالية لكل وسط مغذي، وحسب الوزن الرطب للكتلة الخلوية في كل مكرر، وسجل متوسط المكررات الثلاثة كنقطة في تابع النمو.



الشكل رقم (7): العلاقة بين عدد الخلايا وفترة التحضين

الجدول رقم (6): تركيب الأوساط المغذية المستعملة في تنمية كالوس البنج الذهبي (*H. aureus*) انطلاقاً من الخط الخلوي 5C<sub>01</sub> (Vollosovich وزملاؤه، 1985)

| Component                                                      | 5C <sub>01</sub>         | 5C <sub>1</sub>          | 6C                       | 10C                      |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| KNO <sub>3</sub>                                               | 1.1 g.L <sup>-1</sup>    | 1.1 g.L <sup>-1</sup>    | 1.1 g.L <sup>-1</sup>    | 0.3 g.L <sup>-1</sup>    |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                                | 0.5 g.L <sup>-1</sup>    | 0.5 g.L <sup>-1</sup>    | 1.0 g.L <sup>-1</sup>    | 2.5 g.L <sup>-1</sup>    |
| MgSO <sub>4</sub>                                              | 0.5 g.L <sup>-1</sup>    | 0.5 g.L <sup>-1</sup>    | 0.5 g.L <sup>-1</sup>    | 1.3 g.L <sup>-1</sup>    |
| KCl                                                            | 0.07 g.L <sup>-1</sup>   | 0.07 g.L <sup>-1</sup>   | 0.07 g.L <sup>-1</sup>   | 0.07 g.L <sup>-1</sup>   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                | 0.3 g.L <sup>-1</sup>    | 0.3 g.L <sup>-1</sup>    | 0.3 g.L <sup>-1</sup>    | 0.3 g.L <sup>-1</sup>    |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O           | 0.9 g.L <sup>-1</sup>    | 0.9 g.L <sup>-1</sup>    | 0.9 g.L <sup>-1</sup>    | 0.9 g.L <sup>-1</sup>    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0.1 g.L <sup>-1</sup>    | 0.1 g.L <sup>-1</sup>    | 0.1 g.L <sup>-1</sup>    | 0.3 g.L <sup>-1</sup>    |
| NH <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                | 0.6 g.L <sup>-1</sup>    | 0.6 g.L <sup>-1</sup>    | 0.6 g.L <sup>-1</sup>    | 0.2 g.L <sup>-1</sup>    |
| Thiamine – HCl (B1)                                            | 1 mg.ml <sup>-1</sup>    | 1 mg.ml <sup>-1</sup>    | 1 mg.ml <sup>-1</sup>    | 5 mg.ml <sup>-1</sup>    |
| Pyridoxine (B6)                                                | 0.5 mg.ml <sup>-1</sup>  | -                        | -                        | -                        |
| Nicotine acid (P.P)                                            | 0.5 mg.ml <sup>-1</sup>  | -                        | -                        | -                        |
| Kinetin(K)                                                     | 1 mg.ml <sup>-1</sup>    | -                        | -                        | -                        |
| Naphthalene acetic acid (NAA)                                  | 2 mg.ml <sup>-1</sup>    | -                        | -                        | -                        |
| Glycine                                                        | 2 mg.L <sup>-1</sup>     | -                        | -                        | -                        |
| Myo-Inositol                                                   | 80 mg.L <sup>-1</sup>    | -                        | -                        | -                        |
| Casein                                                         | 500 mg.L <sup>-1</sup>   | -                        | -                        | -                        |
| FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                         | 27.85 mg.L <sup>-1</sup> | 27.85 mg.L <sup>-1</sup> | 27.85 mg.L <sup>-1</sup> | 27.85 mg.L <sup>-1</sup> |
| Na <sub>2</sub> . EDTA                                         | 37.25 mg.L <sup>-1</sup> | 37.25 mg.L <sup>-1</sup> | 37.25 mg.L <sup>-1</sup> | 37.25 mg.L <sup>-1</sup> |
| MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                           | 24.1 mg.L <sup>-1</sup>  | 24.1 mg.L <sup>-1</sup>  | 22 mg.L <sup>-1</sup>    | 22 mg.L <sup>-1</sup>    |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                           | 10.62 mg.L <sup>-1</sup> | 10.62 mg.L <sup>-1</sup> | 10.6 mg.L <sup>-1</sup>  | 10.6 mg.L <sup>-1</sup>  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                                 | 6.2 mg.L <sup>-1</sup>   | 6.2 mg.L <sup>-1</sup>   | 12 mg.L <sup>-1</sup>    | 11.50 mg.L <sup>-1</sup> |
| KI                                                             | 0.83 mg.L <sup>-1</sup>  | 0.83 mg.L <sup>-1</sup>  | 0.83 mg.L <sup>-1</sup>  | 0.83 mg.L <sup>-1</sup>  |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O            | 0.25 mg.L <sup>-1</sup>  | 0.25 mg.L <sup>-1</sup>  | 0.21 mg.L <sup>-1</sup>  | 0.2 mg.L <sup>-1</sup>   |
| CuSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O                           | 0.025 mg.L <sup>-1</sup> | 0.025 mg.L <sup>-1</sup> | 0.025 mg.L <sup>-1</sup> | 0.025 mg.L <sup>-1</sup> |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                           | 0.025 mg.L <sup>-1</sup> | 0.025 mg.L <sup>-1</sup> | 0.055 mg.L <sup>-1</sup> | 0.1 mg.L <sup>-1</sup>   |
| Agar                                                           | 7 g.L <sup>-1</sup>      | 7 g.L <sup>-1</sup>      | 7 g.L <sup>-1</sup>      | 7 g.L <sup>-1</sup>      |
| Sucrose                                                        | 50 g.L <sup>-1</sup>     | 50 g.L <sup>-1</sup>     | 60 g.L <sup>-1</sup>     | 100 g.L <sup>-1</sup>    |

## 6.5. الدراسة الكيميائية Chemical study:

تم التحليل الكيميائي بقياس تركيز القلويدات (الهيسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine) في الخطوط الخلوية المدروسة، حيث أخذت عينة مؤلفة من ثلاثة مكررات كل خمسة أيام وعلى مدار 50 يوماً، وحسب التركيز في المكررات الثلاثة لكل عينة وسجل المتوسط كنقطة في تابع تراكم القلويدات.

### 1.6.5. استخلاص القلويدات Alkaloids extraction:

تم استخلاص القلويدات وفق الخطوات التالية (Doerk وزملاؤه، 1991):

- تم نقع 5 غرام من مسحوق الكالوس في 50 مل من محلول حمض الكبريت (0.4N) وترك مدة ساعتين.
- فصلت بقايا المسحوق عن الخلاصة الحمضية بالترشيح تحت الفراغ وغسلت بقايا المسحوق بـ 75 مل حمض الكبريت (0.4N) بالترجيل، وذلك لاستخلاص الأملاح القلويدية كلها من المسحوق النباتي.
- أخذت الخلاصة المائية الحمضية وقلونت بماءات الأمونيوم ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) تركيزه 25% حتى  $\text{pH}=9$ ، ووضعت بعدها الخلاصة في حبابة إبانة، واستخلصت القلويدات المتحررة بـ 30 مل من ثنائي كلور الميثان ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) (رجت الخلاصة الحمضية المقلونة مع الطور العضوي جيداً).
- جمعت الأطوار العضوية وثقلت على سرعة 4000 دورة بالدقيقة مدة 10 دقائق، ثم جففت بإضافة 4 غ من سلفات الصوديوم اللامائية ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )، وتركت لترقد مدة 15 دقيقة، رشح ثنائي كلور الميثان إلى وعاء آخر، وغسلت سلفات الصوديوم اللامائية بثلاث كميات من ثنائي كلور الميثان كل منها 10 مل ورشحت على القمع نفسه.
- حرر ثنائي كلور الميثان بوساطة المبخر الدوار عند الدرجة 40 درجة مئوية للحمام المائي حتى الجفاف، ثم حلت الخلاصة القلويدية الناتجة في 3 مل من الميثانول الخاص بالتحليل الكروماتوغرافي، من ثم أخذ 20  $\mu\text{L}$  من الخلاصة القلويدية المنحلة في الميثانول وحقنت في جهاز HPLC.

شروط التحليل بجهاز HPLC (من شركة Knauer الألمانية) :

◆ العمود: C18 (Octadecyl Silane) أو ما يعرف بالعمود L1 أبعاده (25 mm × 4 cm (i.d., RP

◆ معدل التدفق (Rf): 1 مل. دقيقة<sup>-1</sup>.

◆ البرنامج الحراري:

- الحرارة الابتدائية: 70 درجة مئوية مدة دقيقة واحدة.

- ثم ترفع من 70-250 درجة مئوية (بمعدل 9 درجات. دقيقة<sup>-1</sup>).

- نحافظ على الدرجة 250 مدة 13 دقيقة.

◆ حرارة الكاشف: 250 درجة مئوية.

◆ حرارة الحاقن: 250 درجة مئوية.

◆ مدة تحليل العينة: 25 دقيقة.

◆ الكمية المحقونة: 20 µl.

◆ طول الموجة: 245 nm أو 210 nm

◆ الطور الحامل (الطور المتحرك) مزيج مؤلف من Acetonitrile + (H<sub>2</sub>O 1L مع

Triethyl amine TEA 3 ml بنسبة 70:30.

## 7.5. الدراسة الجزيئية Molecular study:

### 1.7.5. دراسة التباينات الوراثية الجسمية Somaclonal variations بين مزارع الكالوس:

كشف عن التباينات الوراثية الجسمية الحاصلة بين الخطوط الخلوية من جهة وبين الخطوط الخلوية والنبات الأم المانح Donor من جهة أخرى، واختبرت تقنية ISSR كتقنية لا تتطلب جهود كبيرة، ونفذت دراسة هذه التباينات باتباع الخطوات التالية (Doyle و Doyle ، 1990):

#### 1.1.7.5. عزل DNA بطريقة CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide):

❖ وضع قرابة 200 ملغ من المادة النباتية المجمدة والمطحونة في الآزوت السائل في إنبوب إيندورف سعة 2 مل.

❖ أضيف 750 ميكرو لتر من محلول الاستخلاص CTAB المسخن مسبقاً على درجة حرارة 60 م°، وحرك المزيج جيداً، حيث يتكون محلول الاستخلاص من المواد التالية:

(3% w/v) CTAB + 100 mM Tris-Hcl (PH=8) + 1.4 M NaCl + 20 mM EDTA (PH=8) + 0.2% mercaptoethanol (v/v).

❖ وضعت الأنابيب في حمام مائي على درجة حرارة 60 °م مدة ساعة مع التحريك بالتقليب كل 15 دقيقة.

❖ بردت الأنابيب على درجة حرارة الغرفة مدة 5 دقائق.

❖ أضيف 750 µL من الكلوروفورم إيزوميل الكحول بنسبة (1:24) ثم حرك المزيج جيداً بالتقليب حتى تشكل الرغوة (قراءة 5 دقائق) لإزالة البروتينات والليبيدات.

❖ ثقلت الأنابيب بجهاز الطرد المركزي من نوع Heraeus على سرعة (12000 rpm) مدة 10 دقائق على درجة حرارة 4 °م وذلك لفصل راسب البقايا النباتية عن الرشاحة الحاوية على الأحماض النووية.

❖ نقل الطور المائي (الطبقة العليا) الناتج إلى أنبوب جديد وأعيدت عملية إضافة كلوروفورم إيزوميل كحول والتثقيب على سرعة (12000 rpm).

❖ نقل الطور المائي الناتج إلى أنبوب جديد وأضيف (3/2) من حجم الطور المائي أيزوبروبانول مبرد (-20°C Isopropanol) مع التحريك بلطف حتى ترسب DNA.

❖ حضن بالبراد على +4 °م لليوم التالي أو على -20 °م لمدة ساعة لترسيب DNA.

❖ تركت بعدها العينات لتذوب في حرارة الغرفة ثم ثقلت الأنابيب بجهاز الطرد المركزي على سرعة (12000 rpm) مدة 5 دقائق على درجة حرارة 4 °م.

❖ تم التخلص من الرشاحة وأضيف 1 مل من محلول الغسيل Washing buffer (كحول إيثيلي 70% ) البارد والمحمفوظ بدرجة -20 °م لراسب DNA، وحرك بلطف بالتقليب عدة مرات.

❖ ثقلت الأنابيب عند سرعة (10000 rpm) مدة 5 دقائق على درجة حرارة 4 °م.

❖ أعيدت عملية الغسيل بالكحول الإيثيلي 70% والتثقيب عند سرعة 10000 rpm ثم تم التخلص من محلول الغسيل، وجفف راسب DNA في حرارة الغرفة مدة 30 دقيقة.

❖ أذيت عينات DNA في 100 µl من الماء المقطر المعقم أو محلول TE.

خلال أي عملية استخلاص DNA لا بد من وجود كمية من RNA الناتجة عن عملية الاستخلاص (تختلف كمية RNA باختلاف طريقة الاستخلاص والنسيج النباتي وعمره) وعليه لا

بد من استبعاد هذا الحمض النووي وفق ما يلي:

إضافة 2µl من أنزيم RNase (10 mg/ml) والتحضير على درجة حرارة 37 م° لمدة نصف ساعة وأضيف حجم مماثل من الكلوروفورم إيزوميل الكحول (1:24) وبعد التثقيب نقل الطور العلوي لأنبوب جديد وأضيف له ضعف كمية المزيج من الإيثانول النقي 100% لإعادة ترسيب DNA، وترك عند الدرجة 4 م° لمدة ساعة ثم رسب المزيج بالتثقيب بسرعة 10000 rpm ولمدة 10 دقائق وغسل ثانية بالإيثانول 70% وجفف بالهواء للتخلص من آثار الإيثانول ثم أذيب DNA في 100 µL من الماء المقطر المعقم.

#### 2.1.7.5. التقدير الكمي والنوعي للحمض الريبوي النووي منقوص الأوكسجين DNA:

استخدم جهاز (UV Spectrophotometer) نوع HITASHE لتقدير كمية DNA وتحديد نقاوته حيث يعتمد الجهاز في عمله عن طريق تقدير امتصاص DNA للأشعة فوق البنفسجية بموجات طولها 260 و 280 نانو متر. حيث ذكر Maniatis وزملاؤه (1982) أن النسبة بين قراءة الموجة 260 نانو متر والموجة 280 نانومتر OD260/OD280 تساعد في تقدير نقاوة DNA إذ يجب أن تتراوح هذه النسبة بين (1.8 - 2). حسب تركيز DNA من المعادلة التالية (Maniatis وزملاؤه، 1982):

$$\text{DNA concentration (g/l)} = [\text{OD260} \times \text{معامل التمديد} \times 50 \text{ (g/ml)}] / 1000$$

إذ تمثل OD 260 الكثافة الضوئية لامتصاص DNA (µg) عند الموجة 260 نانومتر. ثم مددت عينات DNA للحصول على تركيز  $50 \text{ ng.}\mu\text{l}^{-1}$ ، كما تم التقدير النوعي على هلامه الأغاروز (0.8%) إذ يظهر الـ DNA ذو النوعية الجيدة على شكل حزمة Band بينما يكون DNA سيء النوعية ممشحاً وغير واضح الحدود Smear.

#### 3.1.7.5. تضخيم الحمض الريبوي النووي منقوص الأوكسجين DNA:

- تم تضخيم DNA من خلال تفاعل بوليميراز التسلسلي (PCR) (Williams وزملاؤه، 1990) مع بعض التعديلات ليكون حجم التفاعل النهائي (25 µl) يتكون من 2 µl من DNA لكل عينة و 12.5 µl Master Mix (Kapa) و 1.25 µl من المرئسة، ثم أكمل الحجم إلى 25 µl بالماء المقطر المعقم، وأجري تفاعل الـ PCR باستعمال Kapa 2G fast ready Mix PCR kit وفق تعليمات الشركة المصنعة، ثم فصلت حزم الـ DNA بعد ذلك بالترجيل على

هلامة الأغاروز (2%) في محلول TBE 1X (Sambrook وزملاؤه، 1989). وتم هذا التفاعل وفقاً للظروف التالية:

❖ الانفصال الأولي: عند درجة حرارة 94 م° مدة 5 دقائق ليتم انفصال سلسلتي DNA.

❖ 35 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:

◆ مرحلة التحطم الحراري (Denaturation): رفعت في هذه المرحلة درجة الحرارة إلى 94 م° مدة 30 ثانية ليتم وقف التفاعلات الأنزيمية وانفصال سلسلتي DNA عن بعضهما البعض لتصبحا بحالة سلسلة مفردة .

◆ مرحلة الالتحام (Annealing): خفضت فيها درجة الحرارة إلى درجة تتراوح بين -35-58 م° مدة دقيقة واحدة حسب طول المرئسة وعدد النكليوتيدات المكونة لها، ليتم التلاحم المرئسة بالقطعة المكمل لها من DNA، وتعد هذه المرحلة هي الأهم خلال التفاعل لتتم مضاعفة سلسلة DNA بشكل صحيح حسب درجة حرارة الالتحام الخاصة بكل مرئسة (الجدول 7).

◆ مرحلة الاستطالة (Extention): رفعت الحرارة فيها إلى 72 م° مدة دقيقة واحدة ليتم إكمال تكوين السلاسل الجديدة بوجود أنزيم Taq Polymerase والمركبات الغنية بالطاقة (ATP, TTP, GTP, CTP)، وبعد انتهاء التفاعل تم الحصول على عدد كبير من سلاسل DNA بدءاً من قطعة واحدة.

ثم أكمل التفاعل عند حرارة 72 م° مدة عشر دقائق. وحفظت العينات بعدها عند درجة حرارة 4 م° لتفصل الحزم بعدها بالترجيل على هلامة الأغاروز 2% وتصور الهلامة بجهاز تصوير هلامة الأغاروز (Agle Eye II taratagen) Imag Analyzer.

◆ تضمنت هذه الدراسة تطبيق تقنية ISSR بغرض دراسة التباينات الجسمية الوراثية بين مزارع الكالوس، حيث اختبرت مجموعة من المرئسات، ويبين الجدول رقم (7) التسلسل النكليوتيدي لهذه المرئسات ودرجة حرارة التلاحمها:

الجدول رقم (7): التسلسل النكليوتيدي للمرئسات المستعملة في تطبيق تقنية ISSR ودرجة حرارة التحامها

| المرئسة         | التسلسل النكليوتيدي 5'→3' | درجة حرارة الالتحام | المرئسة         | التسلسل النكليوتيدي 5'→3'           | درجة حرارة الالتحام |
|-----------------|---------------------------|---------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------|
| <b>Oligo 34</b> | (CA) <sub>8</sub> A       | 50                  | <b>Oligo 48</b> | (GA) <sub>6</sub> GC                | 55                  |
| <b>Oligo 35</b> | (CA) <sub>6</sub> GT      | 55                  | <b>Oligo 49</b> | (GA) <sub>8</sub> C                 | 43                  |
| <b>Oligo 36</b> | (CA) <sub>8</sub> G       | 43                  | <b>Oligo 50</b> | (GA) <sub>8</sub> CG                | 43                  |
| <b>Oligo 37</b> | (CA) <sub>8</sub> T       | 43                  | <b>Oligo 51</b> | (CT) <sub>8</sub> G                 | 52                  |
| <b>Oligo 39</b> | GAG(CA) <sub>7</sub>      | 43                  | <b>Oligo 52</b> | (TC) <sub>8</sub> C                 | 51                  |
| <b>Oligo 40</b> | (AC) <sub>8</sub> T       | 43                  | <b>Oligo 53</b> | CCAG(GT) <sub>7</sub>               | 56                  |
| <b>Oligo 41</b> | (AC) <sub>8</sub> G       | 43                  | <b>Oligo 54</b> | (GT) <sub>4</sub> (GA) <sub>5</sub> | 54                  |
| <b>Oligo 42</b> | (AC) <sub>8</sub> CTA     | 43                  | <b>Oligo 55</b> | (GT) <sub>6</sub> CC                | 55                  |
| <b>Oligo 43</b> | AGT(AC) <sub>7</sub>      | 43                  | <b>Oligo 56</b> | (GT) <sub>6</sub> GG                | 55                  |
| <b>Oligo 44</b> | (AG) <sub>8</sub> C       | 43                  | <b>Oligo 57</b> | AGC(GT) <sub>7</sub>                | 43                  |
| <b>Oligo 45</b> | (AG) <sub>8</sub> CA      | 51                  | <b>Oligo 58</b> | ACG(TG) <sub>7</sub>                | 43                  |
| <b>Oligo 46</b> | (AG) <sub>8</sub> TC      | 43                  | <b>Oligo 59</b> | (TG) <sub>8</sub> AGT               | 43                  |
| <b>Oligo 47</b> | (GA) <sub>8</sub> T       |                     |                 |                                     | 51                  |

#### 4.1.7.5. الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

تم الترحيل على هلامة الأغاروز في جهاز رحلان أفقي (Agarose Ultrapure) (Fingerprinting USA) بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولت مدة ساعة ونصف وذلك لفصل حزم DNA الناتجة عن التضخيم:

#### • تحضير هلامة الأغاروز:

حضرت هلامة الأغاروز كما يلي:

- تم إضافة 2 غ من الأغاروز لـ 100 مل من المحلول المنظم TBE 1X:
- (Buffer TBE 10X: 108g Tris borate, 55g Boric acid, 20 ml EDTA) PH=8
- سخن المزيج السابق بالميكرويف مدة 3-4 دقائق ثم برد إلى درجة 45 م.
- حضرت صفيحة صب الأغاروز بواسطة إغلاقها من الجانبين، ووضع المشط المناسب حسب عدد العينات المراد دراستها، وذلك لتشكيل جيوب مناسبة لوضع العينات المراد فصلها أو دراسة جودتها.

- صب المزيج السائل بهدوء في الصفيحة (القالب) المخصصة لتحضير الهلامية، وعند تماسك الجل وتصلبه أزيلت الأمشاط، ووضعت هلامية الأغاروز مع الصفيحة في جهاز الرحلان الكهربائي، ثم ملئ الحوض بمحلول منظم TBE 1X حتى غطى المحلول سطح الهلامية بشكل كامل على ارتفاع 2-1 mm.

#### • تحميل عينات DNA على هلامية الأغاروز:

تم تحميل ما يعادل 2µl من عينة DNA المذاب بكمية 6µl من الماء المقطر والمعقم كذلك إضافة 2µl من سائل التحميل الخاص (Loading buffer) فيصبح المجموع 10µl لتحديد نوعية الـ DNA. كما حضرت صبغة التحميل Bromophenol blue الحاوية على المكونات التالية:

(15% Ficoll 400+ 1.03% bromophenol blue +0.03% xylene cyanol FF + 0.4% Orange G + 10Mm Tris-HCL+ 50mM EDTA)  
ثم أضيف 5µl من هذه الصبغة لـ 15µl لكل عينة من منتجات التضخيم في PCR وحقنت في آبار هلامية الأغاروز التي تم تحضيرها، وأضيف إليها 5µl من صبغة الإيثيديوم برومايد ( 50 mg.ml<sup>-1</sup>), كما حقنت عينة من مؤشر الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين ( DNA marker - 1K bp Promega)، وذلك لتحديد الحجم الجزيئي للحزم الناتجة ليتم بعد ذلك الترحيل.

#### • تصوير الهلامية:

صورت الهلامية بجهاز تصوير هلامية الأغاروز (Imag Analyzer Agle Eye II (taratagen).

### 8.5. دراسة التعبير المورثي Gene expression studying :

يمكن دراسة تعبير مورثة ما عن طريق تعقب الحمض النووي الريبي الرسول (mRNA) المنسوخ عن هذا المورث، لذلك لتقدير تعبير المورثات المدروسة PMT و H6H و TR I و TR II تم استخلاص الحمض النووي الريبي الكلي (Total RNA)، ثم تم تحويل الحمض النووي الريبي الرسول (mRNA) إلى الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين المكمل (Complementary DNA) cDNA. بعدها تمت مضاعفة المورثات المدروسة بتقانة تفاعل

بوليميراز التسلسلي (PCR) وباستعمال مرئسات (Primers) خاصة بكل مورثة، ثم حسب تعبير المورثات المدروسة باستعمال تقانة تفاعل البوليميراز التسلسلي في الوقت الحقيقي (Real time PCR) (Murshed وزملاؤه، 2011).

#### 1.8.5. استخلاص الـ RNA الكلي Total RNA extraction :

- عزل الـ RNA الكلي من 100 ملغ من مسحوق الكالوس المجمد والمطحون بالآزوت السائل خلال مراحل عمرية مختلفة، حيث أخذت عينة كل 5 أيام ابتداءً من يوم الزراعة الأول (0) وصولاً لليوم (50)، وذلك باستعمال كيت Qiagen Cat no: RNEASY MINI KIT (74104) حسب التعليمات الموضوعة من قبل الشركة المصنعة.

- قدر تركيز الـ RNA الكلي بواسطة جهاز مقياس الطيف الضوئي (UV Spectro- photometer) نوع HITASHE، وذلك بقياس الامتصاص عند طول موجة 260 و 280 نانومتر.

- تم التأكد من نوعية الـ RNA الكلي باستعمال الرحلان الكهربائي وجيل agarose تركيز 1%. ثم خزنت المستخلصات على درجة حرارة - 20 م° حتى الاستعمال.

#### 2.8.5. تركيب cDNA وتقنية تفاعل بوليميراز التسلسلي في الوقت الحقيقي Real Time

##### :PCR Technique

- تم تركيب الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين المكمل (cDNA) من 100 نانوغرام من الـ RNA الكلي باستعمال تقانة النسخ العكسي Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction RT- PCR، وبوجود أنزيمات النسخ العكسي (Reverse transcriptase) ومرئسة خاصة (Oligo-dT).

- ثم أجري التقدير الكمي على مستوى الـ mRNA باستعمال تقانة تفاعل الـ PCR الكمي (في الوقت الحقيقي Real Time PCR) وباستعمال كيت Power Sybr Green RNA-to- C<sub>T</sub><sup>TM</sup> 1-Step وحسب تعليمات الشركة المصنعة (Applied Biosystems) التي توضح مكونات تفاعل Real time PCR بحجم نهائي 20 µl كما في الجدول (8)، وباستعمال البرنامج الحراري الموضح في الجدول (9) والشكل (8)، وبوجود مرئسات مختصة بالمورثات المدروسة بالإضافة إلى مورثة المقارنة الداخلية (الأكتين) كما في الجدول (10).

الجدول رقم (8): مكونات تفاعل Real time PCR

| Component                        | Volume for one reaction |
|----------------------------------|-------------------------|
| Power Sybr Green RT-PCR Mix (2X) | 10 µL                   |
| Forward primer (10 pmol/µL)      | 0.4 µL                  |
| Reverse primer (10 pmol/µL)      | 0.4 µL                  |
| RT Enzyme mix                    | 0.4 µL                  |
| RNA tamplet (50 ng/ µL)          | 2 µL                    |
| RNase – free H <sub>2</sub> O    | 6.8 µL                  |

الجدول رقم (9): البرنامج الحراري المستخدم في تطبيق تقنية Real time PCR باستعمال Power Sybr

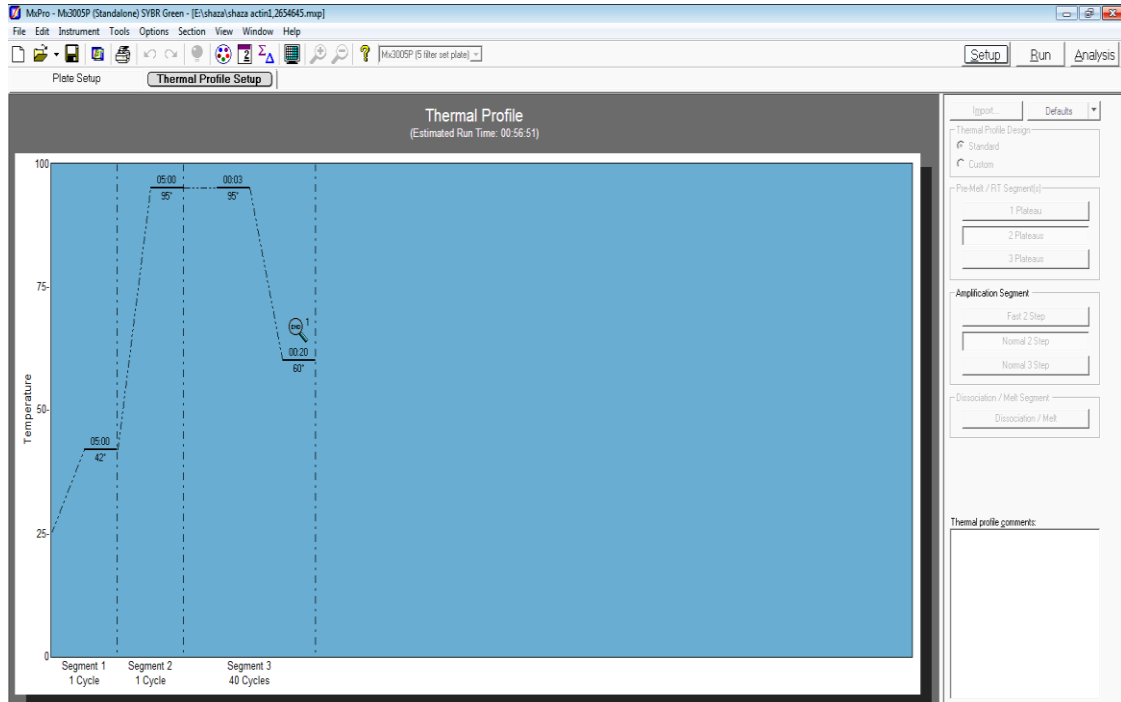
Green RNA-to-C<sub>T</sub><sup>TM</sup> 1-Step kit

| Stage                  | Step                 | Temp | Time   |
|------------------------|----------------------|------|--------|
| Holding                | Reverse transcpiorin | 42 C | 5 min  |
| Holding                | Inactivate RT        | 95 C | 5 min  |
| Cycling<br>(40 cycles) | Denature             | 95 C | 3 sec  |
|                        | Anneal/Extend        | 60 C | 20 sec |

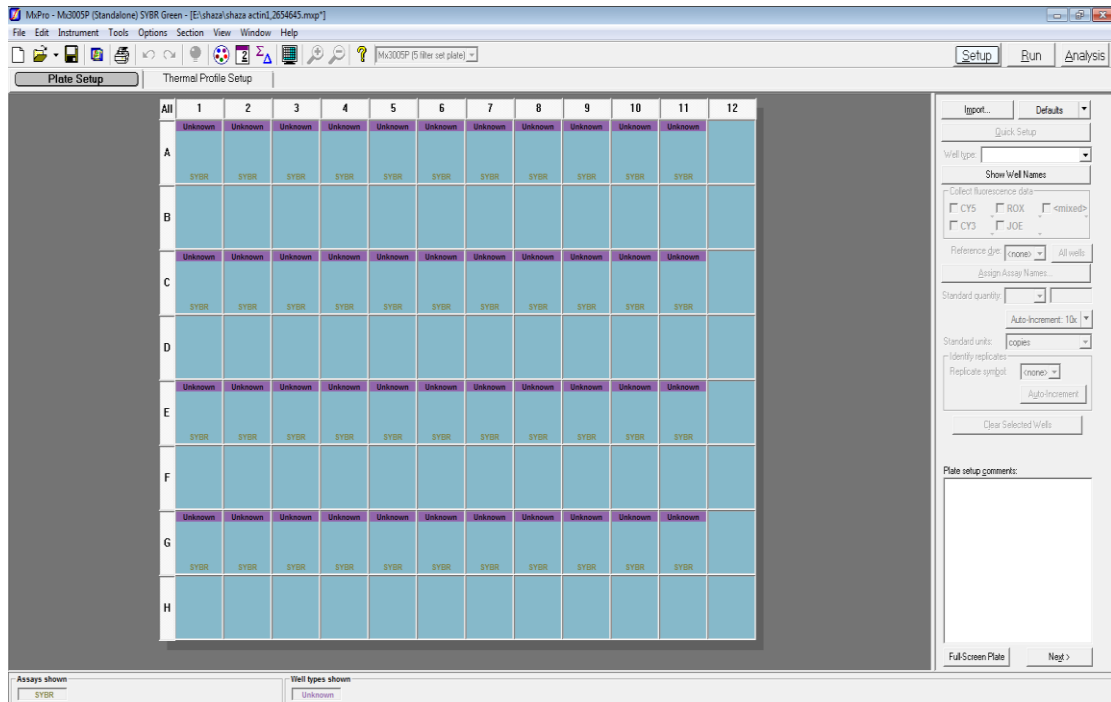
الجدول رقم (10): تسلسل القواعد النيوكلوتيدية في المرئسات المتخصصة بالمورثات المدروسة ومورثة

الأكتين

| PCR fragment | Sequence 5' to 3'                                                    | Reference                    |
|--------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| PMT          | F: GCCATTCCCATGAACGGCC<br>R: CCTCCGCCGATGATCAAAACC                   | (Moyona وزملاؤه، 2003)       |
| H6H          | F: GAGGATCCATTTGATGGCTAGTTTTGTG<br>R: TGCCTTAAGTTAGACATTGATTTTATATGG | (Ebrahimzadeh وزملاؤه، 2003) |
| TR I         | F: GTTTTTGATCAAAACATAATGGGCT<br>R: ATTAACAAGAAATGGCCGGAGAATC         | (Rocha وزملاؤه، 2002)        |
| TR II        | F: ATGGCTGAAGGTGAAT<br>R: ACAATTAGCCATAAGTCCACC                      | (Richter وزملاؤه، 2005)      |
| HActin       | F: ATTGTGAGCAACTGGGATGA<br>R: GTAGATGGGGACGGTGTGAG                   | (Voloudakis وزملاؤه، 2002)   |



الشكل رقم (8): البرنامج الحراري المطبق بتقانة Real Time-PCR



الشكل رقم (9): طريقة حقن العينات عند استعمال تقانة RT-PCR وباستعمال مورثة الأكتين مع التجمعات الخلوية من عمر اليوم الأول للزراعة 0 وحتى 50 يوم

A: 5C01

C:5C

E:6C

G:10C

درس تعبير كل من المورثات المدروسة بمقارنة تعبيرها مع مورثة المقارنة الداخلية (مورثة الأكتين Actin)، وكذلك مقارنة تعبير كل مورثة من هذه المورثات في الخطوط الخلوية المدروسة مع تعبير نفس المورثة في الشاهد 5C<sub>01</sub>. وباستعمال طريقة (Real Master Mix SYBR ROX5PRIME)، وذلك حسب التعليمات الموضوعة من قبل الشركة المصنعة.

- حسبت مستويات نسخ المورثة المدروسة حسب مورثة الأكتين ونسبت إلى الشاهد حسب طريقة  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak و Schmittgen، 2001) وذلك كما يلي.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{مورثة المقارنة الداخلية}} - Ct_{\text{المورثة المدروسة}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{المعاملة}} - \Delta Ct_{\text{الشاهد}}$$

$$\text{Relative expression ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### 3.8.5. التأكد من مضاعفة المورثات المدروسة:

تم التحقق من جودة المرئسات بواسطة مراقبة ظهور قمة اتحاد وحيدة في تفاعلات الـ Real Time PCR، كما تم التحقق من خصوصية الارتباط للمرئسات عن طريق تنفيذ منحنى فصل في نهاية تفاعل الـ PCR، إذ يجب أن يظهر منحنى فصل وحيد، وإلا تكون المرئسة قد ارتبطت بـ Primer Dimer (وهو قطعة من DNA تتألف من نحو 50 زوج نكليوتيدي).

### 4.8.5. معالجة معطيات الـ PCR في الوقت الحقيقي:

تم تحليل المعطيات الناتجة عن الـ Real Time PCR بواسطة برنامج (Eppendorf Realplex Software). من أجل كل عينة لحساب تعبير المورثة المدروسة بالنسبة لتغير المورثة المتحكممة بالأكتين. يعبر عن التغير الحاصل في مستوى تعبير المورثات بعدد الأضعاف مقارنة مع الشاهد 5C<sub>01</sub> الذي يأخذ قيمة 1 في دراسات التعبير المورثي.

### 9.5. دراسة التضاعفات الصبغية:

طبقت تقنية التتميط الصبغي Karyotyping وفق طريقة (LaCour و Darlington، 1976)، حيث أخذت خزعة خلوية مكونة من ثلاثة مكررات من كل خط من الخطوط الخلوية كل خمسة أيام ابتداءً من اليوم الأول للزراعة 0 وحتى اليوم 50 وعوملت كما يلي:

### 1.9.5. قتل وتثبيت الخلايا:

وضعت عينات الكالوس في محلول كارنوي الاول (Carnoy's fluid 1) والمتكون من حجم واحد من حامض الخليك الثلجي المطلق Glacial acetic acid وثلاثة حجوم من الكحول المطلق Absolute alcohol ، المحضر آنياً لتجنب تكون خلايا الإثيل التي تزيد من اصطباج السيتوبلاسم (Sharma و Sharma، 1972). تركت العينات في المحلول مدة 20 -24 ساعة، ثم غسلت بكحول إثيلي تركيز (70 %) ولمرتين متتاليتين مع الرج، ثم حفظت بالكحول 70% مدة 24 ساعة وبعدها استبدل الكحول بآخر له التركيز نفسه (للتخلص من آثار الحامض وحفظت العينات في المجمدة لحين دراستها).

### 2.9.5. تصبغ الخلايا وتحضير الشرائح : Cells staining and slides preparation

- استعملت طريقة شلاهي (2009) في تصبغ الخلايا والتي تتلخص في الخطوات التالية:
- 1- وضعت التجمعات الخلوية (الخرعات) في صبغة " الأورسين " الحامضية مدة 5-7 أيام.
  - 2- استخرجت بعدها العينات ووضعت في قطرة من حمض الخليك الثلجي 45% على شريحة مجهرية ومررت فوق لهب مصباح كحولي ثم هرست ووضع عليها غطاء الشريحة بإحكام.
  - 3- وضعت الشريحة بين طبقتي ورقة ترشيح وضغط عليها بالإبهام وبصورة عمودية ثابتة.
  - 4- مررت الشريحة على لهب مصباح كحولي 2-3 مرة بغرض التصاق الغطاء وتفريق الصبغيات.
  - 5- درست الشرائح تحت مجهر باستعمال عدسة بقوة تكبير 40X و 100X، مرتبط بكاميرا رقمية متصلة بجهاز كمبيوتر، استخدم لتصوير أطوار الانقسام واحتساب قيم معامل الانقسام الخيطي Metotic index (MI) حسب المعادلة التالية:

$$\text{mitotic index} = \frac{\text{No. of mitotic division cells}}{\text{total No. of cells scored}} \times 100$$

- 6- أما عن جذور النبات فقد تم تثبيتها وفق ما يلي:
- غسلت الجذور بالماء المقطر ثم قطعت القمة النامية بطول 1 سم ووضعت في أطباق بتري تحتوي محلول كارنوي Carnoy Fixation مدة 24 ساعة، غسلت بعد ذلك بالماء المقطر ثم وضعت في صبغة أسيتو كارمن Acetocarmine مدة 15 دقيقة، وضعت بعد التصبغ

في حمض كلور الماء HCL (IN) مدة 5 دقائق مع التسخين على درجة حرارة 60 درجة مئوية لتفكيك الخلايا، ثم هرست في قطرة من صبغة الأسيتوكارمن Acetocarmine على شريحة زجاجية وغطيت بساترة زجاجية، وفحصت تحت المجهر عند قوة 40X و 100X .

### 10.5. التحليل الإحصائي Statistical analysis:

تم تبويب النتائج وفق التصميم العشوائي التام (CRD) Completely Random Design، أما تحليلها فقد تم باستعمال برنامج Excle Stat وذلك لحساب المتوسطات، ثم مقارنة الفروقات المعنوية بين المتوسطات (ANOVA) وذلك عند مستوى معنوية 1%.

أما نتائج الدراسة الجزيئية فقد تمت باستعمال برنامج Total lab (Ultra. Lum Inc., ) (Claremont, Calif) لتحديد حجم حزم الـ DNA الناتجة عن التضخيم، وتحويل المعطيات للنظام الثنائي (1 للحزمة الموجودة و 0 للحزمة الغائبة)، وحسبت مصفوفة عدم التوافق الوراثي اعتماداً على معامل Jaccard، ثم استعملت هذه المصفوفة لإجراء التحليل العنقودي بتطبيق طريقة متوسطات المجموعات الزوجية غير المزنة (UPGMA Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging) ورسم شجرة القرابة الوراثية Dendrogram باستعمال برنامج (Power Marker Jaccard، 1908).

وبالنسبة لنتائج الدراسة الصبغية فقد تم معالجة البيانات باستعمال برنامج Video Test Karyo 3.0.

الفصل الرابع

**Chapter Four**

النتائج والمناقشة

**Results & discution**

## 6. النتائج والمناقشة Results and discussions:

### 1.6. الوصف المظهري للكالوس الناتج على الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو:

امتاز كالوس نبات البنج الذهبي (*H.aureus*) بسهولة نموه وإدامته على الأوساط الجديدة الخالية من منظمات النمو النباتية، فقد وجد أنّ الكالوس المزروع على جميع الأوساط المدروسة كان جيد النمو مع تفوق الوسط الشاهد 5C<sub>01</sub> في قوة نمو الكالوس (الجدول رقم 11). وقد تدرج لون الكالوس من الأبيض الكريمي في الوسط الشاهد 5C<sub>01</sub> إلى الأبيض المصفر في الوسط 6C والأصفر في الوسط 5C والأصفر المخضر مع وجود اللون البني في الوسط 10C (الشكل، 10)، وبشكل عام كان قوام الكالوس متماسك وذو مظهر حبيبي مرغوب على جميع الأوساط المدروسة، كما يوضح الشكل رقم (11) تنمية الكالوس على الأوساط المدروسة انطلاقاً من الخط الخلوي 5C<sub>01</sub>.



الشكل رقم (10): نمو الكالوس على الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو بالمقارنة مع الشاهد بعمر 50 يوماً

الجدول رقم (11): بعض الصفات المظهرية للكالوس نبات البنج الذهبي (*H. aureus*) على الأوساط المغذية مختلفة التركيب والخالية من منظمات النمو

| 10C        | 6C         | 5C         | Control (5C <sub>01</sub> ) | صفات الكالوس |
|------------|------------|------------|-----------------------------|--------------|
| حبيبي خشن  | حبيبي خشن  | حبيبي خشن  | حبيبي خشن                   | الشكل        |
| متماسك صلب | متماسك صلب | متماسك صلب | متماسك صلب                  | القوام       |
| بني مخضر   | أبيض مصفر  | أصفر       | أبيض كريمي                  | اللون        |
| ++         | +++        | +++        | ++++                        | الحجم        |

+ نمو ضعيف، ++ نمو متوسط، +++ نمو جيد، ++++ نمو جيد جداً



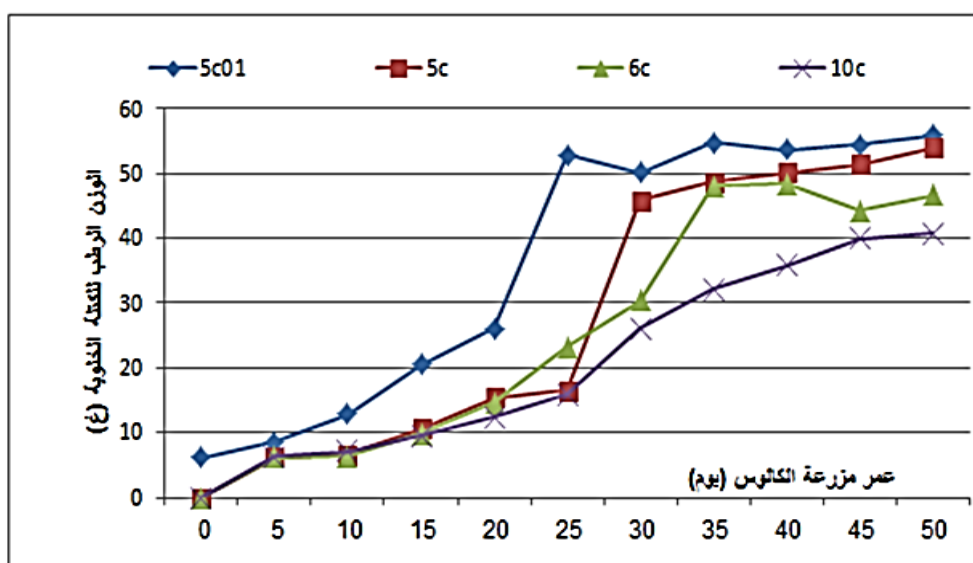
الشكل رقم (11): تنمية وتحضين الكالوس على الأوساط المدروسة

A: 10C      B: 6C      C: 5C

حيث يتصف الكالوس جيد النمو والمرغوب بالشكل الحبيبي المترافق مع القوام المتماسك صعب التفتت واللون الكريمي الفاتح، أما تدرج لون الكالوس من الكريمي إلى البني واسمرار الأنسجة النباتية يعود بشكل رئيس إلى تراكم بعض نواتج الاستقلاب الثانوية عموماً والفينولات خصوصاً في وسط الزراعة (Ali وزملاؤه، 2003)، نتيجة نشاط بعض الأنزيمات مثل البولي فينول أوكسيداز (Poly-phenoloxidase (PPO والبيريوكسيداز (Peroxidase (POD التي تشارك في تحفيز أكسدة المركبات الفينولية واسمرار الأنسجة النباتية، ويرتبط ذلك بشكل رئيس بتركيز السكروز المضاف إلى الوسط المغذي، فكلما زاد تركيز السكروز عن حد معين زاد تركيز المركبات الفينولية، وبالتالي فإن معدل النمو العام للخلايا ينخفض بشكل ملحوظ مع زيادة تركيز الفينولات، التي تؤدي في النهاية إلى تماوت الخلايا النباتية، تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Aly وزملاؤه، 2010) على مزارع المعلمات الخلوية لنبات البنج المصري (*H. muticus*)، حيث وجد أن معدل النمو المرتفع للخلايا يتوافق مع القوام المتماسك للكالوس وحينما يتراجع معدل النمو في المزرعة الخلوية يكون الكالوس الهش سهل التفتت هو السائد، كما تتفق مع نتائج دراسة كل من Julkunen (1996) على نبات الصفصاف ذو الأوراق السوداء (*Salix*) و نتائج Yildiz وزملاؤه (2007) على نبات الشوندر السكري (*Sugar beet*) و نتائج (Beta vulgaris)، الذين أكدوا على زيادة مساحة الكتل الخلوية المسمرة تدريجياً بزيادة تركيز السكروز في وسط الزراعة، بينما أكد Bryant وزملاؤه (1983) أن إتاحة الكربوهيدرات في وسط الزراعة عامل رئيس لتراكم نواتج الاستقلاب الثانوية.

## 2.6. ديناميكية نمو الكالوس في الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو:

يبين الشكل (12) أنّ تابع النمو لخلايا الكالوس في جميع الأوساط المختبرة اتخذت شكل التابع السيني Sigmoid، المؤلف من ثلاثة أطوار رئيسية: الطور المتلكئ (Lag Phase 0-15 يوم)، والطور الأسّي (Exponential Phase 15-35 يوم)، و طور الثبات (Platue Phase 35-50 يوماً) والذي يوضح العلاقة بين الوزن الرطب للخلايا وفترة التحضين.



الشكل رقم (12): ديناميكية نمو الخلايا في مزارع الكالوس لنبات البنج الذهبي (*H. aureus*) خلال 50 يوماً

الجدول رقم (12): متوسط الوزن الرطب في التجمعات الخلوية خلال مراحل عمرية مختلفة

| الوسيط<br>العمر (يوم) |    | 5C01                | 5C                   | 6C                  | 10C                 | L.s.d<br>1% |
|-----------------------|----|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-------------|
| الطور المتكثف         | 0  | 6.09 <sup>a</sup>   | 6.197 <sup>a</sup>   | 6.17 <sup>a</sup>   | 6.317 <sup>a</sup>  | 0.404       |
|                       | 5  | 8.6 <sup>a</sup>    | 6.66 <sup>ab</sup>   | 6.243 <sup>b</sup>  | 7.1 <sup>a</sup>    | 2.075       |
|                       | 10 | 12.885 <sup>a</sup> | 10.617 <sup>b</sup>  | 9.777 <sup>bc</sup> | 9.507 <sup>c</sup>  | 1.633       |
| الطور الأسّي          | 15 | 20.515 <sup>a</sup> | 15.383 <sup>b</sup>  | 14.643 <sup>b</sup> | 12.341 <sup>b</sup> | 4.676       |
|                       | 20 | 26.105 <sup>a</sup> | 16.503 <sup>a</sup>  | 23.27 <sup>b</sup>  | 15.945 <sup>b</sup> | 6.236       |
|                       | 25 | 52.825 <sup>a</sup> | 45.937 <sup>a</sup>  | 30.333 <sup>b</sup> | 26.096 <sup>b</sup> | 11.871      |
|                       | 30 | 50.155 <sup>a</sup> | 48.73 <sup>a</sup>   | 48.127 <sup>a</sup> | 32.179 <sup>b</sup> | 7.263       |
|                       | 35 | 54.815 <sup>a</sup> | 50.113 <sup>ab</sup> | 48.38 <sup>b</sup>  | 35.870 <sup>c</sup> | 7.667       |
| طور الثبات            | 40 | 53.61 <sup>a</sup>  | 51.41 <sup>a</sup>   | 44.347 <sup>b</sup> | 40.032 <sup>c</sup> | 3.985       |
|                       | 45 | 54.415 <sup>a</sup> | 54.013 <sup>a</sup>  | 46.71 <sup>b</sup>  | 40.679 <sup>c</sup> | 7.516       |
|                       | 50 | 55.86 <sup>a</sup>  | 57.35 <sup>a</sup>   | 56.613 <sup>a</sup> | 43.554 <sup>b</sup> | 11.130      |

الأحرف المتشابهة ضمن السطر الواحد تدل على عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى معنوية 1%

يُلاحظ من الجدول (12) تفوق الشاهد 5C<sub>01</sub> معنوياً في وزن الكتلة الخلوية بالمقارنة مع الوسط 5C في عمر (10 و 15 يوماً) في حين كان التفوق غير معنوياً في باقي الأعمار، كما كان تفوق الشاهد معنوياً في معظم مراحل النمو بالمقارنة مع الوسط 6C (الأيام: 5، 10، 15، 20، 25، 35، 40، 45 يوماً). أما بالنسبة للوسط 10C فقد كان تفوق الشاهد معنوياً في كل المراحل العمرية باستثناء بداية الطور المتكئ (0-5 أيام).

وقد تراوح الوزن الرطب للكتلة الخلوية في الطور الأسّي بين (20.515 - 54.815) غ في الشاهد 5C<sub>01</sub> بالمقارنة مع (15.383 - 50.113) و (14.643 - 48.38) و (12.341 - 35.870) غ في الأوساط 5C، 6C، 10C على التوالي، على الرغم من تقارب الوزن الرطب للكتلة الخلوية في اليوم الأول من عمر مزارع الكالوس (قاربة 6 غ)، في حين تقارب الوزن الرطب للكتلة الخلوية في اليوم الخمسين (نهاية طور الثبات) في كل من الشاهد 5C<sub>01</sub> والأوساط 5C، 6C، وبدون فروقات معنوية بينها، بينما كان هناك فروقات معنوية بين الأوساط 5C<sub>01</sub>، 5C، 6C والوسط 10C.

تبين النتائج أنّ الخلايا في البداية تتعرض لفترة سكون قصيرة في بداية الطور المتكئ Lag Phase، ثم تبدأ في الانقسام وتصل إلى الدرجة القصوى للانقسام في الطور الأسّي Exponential Phase وبعدها تصل إلى مرحلة طور الثبات الذي يزداد فيها عدد الخلايا وكتلتها الحيوية بشكل قليل، وهذا ما أكدّه الرفاعي والشوبكي (2002). وقد بلغت ذروة انقسام الخلايا في الطور الأسّي (15 - 35 يوم)، ويفسر ذلك بأنّ معدلات استقلاب الخلية تزداد في هذا الطور، ويزداد تراكم العوامل المشجعة على الانقسام لتكوين كتلة خلوية بأعداد كبيرة من الخلايا. ومن المعلوم أن سلوكية وتركيب وبيوكيميائية خلايا الكالوس تختلف عند مرورها في مراحل النمو الثلاث لوجود خلايا مُتباينة في ملامحها المظهرية وحالتها الفيزيولوجية في كل مرحلة، كما تؤثر مكونات الوسط في مدة بقاء الكالوس في مرحلة ما، لذلك من الضروري التعامل مع مزارع الكالوس بمرحلة تطويرية مُحددة.

ويعزى تفوق الوسط الشاهد 5C<sub>01</sub> بوزن الكتلة الخلوية إلى غناه بمنظمات النمو (Kin، NAA) والفيتامينات والأحماض الأمينية (Casein، Glycine، P.P، B6، Myo-Inositol)

المستعملة بالمقارنة مع الأوساط الأخرى المختبرة والخالية من منظمات النمو، فقد أشار العديد من الباحثين إلى أن B6 و P.P و Myo-Inositol مركبات بغاية الأهمية في أوساط الزراعة النسيجية (George وزملاؤه، 2008)، وهذا ما أكده Eriksson (1965) في دراسته على نبات *Haplopappus*، حيث أشار إلى ضرورة إضافة B6 و Myo-Inositol مع B1 إلى وسط الزرع الخلوي لتحقيق أفضل نمو للأجزاء النباتية المزروعة، كما وجد أن محتوى الوسط المغذي من عوامل النمو لا سيما تركيز ونوعية منظمات النمو والنسبة بينهما هو العامل المحدد الرئيس لعملية استحداث أنسجة الكالوس من الأجزاء النباتية (Centeno وزملاؤه، 1996)، حيث يعمل الأوكسين على استطالة الخلية من خلال تأثيره في مرونة الجدار الخلوي نتيجة تسببه بزيادة نشاط بعض الأنزيمات المقللة لمرونة الجدر الخلوية التي تنشط عندما تنخفض درجة حموضة الجدر الخلوية (Lee وزملاؤه، 2000) مثل أنزيم (Xylogucan Endotrans Glycosylase)، من خلال تحريض الأوكسين وبشكل غير مباشر نشاط أنزيمات ATPase في الجدر الخلوية المسؤولة بشكل مباشر عن نقل أيونات الهيدروجين والهيدروكسيل، فضلاً عن دوره في زيادة معدل النفاذية الخلوية للأيونات والبروتونات الأخرى، ومن ثم تحفيز التبادل الأيوني فتسهم في خفض قيمة الجهد الحلوي داخل الخلايا، مسببة دخول الماء من الوسط المحيط إلى الخلايا لتزيد ضغط الامتلاء داخلها وبالتالي زيادة استطالة الخلايا، بالإضافة لدوره المباشر في استقلاب RNA وتخليق بروتينات جديدة عن طريق نسخ mRNA جديد (الشحاذة العودة وزملاؤه، 2016)، بينما تشجع السيتوكينينات الانقسام الخلوي والبناء الحيوي لل RNA والبروتينات (Rossignol وزملاؤه، 1991). إلا أن وجود كل من الأوكسينات والسيتوكينينات ضروري ليشجع كلاهما عمل الآخر، حيث يكون التأثير المنشط لأحدهما ضعيفاً إذا وجد بمفرده. وهذا يتفق مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى أن للوسط المغذي تأثير كبير في نشوء الكالوس وإدامته اعتماداً على مكونات الوسط المغذي من جهة ونوع ومصدر الجزء النباتي من جهة أخرى (المختار، 2008؛ عطية وزملاؤه، 2002؛ بكر وزملاؤه، 2001؛ فهمي، 2003؛ يونس ومزاحم، 2001؛ Ajungla وزملاؤه، 2009).

ويعزى بالمقابل نجاح تشكل الكالوس وقوة نموه على الأوساط المختبرة الخالية من منظمات النمو إلى توليفة العناصر الداخلة في تركيب الأوساط (5C-6C-10C) بالمقارنة مع وسط MS

(Murashige و Skoog، 1962)، حيث تحتوي هذه الأوساط على تركيز مرتفع من العناصر المعدنية المغذية مثل عنصر الآزوت، الذي يدخل في بناء الأحماض الأمينية والنوية والبروتينات والأنزيمات المساعدة (Coenzymes). وهذا يتفق مع ما أكده Hilton و Rhodes (1994) في دراستهما على المزارع الخلوية لأنواع الداتورة *Datura*. بالإضافة إلى ذلك، تحتوي الأوساط المغذية المختبرة على تراكيز مرتفعة من السكروز Sucrose (50، 60 غ.ل<sup>-1</sup>) على التوالي بدلاً من 30 غ في وسط MS المستخدم في معظم مختبرات الزراعة النسيجية (Murashige و Skoog، 1962)، وهذا يتوافق مع نتائج Beshar وزملائها (2014) على نبات البنج *H. aureus*، حيث يعد السكروز مصدر الكربوهيدرات الأساسي للخلية النباتية ليزودها بالطاقة اللازمة للنمو والبقاء، من خلال تحلله إلى مركبات أبسط ويرافق ذلك تحرر (ATP) الذي يستخدمه الجزء المزروع في فعالياته الحيوية (محمد وعمر، 1990). فضلاً عن أن الأجزاء النباتية المزروعة في الزجاج (*In Vitro*) تكون غيرية في تغذيتها وتعتمد على ما يوفره الوسط المغذي من مركبات عضوية لها. وقد أشار Hilton و Rhodes (1994) في دراستهما على نباتات البنج الأسود (*H. niger*) Black henbane ومزارع الجذور المحورة لنبات الداتورة سترامونيوم *D. stramonium* أن زيادة تركيز السكروز في وسط الزراعة النسيجية يزيد من الكتلة الحيوية المنتجة.

بينما يعزى انخفاض مقدار النمو في الوسط 10C بالمقارنة مع باقي الأوساط إلى مجموعة عوامل، أهمها أن الوسط 10C يحوي تركيز أعلى من السكروز 100 غ.ل<sup>-1</sup> بالمقارنة مع 50 و 60 غ.ل<sup>-1</sup> في الأوساط الأخرى، ما ثبط عمليات نمو الخلايا في المزارع النسيجية، نتيجة زيادة الجهد الحلولي Osmotic potential الذي يؤدي إلى حدوث ظاهرة البلازمة Plasmolysis في الخلايا نتيجة خروج الماء منها إلى الوسط المحيط حسب فرق التدرج في الجهد المائي، ما يؤدي إلى تراجع ضغط الامتلاء Turgor pressure داخل الخلايا النباتية الضروري لاستطالتها، وبالتالي توقف نموها (العودة وخيتي، 2007 ; Zouine و EL-Hadrami، 2004 ; AL Maarri – و AL-Ghamdi، 1997). وهذا ما يتوافق مع نتائج Short و Warburton (1987) حول تأثير تراكيز مختلفة من السكروز في نمو ووزن الخلايا في المزارع الخلوية لنباتي القرنبيط Cauliflower (*Brassica oleracea var botrytis*) والأقحوان Feverfew

(*Chrysanthemum morifolium*) كذلك تتوافق مع نتائج Jayabalan و Baskaran (2005) في دراستهما على نبات *Eclipta alba* ونتائج Nowak وزملائه (2004) في دراستهم على نبات الخوخ (*Prunus domestica*) Peach. وبشكل عام، وجود السكريات في وسط الزراعة الخلوية ضروري كمصدر طاقة وكربوهيدرات وعوامل ضابطة للضغط الحلولي بتراكيز معينة (Gibson ، 2000).

بالإضافة إلى أن الوسط 10C يحتوي على كمية أكبر من الأزوت بصورة نترات ( $\text{NO}_3^-$ ) وأمونيا ( $\text{NH}_4^+$ )، فقد بيّنت الدراسات أنّ إضافة التراكيز المرتفعة من نترات الأمونيوم من الممكن أن تحول دون نمو الخلايا، وذلك لأنّ الأمونيوم سهل التراكم داخل الأنسجة النباتية ليصبح بتراكيز سامة إذا لم يتم استقلابه مباشرة، وبذلك عندما يكون تركيزه منخفضاً في وسط الزراعة فإن معظم الكمية تستفيد منها الخلايا في عمليات الاستقلاب وتصنيع الأحماض الأمينية، وعلى العكس إذا وجد بتراكيز مرتفعة فإنّ جزءاً بسيطاً منه فقط يتم استقلابه من قبل الخلايا (Nagella و Murthy ، 2010، Bensaddek وزملاؤه، 2001). وهذا يتوافق مع نتائج Napaporn وزملاؤه (2014) على نبات الكرمة (*Vitis vinifera*) Grapes. في حين بين Narayan و Venkataraman (2002) أنّ إجمالي محتوى الأزوت في وسط الزرع هو أحد العوامل المسببة للتحكم في درجة حموضته وبالتالي تحفيز تشكل الكالوس وتطوره في الزراعة النسيجية للعديد من النباتات .

من جهة أخرى، يحتوي الوسط 10C كذلك خمسة أضعاف ما تحتويه الأوساط الأخرى من الثيامين B1، حيث تؤثر زيادة تركيز الثيامين عن حدٍ معين في وسط الزراعة النسيجية سلباً في نمو الخلايا ووزنها، وهذا ما أثبتته Al-Khayri (2001) في دراسته على نخل التمر palm (*Phoenix dactylifera*).

بشكلٍ عام، يمكن تفسير نمو الكالوس في أوساط مغذية خالية من منظمات النمو النباتية بظاهرة التطبع الهرموني Hormone Habituation، وهي حالة تحصل كنتيجة لاستمرار نمو الكالوس في وسط الإدامة بوجود منظمات النمو، حيث تتمكن خلايا الكالوس وبمرور الزمن من النمو في وسط خالٍ من المنظمات، وتُفيد هذه الظاهرة بتقليل أو حذف كلفة منظمات النمو وتقليل

خطوات العمل والتخلص من احتمالية الخطأ في تحضير تراكيز مُنظمات النمو وغيرها (Kevers وزملاؤه، 1996).

ومن الدراسات حول التطبع الهرموني في النبات قامت كل Syono و Furuya (1974) بمعالجة نوعين من أنسجة كالوس نبات التبغ *Tobacco*: نوع A المعامل بتركيزات مرتفعة من NAA و 2,4-D لفترات زمنية قصيرة، ونوع B المعامل بتركيز منخفض من IAA لفترات طويلة، ومن ثم تتميته على وسط مدعم بالسيتوكينينات Cytokinins، وقد أشارت نتائج دراستهما على أن الكالوس من النمط B تمكن من النمو في وسط مغذي يحوي تركيز مرتفع من السيتوكينينات Cytokinins في غياب IAA بينما لم يتمكن الكالوس من النمط A من النمو في نفس الوسط.

### 3.6. التحديد الكمي والنوعي لقلويدات التروبان Tropane Alkaloids:

#### 1.3.6. تركيز الهيوسيامين Hyoscyamine في الخطوط الخلوية Cellular Lines

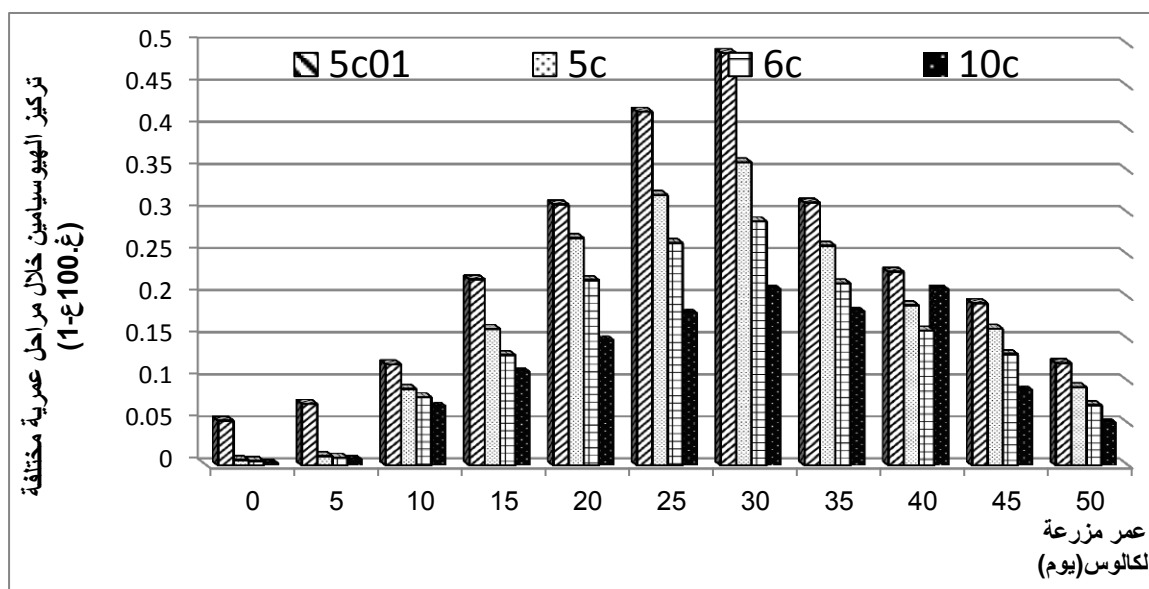
##### لكالوس نبات البنج الذهبي *H.aureus* خلال 50 يوماً:

تبين النتائج الموضحة في الجدول (13) والشكل (13) تفوق الخط الخلوي الشاهد (5C<sub>01</sub>) بالمقارنة مع الخطوط الخلوية الأخرى بمحتواه من الهيوسيامين Hyoscyamine في معظم مراحل النمو، حيث تراوح إنتاج الهيوسيامين في الطور المتكئ (0-15 يوماً) (0.0530 - 0.1200%) و(0.0063 - 0.0910%) و(0.0053 - 0.0810%) و(0.0030 - 0.0710%) من الوزن الجاف في الخطوط الخلوية 5C<sub>01</sub>، 5C، 6C، 10C على التوالي، كما كان تفوق الشاهد (5C<sub>01</sub>) معنوياً في مرحلة الطور الأسّي، إذ بلغ إنتاج الهيوسيامين أقصى تركيز له بعمر 30 يوماً ليسجل (0.4900%) و(0.3600%) و(0.2900%) و(0.2100%) من الوزن الجاف في الخطوط الخلوية 5C<sub>01</sub>، 5C، 6C، 10C على التوالي، ثم يبدأ بالانخفاض بعد ذلك حتى نهاية طور الثبات.

الجدول رقم (13): تركيز الهيوسيامين في الخطوط الخلوية المدروسة خلال مراحل عمرية مختلفة

| Age (day)<br>Medium              | Hyoscyamine (g/100 g) |                      |                     |                     |                     |                      |                           |                     |                      |                     |                     |
|----------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
|                                  | الطور المتكئ          |                      |                     | الطور الأسّي        |                     |                      |                           |                     | طور الثبات           |                     |                     |
|                                  | 0                     | 5                    | 10                  | 15                  | 20                  | 25                   | 30                        | 35                  | 40                   | 45                  | 50                  |
| <b>Control (5C<sub>01</sub>)</b> | 0.0530 <sup>a</sup>   | 0.0730 <sup>a</sup>  | 0.1200 <sup>a</sup> | 0.2210 <sup>a</sup> | 0.3100 <sup>a</sup> | 0.42020 <sup>a</sup> | <b>0.4900<sup>a</sup></b> | 0.3121 <sup>a</sup> | 0.2300 <sup>a</sup>  | 0.1927 <sup>a</sup> | 0.1214 <sup>a</sup> |
| <b>5C</b>                        | 0.0063 <sup>b</sup>   | 0.0110 <sup>b</sup>  | 0.0910 <sup>b</sup> | 0.1620 <sup>b</sup> | 0.2700 <sup>b</sup> | 0.3212 <sup>b</sup>  | <b>0.3600<sup>b</sup></b> | 0.2611 <sup>b</sup> | 0.1900 <sup>ab</sup> | 0.1624 <sup>b</sup> | 0.0927 <sup>b</sup> |
| <b>6C</b>                        | 0.0053 <sup>b</sup>   | 0.0091 <sup>bc</sup> | 0.0810 <sup>b</sup> | 0.1310 <sup>c</sup> | 0.22 <sup>c</sup>   | 0.2641 <sup>c</sup>  | <b>0.2900<sup>c</sup></b> | 0.2161 <sup>c</sup> | 0.1600 <sup>bc</sup> | 0.1319 <sup>c</sup> | 0.0712 <sup>c</sup> |
| <b>10C</b>                       | 0.0030 <sup>b</sup>   | 0.0076 <sup>c</sup>  | 0.0710 <sup>b</sup> | 0.112 <sup>d</sup>  | 0.1500 <sup>d</sup> | 0.1817 <sup>d</sup>  | <b>0.2100<sup>d</sup></b> | 0.1837 <sup>d</sup> | 0.1200 <sup>c</sup>  | 0.0904 <sup>d</sup> | 0.0513 <sup>d</sup> |
| <b>L.S.D (0.01)</b>              | <b>0.0039</b>         | <b>0.0019</b>        | <b>0.0275</b>       | <b>0.0027</b>       | <b>0.0274</b>       | <b>0.0004</b>        | <b>0.0363</b>             | <b>0.0004</b>       | <b>0.0433</b>        | <b>0.0003</b>       | <b>0.0005</b>       |

الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية 1%



الشكل رقم (13): تركيز الهيوسيامين في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي خلال مراحل عمرية مختلفة

### 2.3.6. تركيز السكوبولامين Scopolamine في الخطوط الخلوية Cellular Lines لكالوس

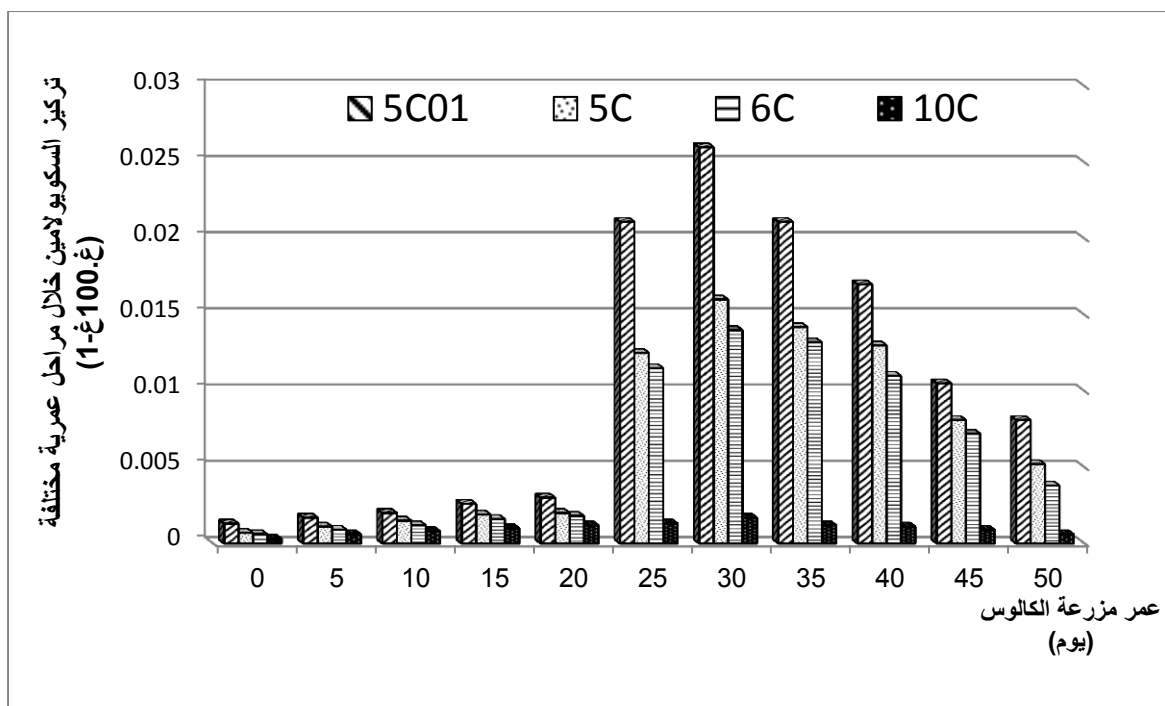
#### نبات البنج الذهبي *H.aureus* خلال 50 يوماً:

تبين النتائج الموضحة في الجدول رقم (14) والشكل (14) انخفاض تركيز السكوبولامين Scopolamine في الطور المتكئ وبداية الطور الأسّي بشكل عام بالمقارنة مع الهويسيامين، ويفسر ذلك بأن نوع البنج *Hyoscyamus* من الأنواع التي تصنع الهويسيامين كقلويد رئيس ومن ثم يتم تحويله إلى سكوبولامين في مراحل لاحقة (Rocha وزملاؤه، 2002؛ Hashimoto و Yamada، 2003)، كما تبين النتائج تفوق الشاهد 5C<sub>01</sub> بمحتواه من السكوبولامين في معظم مراحل النمو، حيث تراوح إنتاج السكوبولامين في الطور المتكئ (0-15 يوماً) (0.0013 - 0.0020%) و(0.0007 - 0.0015%) و(0.0006 - 0.0012%) و(0.0003 - 0.0008%) من الوزن الجاف في الخطوط الخلوية 5C<sub>01</sub>، 5C، 6C، 10C على التوالي، كما كان محتوى الكالوس من السكوبولامين الأعلى معنوياً خلال الطور الأسّي عند 30 يوماً من الزراعة (0.0260%)، تلاه وبفروقات معنوية الخططين الخليين 5C و 6C وبدون فروقات معنوية بينهما (0.0160%) و(0.0140%)، في حين كان الأدنى معنوياً في الخط الخلي (0.0017%) من الوزن الجاف، ليبدأ بالانخفاض بعد ذلك حتى نهاية طور الثبات.

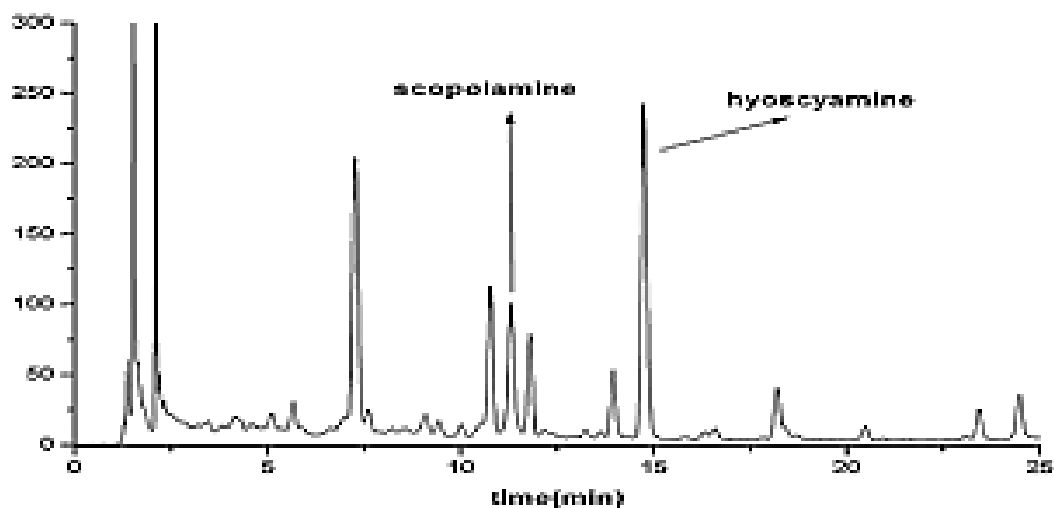
الجدول رقم (14). تركيز السكوبولامين في الخطوط الخلوية المدروسة خلال مراحل عمرية مختلفة

| Age (day)<br>Medium         | Scopolamine (g.100 g <sup>-1</sup> ) |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                             | الطور المتكئ                         |                     |                     | الطور الأسّي        |                     |                     |                     |                     | طور الثبات          |                     |                     |
|                             | 0                                    | 5                   | 10                  | 15                  | 20                  | 25                  | 30                  | 35                  | 40                  | 45                  | 50                  |
| Control (5C <sub>01</sub> ) | 0.0013 <sup>a</sup>                  | 0.0017 <sup>a</sup> | 0.0020 <sup>a</sup> | 0.0026 <sup>a</sup> | 0.0030 <sup>a</sup> | 0.0211 <sup>a</sup> | 0.0260 <sup>a</sup> | 0.0211 <sup>a</sup> | 0.0170 <sup>a</sup> | 0.0105 <sup>a</sup> | 0.0081 <sup>a</sup> |
| 5C                          | 0.0007 <sup>ab</sup>                 | 0.0011 <sup>b</sup> | 0.0015 <sup>a</sup> | 0.0019 <sup>b</sup> | 0.0020 <sup>a</sup> | 0.0125 <sup>b</sup> | 0.0160 <sup>b</sup> | 0.0142 <sup>b</sup> | 0.0130 <sup>b</sup> | 0.0081 <sup>b</sup> | 0.0052 <sup>b</sup> |
| 6C                          | 0.0006 <sup>ab</sup>                 | 0.0009 <sup>b</sup> | 0.0012 <sup>a</sup> | 0.0016 <sup>b</sup> | 0.0018 <sup>a</sup> | 0.0115 <sup>c</sup> | 0.0140 <sup>b</sup> | 0.0132 <sup>c</sup> | 0.0110 <sup>b</sup> | 0.0072 <sup>c</sup> | 0.0038 <sup>c</sup> |
| 10C                         | 0.0003 <sup>b</sup>                  | 0.0006 <sup>c</sup> | 0.0008 <sup>a</sup> | 0.0010 <sup>c</sup> | 0.0012 <sup>a</sup> | 0.0013 <sup>d</sup> | 0.0017 <sup>c</sup> | 0.0012 <sup>d</sup> | 0.0011 <sup>c</sup> | 0.0009 <sup>d</sup> | 0.0006 <sup>d</sup> |
| L.S.D (0.01)                | 0.0009                               | 0.0003              | 0.0014              | 0.0004              | 0.0020              | 0.0003              | 0.0034              | 0.0003              | 0.0024              | 0.0003              | 0.0003              |

الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى 1%



الشكل رقم (14): تركيز السكوبولامين في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي خلال مراحل عمرية مختلفة



الشكل رقم (15): المخطط الكروماتوغرافي بواسطة جهاز HPLC لكل من الهيسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine في الخط الخلوي 5C01 عند اليوم 30 من الطور الأساسي

يعود تفوق الخط الخلوي الشاهد 5C<sub>01</sub> على الخطوط الخلوية 5C، 6C، 10C بإنتاجه القلويدي إلى غنى الوسط بمنظمات النمو (KIN, NAA) والفيتامينات والأحماض الأمينية (Myo-Inositol, B6, P.P, Glycine, Casein) بالمقارنة مع الأوساط الأخرى (5C، 6C 10C) الخالية من منظمات النمو، حيث يحفز وجود هذه المركبات بتركيز مناسبة تراكم نواتج الاستقلاب الثانوي، ويرجع ذلك إلى أن منظمات النمو ترفع من الإنتاج الكلي للقلويدات من خلال المساعدة على تنشيط إنتاج الأحماض الأمينية مثل الأورنيثين Ornithine الذي هو أساس بناء قلويدات التروبان، كما أن منظمات النمو النباتية لا سيما السيبتوكينينات تنشط المورثات المسؤولة عن إنتاج أنزيم PMT الأنزيم المفتاحي الأول في مسار تخليق قلويدات التروبان (Sarah و Elizabet، 2009)، وأنزيم H6H المسؤول عن تحويل الهيسوسيامين Hyoscyamine إلى سكوبولامين Scopolamine (Scalla، 1991)، وهذا يتفق مع نتائج كل من Abrahamian و Kantharajah (2011) و Cardillo وزملاؤه (2010) حول تأثير منظمات النمو في الإنتاج القلويدي في بعض نباتات المنتجة لها، كما أن الأوكسين يزيد من معدل الإيثيلين من خلال تحفيز أنزيم ACC Synthase الذي يعمل على تخليق الأحماض الأمينية العطرية في النبات، مثل فينيل ألانين (طليعة التروبيك أسيد Tropic acid)، وهذا بدوره يزيد من تراكم القلويدات في الخلايا النباتية، مثلما هو الحال في خلايا *Sommiferum* *C. roseus* و *Papaver*، *Eschsholtzia California* (Piatti وزملاؤه، 1991) و *Aly* (Yahia وزملاؤه، 1998، Zhang وزملاؤه، 2004)، تتوافق هذه النتائج مع دراسة Aly وزملاؤه (2010) على نبات البنج المصري (*H. muticus*)، حيث بينوا أن استعمال BA و NAA حسن نمو الخلايا وإنتاجها من القلويدات، كما تتوافق مع ما توصل إليه Iranbakhsh وزملاؤه (2007) في دراستهم على قلويدات التروبان (TAs) في مزارع المعلقات الخلوية لنبات الداتورة سترامونيوم (*D. stramonium*)، حيث كان أفضل إنتاج لقلويدات التروبان (TAs) في الأسبوع الثالث بعد الزراعة.

ويعزى تغير المحتوى القلويدي في الخطوط الخلوية 5C و 6C و 10C بالمقارنة مع الشاهد 5C<sub>01</sub> إلى تأثير محتوى الوسط من السكريز والعناصر المغذية (الجدول، 15).

الجدول رقم (15): محتوى الأوساط الكلي من السكريز والعناصر المعدنية الكبرى والصغرى

| Callus line                 | Macroelements g.L <sup>-1</sup> |        |       |       |        | Microelements mg.L <sup>-1</sup> |                                |                   | Sucrose g.L <sup>-1</sup> |
|-----------------------------|---------------------------------|--------|-------|-------|--------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------|---------------------------|
|                             | N                               | P      | K     | Mg    | Ca     | Mn                               | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> | CoCl <sub>2</sub> |                           |
| Control (5C <sub>01</sub> ) | 0.592                           | 0.1852 | 0.462 | 0.101 | 0.1528 | 24                               | 6.2                            | 0.025             | 50                        |
| 5C                          | 0.592                           | 0.1852 | 0.462 | 0.101 | 0.1528 | 24                               | 6.2                            | 0.025             | 50                        |
| 6C                          | 0.767                           | 0.1852 | 0.461 | 0.121 | 0.1528 | 22                               | 12                             | 0.055             | 60                        |
| 10C                         | 1.172                           | 0.1243 | 0.153 | 0.262 | 0.1528 | 22                               | 11.5                           | 0.01              | 100                       |

- تأثير تركيز السكريز Effect of Sucrose: يتبين من الجدول (15) ارتفاع محتوى الوسطين 6C و 10C من السكريز (60 و 100 غ.ل<sup>-1</sup>)، الذي يفوق محتوى الوسطين 5C<sub>01</sub> و 5C (50 غ.ل<sup>-1</sup>)، والمعروف أن التركيز المرتفع عن حد معين من السكريز يثبط عمليات نمو الخلايا في المزارع النسيجية، نتيجة زيادة الجهد الحولي Osmotic potential الذي يؤدي إلى حدوث ظاهرة البلزمة Plasmolysis في الخلايا، نتيجة خروج الماء منها إلى الوسط المحيط حسب فرق التدرج في الجهد المائي، ما يؤدي إلى تراجع ضغط الامتلاء Turgor Pressure داخل الخلايا النباتية الضروري لاستطالتها، وبالتالي توقف النمو، تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه كل من Zouine و EL-Hadrami (2004) و AL Maarri و Al Ghamdi (1997) والشحاذة العودة وزملاؤه (2016). وفي دراسة على مزارع الجذور الشعرية لنبات البنج المصري (*H. muticus*) باستعمال تراكيز مختلفة من السكريز، بينت النتائج وجود علاقة عكسية بين تركيز السكريز في الوسط المغذي مع تركيز القلويدات المنتجة، ما يؤكد أن إنتاج كتلة كبيرة من الخلايا (Biomass) يتطلب استعمال تركيز مرتفع من مصدر الطاقة، في حين أن الحصول على تركيز مرتفع من القلويدات يتطلب استعمال تركيز منخفض من مصدر الطاقة في وسط الزراعة (Pavlov وزملاؤه، 2009: Dehghan وزملاؤه، 2012).

كما تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه Kinsara و El-Naser (1990) على مزارع المعلقات الخلوية لنبات البنج الأبيض (*H. albus*) باستعمال تراكيز مختلفة من السكريز، حيث بيّنا وجود علاقة عكسية بين معدل النمو وتراكم نواتج الاستقلاب الثانوية من جهة، وبين تركيز

السكروروز Sucrose في الوسط المغذي مع تركيز القلويدات المنتجة من جهة أخرى، كما كان أعلى إنتاج للقلويدات في نهاية الأسبوع الثالث من عمر المزرعة الخلوية.

بينما بين Helton و Rhodes (1995) أنّ زيادة تركيز السكروروز في مزارع البنج الأسود (*H. niger*) أدت إلى زيادة الكتلة الخلوية وتراكم السكوبولامين Scopolamine، وفسرا ذلك بأنّ السكروروز في وسط الزراعة يزيد من المقدرة على التمثيل الغذائي (عمليات الاستقلاب والبناء)، وأن التغذية السكرية تحول دون منع حدوث هذه العمليات الضرورية، كما أنها تزيد المقدرة على التمثيل الغذائي بشكل كبير، وبخاصة بوجود السكروروز منتجة حمض التربيك Tropic Acid والعديد من العوامل المساعدة، كما تمنع الضرر الناتج عن زيادة القلوية (Maldonado و Loyola، 1995).

♦ تأثير الآزوت Effect of Nitrogen: يتبين من الجدول (15) أنّ محتوى الوسط 10C من الآزوت الكلي أكثر بمقدار ضعف من محتوى الوسطين 5C<sub>01</sub> و 5C، حيث بلغ 1.175 غ.ل<sup>-1</sup> في الوسط 10C بالمقارنة مع 0.767 غ.ل<sup>-1</sup> في الوسط 6C و 0.592 غ.ل<sup>-1</sup> في كل من الوسطين 5C<sub>01</sub> و 5C، ويتواجد الآزوت في الوسط المغذي بصورتين:

■ الأولى بصورة نترات (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>): ويفسر التركيز المنخفض لقلويدات التربان (TAs) في الوسط 10C بالارتباط السلبي بين تركيز النترات في وسط الزراعة وتركيز قلويدات التربان، نظراً لزيادة متطلبات المزارع الخلوية لطاقة التمثيل لامتصاص وخفض تركيز شوارد النترات والمشاركة في تركيب الأحماض الأمينية (Adibfar وزملاؤه، 2011)، لذلك فبعد التزود بالطاقة الكافية واللازمة لعمليات التمثيل الغذائي يمكن استعمال الطاقة المتبقية لتخليق نواتج الاستقلاب الثانوية، فعلى الرغم من أهمية الآزوت في مزارع الخلايا والأنسجة كعنصر حيوي لتركيب الأحماض الأمينية والبروتينات والأحماض النووية (Shimomura و Sauerwein، 1991)، إلا أن تراكم الهوسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine يزداد بتناقص تركيز النترات في وسط الزراعة، ويفسر ذلك ربما بزيادة النشاط في مسار التخليق الحيوي لهذه المركبات أو انخفاض معدل التدهور عند التراكيز المنخفضة من النترات حسب ما أكده Chashmi وزملاؤه (2010) في دراسته على نبات الأتروبا *A. belladonna*. وهذا ما

أكده كل من Bensaddek وزملاؤه (2001) على نبات الأتروبا *A. belladonna* و Demeyer و Dejaegere (1998) على نبات الداتورة *D. stramonium*. تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Iranbakhsh وزملاؤه (2007) في دراسته على قلويدات التربوبان TAs في مزارع المعلقات الخلوية لنبات *D. stramonium*، حيث تتناقص تركيز القلويدات بزيادة تركيز النترات المضافة إلى الوسط المغذي، وكان أفضل إنتاج لقلويدات التربوبان في الأسبوع الثالث بعد الزراعة. أما Galapian و Majd (2003) و Adibfar وزملاؤه (2011) بينوا أن وسط الزراعة الذي يحتوي النترات حسن من معدل نمو الجذور والتكشف في مزارع الجذور لنبات البنج الأسود (*H. niger*)، في حين قابله انخفاض بتركيز القلويدات المنتجة .

■ والصورة الثانية لتواجد الآزوت في الوسط المغذي هو بشكل أمونيا ( $\text{NH}_4^+$ ): فقد بينت الدراسات أن الأمونيوم سهل التراكم داخل الأنسجة النباتية ليصبح بتركيز سامة إذا لم يتم استقلابه مباشرة، وبذلك عندما يكون تركيزه منخفضاً في وسط الزراعة فإن معظم الكمية تستفيد منها الخلايا في عمليات الاستقلاب وتصنيع الأحماض الأمينية، وعلى العكس إذا وجد بتركيز مرتفعة فإن جزءاً بسيطاً منه فقط يتم استقلابه من قبل الخلايا (Murthy و Nagella، 2010، Bensaddek وزملاؤه، 2001). وهذا يتوافق مع نتائج Napaporn وزملاؤه (2014) على نبات الكرمة (*Vitis vinifera*) Grapes. بينما أشار Helton و Rhodes (1995) إلى أن شوارد الأمونيوم تمتص بشكل كامل من وسط الزراعة في عدد من المزارع النسيجية لنبات الداتورة *Datura*، وأن الأمونيوم من المحتمل أن تكون مادة تفاعل في مسار تخليق قلويدات التربوبان.

وبذلك نجد أن الآزوت من أكثر العناصر المؤثرة في كافة العمليات الوظيفية في النبات كالتمثيل الغذائي والنمو والتطور، لكن التركيز المرتفع منه يخفض الكتلة الحيوية للنبات. وهذا يتوافق مع نتائج Alaghemand وزملاؤه (2013) في دراسته على نبات البنج الأسود (*H. niger*) . كما تعد القلويدات تتعبّر مخازن احتياطية للأزوت يستخدمه النبات بصورة نترات عند نقص الإمداد به، ما يفسر سبب زيادة الكتلة الخلوية بزيادة تركيز النترات حتى حد معين، بفضل أنزيم مختزل النترات Nitrate Reductase أحد الأنزيمات المهمة في النبات، والذي يعمل على تمثيل الآزوت وبالتالي تحفيز النمو، حيث هدف عملية الاستقلاب هو تحقيق النمو وإنتاج الكتلة

الخلوية، وبوجود العوامل المشجعة مثل النترات يزداد وينخفض تركيز القلويدات تبعاً لمرحلة نمو الخلايا (أبو زيد، 2006).

♦ تأثير المغنيزيوم والكالسيوم **Effect of Magnesium and Calcium**: يتبين من الجدول (15) أنَّ محتوى الوسط 10C من المغنيزيوم أعلى من باقي الأوساط، حيث بلغ 0.262 غ.ل<sup>-1</sup> في الوسط 10C بالمقارنة مع 0.121 غ.ل<sup>-1</sup> في الوسط 6C و 0.101 غ.ل<sup>-1</sup> في الوسطين 5C و 5C<sub>01</sub>، فعلى الرغم من أن عنصر المغنيزيوم له أهميته في تنشيط عمل بعض الأنزيمات مثل AMP pyrophosphorylase و Hexokinase و Glucokinase وغيرها (محمد أمين وزملاؤه، 2009; IPNI، 2007)، كما أنه يؤثر في تصنيع البروتينات وتكوين الصبغيات (IPNI، 2007)، ويساعد أيضاً في زيادة امتصاص الفوسفور وحركته داخل الخلايا النباتية فضلاً عن دوره في بناء جزيئات الـ ATP والأحماض النووية (Mahler، 2004)، ويزداد تركيزه في الأنسجة المولدة (المرستيمية)، إلا أن تأثير المغنيزيوم على إنتاج قلويدات التروبان مرتبط بعنصر الكالسيوم (Hank وزملاؤه، 2003، Pudersell وزملاؤه، 2012) والذي وجد بنسبة ثابتة في كافة الأوساط (جدول 16)، والكالسيوم معروف بتأثيره الإيجابي على تصنيع قلويدات التروبان من خلال دوره في تنظيم استقلاب الأحماض الأمينية (طلائع القلويدات) (Gontier وزملاؤه، 1994)، بالإضافة إلى تأثيره في وظائف الأنزيمات المعنية بتخليق القلويدات وتحولاتها، حيث افترض عدد من الباحثين أن التأثير الإيجابي للكالسيوم على إنتاج القلويدات يفسر من خلال تحفيزه لأنزيم بوتريسين ميثيل ترانسفيراز (PMT) Putrescine N-Methyltransferase الأنزيم الأول في مسار تخليق قلويدات التروبان (Gontier وزملاؤه، 1994; Liang وزملاؤه، 2008; Pinol وزملاؤه، 1999)، وتم تأكيد هذه الفرضية في مزارع الجذور الشعرية لنبات الداتورة سترامونيوم *D. stramonium* حيث لوحظ أن انخفاض إنتاج الهيسيامين الناتج عن نقص تركيز شوارد الكالسيوم قد ترافق بانخفاض فعالية الأنزيم (Pinol وزملاؤه، 1999).

لكن وجود علاقة ارتباط سلبية بين المغنيزيوم والكالسيوم لوجود فعل تضاد تجاه بعضهما البعض (Hank وزملاؤه، 2003; Pudersell وزملاؤه، 2012; Walker، 1994) أدى إلى انخفاض تركيز قلويدات التروبان بزيادة تركيز المغنيزيوم، كما أنَّ التغير في تركيز المغنيزيوم في

الوسط المغذي قد يغير من اتجاه مسار تخليق القلويدات من بوتريسين - تروبان (Putrescine to Tropane) إلى بوتريسين - سبيرميدين (Putrescine to Spermidine) (Pudersell) (وزملاؤه، 2012).

وهذا يتوافق مع نتائج دراسة Hank وزملاؤه (2003) في دراسته على نبات الأتروبا *A. belladonna*، حيث بيّن أنّ إنتاج الهيوسيامين تناقص تركيزه بازدياد تركيز سلفات المغنيزيوم، و دراسة Pudersell وزملائه (2012) التي بينت أن زيادة تركيز المغنيزيوم في وسط الزراعة قد سببت انخفاض تركيز كل من الهيوسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine على السواء في مزارع البنج الأسود (*H.niger*).

♦ تأثير البوتاسيوم **Effect of Potassium**: يتبين من الجدول رقم (15) أنّ محتوى الوسط 10C من البوتاسيوم أقل بمقدار الثلثين تقريباً بالمقارنة مع الأوساط 5C<sub>01</sub> و 5C و 6C، حيث بلغت كميته 0.153 غ.ل<sup>-1</sup> في الوسط 10C بالمقارنة مع 0.462 غ.ل<sup>-1</sup> في الوسطين 5C و 5C<sub>01</sub> و 0.461 غ.ل<sup>-1</sup> في الوسط 6C. وهذا المحتوى المنخفض من البوتاسيوم من المفروض أن يعمل على زيادة تخليق قلويدات التروبان، وذلك لتأثير النقص في تركيز أيون البوتاسيوم في زيادة كمية طلائع القلويدات (Bashir khana و Harborne، 1991)، وزيادة فعالية أنزيمي أورنثينين دي كربوكسيلاز (Ornithine Decarboxylase: EC 4.1.1.17) وأرجنين دي كربوكسيلاز (ADC Arginine Decarboxylase: EC 4.1.1.19) (Demeyer و Dejaegere، 1998)، وهما المسؤولان عن إنتاج البوتريسين Putrescine المركب الأول في مسار تخليق قلويدات التروبان (TAs)، الناتج من عمل أنزيم PMT على الحمض الأميني الأورنثينين Ornithine (طليعة قلويدات التروبان). وهذه الزيادة في مستويات البوتريسين Putrescine تدعم فكرة أن أيون البوتاسيوم ينظم فعالية العديد من الأنزيمات بما فيها الأنزيمات المعنية بالتخليق الحيوي للقلويدات من خلال تأثيرها في تشكيل البروتينات (Bashir khana و Harborne، 1991)، إلا أن التركيز المرتفع للنترات الموجودة في الوسط 10C بالمقارنة مع تركيزها في الوسطين 5C<sub>01</sub> و 5C عمل على تثبيط التأثير الإيجابي للتركيز المنخفض للبوتاسيوم في هذا الوسط، حيث العلاقة بين البوتاسيوم وتركيز قلويدات التروبان هي علاقة ارتباط سلبية تزداد بزيادة تركيز النترات في الوسط المغذي، وهذا يتوافق مع نتائج Iranbakhsh وزملائه (2007) في دراستهم على قلويدات التروبان (TAs) المنتجة من مزارع

المعلقات الخلوية لنبات الداتورة *D. stramonium*، بينما أشار Philippe وزملاؤه (1992) إلى أن زيادة تركيز النترات المترافقة مع البوتاسيوم لا تملك تأثيراً على إنتاج قلويدات التروبان .TAs

♦ **تأثير الفوسفور Effect of Phosphorus:** يتبين من الجدول (15) أن محتوى الوسط 10C من الفوسفور أقل بمقدار الثلث تقريباً بالمقارنة مع الأوساط 5C<sub>01</sub> و 5C و 6C، حيث بلغت كميته في الوسط 10C (0.1243 غ.ل<sup>-1</sup>) بالمقارنة مع (0.1852 غ.ل<sup>-1</sup>) في باقي الأوساط، وبالتالي ساهم انخفاض محتوى الوسط من الفوسفور في انخفاض تركيز قلويدات التروبان TAs، ويعزى ذلك إلى انخفاض معدلات التمثيل الغذائي للسكريات بانخفاض تركيزه، وانخفاض معدل تخزين الطاقة ونقلها، وتقليل معدل انقسام الخلايا ونموها، وتقليل نقل الصفات الوراثية، بسبب دوره بالغ الأهمية في تركيب الأحماض النووية DNA و RNA، ودخوله في كثير من التفاعلات الأنزيمية، وتركيب المركبات الفسفورية ذات الروابط الغنية بالطاقة (ADP و ATP)، وفي مرافقات الأنزيمات (NAD و NADP) المهمة في تفاعلات الأكسدة والاختزال، وفي تركيب بعض الدهون المفسفرة (Phospholipids) أهم مكونات الأغشية الخلوية، بالإضافة إلى قدرته على تحسين كفاءة امتصاص الخلايا للماء والعناصر المغذية الأخرى (Havlin و Halvorson، 1990).

♦ **تأثير الكوبالت Effect of Cobalt:** يتبين من الجدول (15) أن محتوى الوسط 10C من الكوبالت أقل بمقدار النصف تقريباً بالمقارنة مع الوسطين 5C<sub>01</sub> و 5C، وأقل بمقدار خمس تركيزه في الوسط 6C، حيث بلغت كميته 0.01 ملغ.ل<sup>-1</sup> في الوسط 10C بالمقارنة مع 0.025 ملغ.ل<sup>-1</sup> و 0.055 ملغ.ل<sup>-1</sup> في الأوساط 5C<sub>01</sub> و 5C و 6C على التوالي. وبالتالي ساهم انخفاض محتوى الوسط من الكوبالت في انخفاض تركيز قلويدات التروبان (TAs)، ويعزى ذلك إلى تأثير الكوبالت المحفز في تخليق نواتج الاستقلاب الثانوية (Mithofer وزملاؤه، 2004، Zhao وزملاؤه، 2005)، من خلال دوره كمكون أساسي في الأنزيمات ودوره في عمليات النمو والتمثيل الغذائي وتنظيم تراكم القلويدات في المزارع الخلوية للنباتات الطبية (Havlin وزملاؤه، 2014). وتتفق هذه النتائج مع Pitta-Alvarez وزملاؤه (2000) الذين أشاروا إلى زيادة محتوى السكوبولامين Scopolamine عند إضافة كلوريد الكوبالت إلى مزارع الجذور الشعرية لنبات *Brugmansia candida*.

♦ تأثير حمض البوريك **Effect of Boric Acid**: يتبين من الجدول (15) أنّ محتوى الوسطين 10C و 6C من حمض البوريك يعادل ضعف محتوى الوسطين 5C<sub>01</sub> و 5C. حيث بلغ تركيزه 11.5 ملغ.ل<sup>-1</sup> و 12 ملغ.ل<sup>-1</sup> في الوسطين 10C و 6C بالمقارنة مع 6.2 ملغ.ل<sup>-1</sup> في كل من 5C و 5C<sub>01</sub> على التوالي، ومن المعلوم أنّ عنصر البورون يدخل في تركيب الأغشية الخلوية وتنظيم عمل وانتقال الهرمونات والتفاعلات الأنزيمية، والانقسامات الخلوية في منطقة الأنسجة الميرستيمية ودخوله في تصنيع الكربوهيدرات والبروتين (Rainham، 2001؛ Wojcik و Wojcik، 2006)، ويقوم بتنشيط نقل السكريات والماء إلى داخل الخلايا النباتية، حيث انتقال السكريات المتحدة مع البورون يكون أسهل وأسرع من انتقال السكريات المستقطبة لوحدها بحال وجوده بالتركيز المطلوب للنبات (جندية، 2003؛ الشالط، 2006؛ العودة وخيتي، 2007)، لكن وجد تأثير سمي للبورون عند إضافته بتركيز مرتفعة أكثر من الحد الحرج للنبات (توما وعبد الجبار، 2004؛ William، 2005)، وهذا يفسر التأثير السلبي لزيادة تركيز البورون في الوسطين 10C و 6C، حيث أنّ انتقال السكريات يقل بزيادة تراكيز البورون (Patrick و Hening، 1998؛ Gibson و زملاؤه، 2001). إذ تنشط عملية تكوين الكربوهيدرات من خلال زيادة امتصاص العناصر الغذائية كالنتروجين والفسفور والبوتاسيوم لكن زيادة تركيز البورون يقلل انتقالها (Kumar و Bhushan، 1978).

بشكل عام، يفسر انخفاض تركيز القلويدات في مراحل النمو الأولى بأن الخلايا النباتية تستغل كل ما تمتصه من العناصر المغذية لبناء كتلة خلوية ومن ثم تقوم بتراكم القلويدات، تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه Al-Hashimi (1999) حول دور عمر المزرعة النسيجية في زيادة تركيز قلويدات التربان المنتجة من مزارع مستنباتات الجذور الشعرية لنبات الداتورة *D.stramonium*، حيث بينت نتائج التحليل الكروماتوغرافي ازدياد تركيز القلويدات كلما تقدمت المزرعة النسيجية بالعمر، وكان أقصى إنتاج للقلويدات في اليوم 28 من عمر المزرعة.

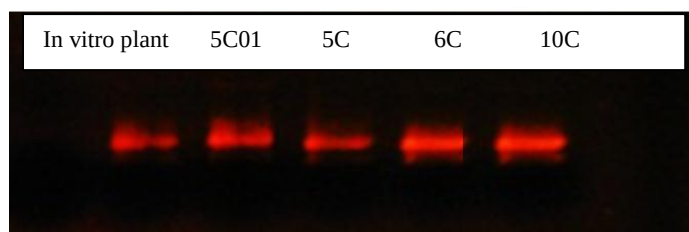
كما يفسر قدرة المزارع الخلوية على إنتاج السكوبولامين Scopolamine على الرغم من أن النوع النباتي الأم *H.aureus* من الأنواع الفقيرة بالسكوبولامين بأن التغيرات الكيميائية الحيوية التي تحدث في التجمعات الخلوية تتجاوز حدود الأنواع، بمعنى أن الخلايا ذات الجينوم المتبدل قد تكتسب سمات نموذجية لأفراد أنواع أخرى من الجنس نفسه، وفي حالتنا نجد أن المزارع الخلوية

قد تشابهت مع خلايا نوع البنج الأسود (*H. niger*) الغني بالسكوبولامين Scopolamine، وهذا يتوافق مع نتائج دراسة نفذت على الراوولفيا الثعبانية (*Rauwolfia serpentine*) المميزة بتراكم عشرات القلويدات وأهمها الريزبرين Reserpine، بينما الخلايا المستزرعة كانت قادرة على تراكم قلويدات قيّمة لم يكن للريزبرين Reserpine أي وجود فعلي بينها (Kunakh، 1996، 2005<sup>ab</sup>، 2008)، حيث شكل الأجمالين Ajmaline 90% من القلويدات المنتجة، وفي بعض الحالات تم إنتاج Vomelenin، فكانت بهذه السمة الكيمائية تشبه خلايا أنواع أخرى من جنس الراوولفيا مثل *R. canescens* و *R. vomitoria* اعتماداً على مطيافية وعدد القلويدات المخلقة (Kunakh، 1996، 2005<sup>a</sup>). كما أنّ الخلايا المستزرعة لأنواع مختلفة من الخشخاش مثل الخشخاش الإيراني (*Papaver bracteatum*) والخشخاش المنوم (*Papaver somniferum*) عادة لا تراكم المورفين Morphine، بل كان مركب Sanguinarine هو السائد ومشتقاته بكميات ونسب قريبة من تلك التي في خلايا أنواع أخرى من العائلة الخشخاشية (Kunakh، 2001، 2003<sup>ab</sup>، 2004).

#### 4.6. الدراسة الجزيئية Molecular study:

##### 1.4.6. التحديد الكمي والنوعي للـ DNA:

قيس تركيز ونقاوة الـ DNA المستخلص من 100 ملغ من التجمعات الخلوية لكالوس البنج *H. aureus* والنبات النامي في الزجاج *In Vitro* (بعمر 30 يوماً) بجهاز المطياف الضوئي (UV-Spectro-photometer)، حيث تراوحت التراكيز بين 300 و 850  $\mu\text{L}.\mu\text{g}^{-1}$ ، وتراوحت نقاوة العينات بين 1.05 و 1.81، ومُدّد تركيز DNA ليصبح 50  $\mu\text{L}.\text{ng}^{-1}$ ، وعند تطبيق عملية الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز بتركيز 0.8% لمعرفة نوعية DNA المستخدم، ظهر DNA الناتج بشكل حزمة واضحة وغير متقطع كما في الشكل (16). ويبين الجدول (16) تراكيز ونقاوة عينات DNA المدروسة.



الشكل رقم (16): نواتج ترحيل PCR هلى هلامة الأغاروز 0.8% للتأكد من النوعية الجيدة للـ DNA المعزول من مزارع الكالوس Callus Cultures والنبات النامي في الزجاج بعمر 30 يوم

الجدول رقم (16): تراكيز ونقاوة عينات الـ DNA في كالوس البنج والنبات النامي في الزجاج

| العينة           | تركيز DNA ( $\mu\text{L} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ) | نقاوة DNA |
|------------------|----------------------------------------------------|-----------|
| النبات في الزجاج | 810                                                | 1.81      |
| الشاهد 5C01      | 850                                                | 1.52      |
| 5C               | 790                                                | 1.32      |
| 6C               | 840                                                | 1.05      |
| 10C              | 300                                                | 1.20      |

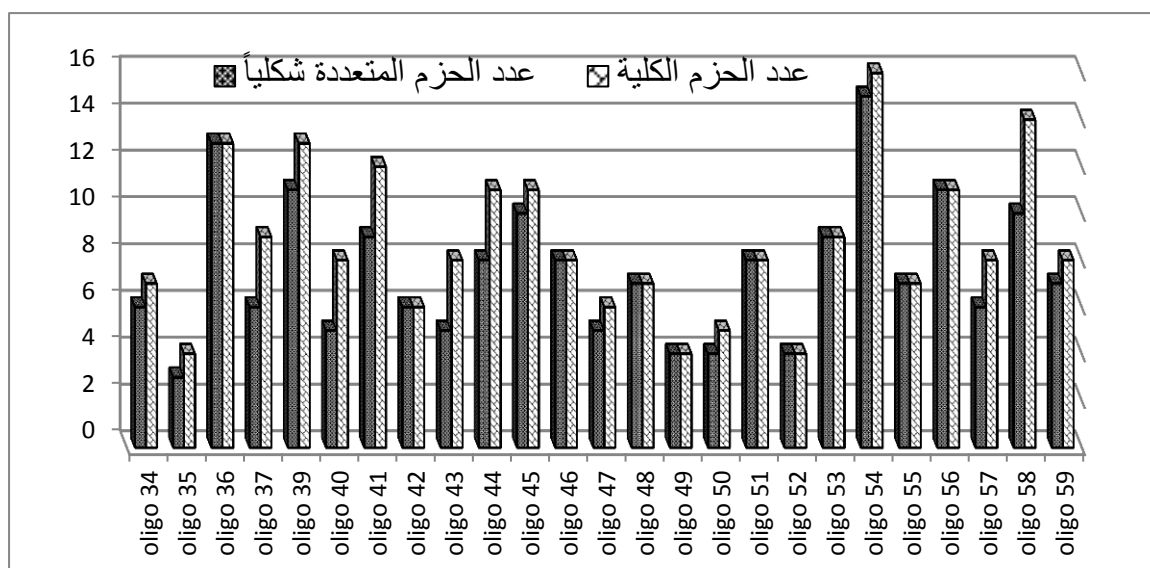
يعود اختلاف نقاوة عينات DNA ربما لوجود بروتينات في محلول DNA، حيث تستطيع كل من البروتينات والـ RNA امتصاص أشعة UV عند طول موجة 260 nm (Adams، 2003)، ما يؤثر على القراءة عند طول الموجة 260 nm وينعكس ذلك على نقاوة وتركيز الـ DNA، كما يتأثر تركيز الـ DNA بعدد الخلايا الموجود في العينة النباتية، وبالتالي كلما كان عدد الخلايا أكثر كلما كانت كمية الـ DNA أكبر، ويعود ذلك إلى مدى ملائمة الوسط المغذي لنمو الخلايا وانقسامها.

#### 2.4.6. التعددية الشكلية Polymorphism الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR:

تضمنت الدراسة الجزيئية لكالوس نبات البنج الذهبي *H. aureus* استعمال 25 مرئسة أثبتت جميعها فعاليتها في إعطاء تعددية بين الخطوط الخلوية Cellular Lines (الجدول 17)، حيث نتج عن استعمال هذه المرئسات نحو 217 حزمة بمتوسط 8.68 حزمة لكل مرئسة، منها 187 حزمة ذات تعددية شكلية Polymorphic بمتوسط 7.48 لكل منها وبنسبة تعددية شكلية 86.175%.

الجدول رقم (17): عدد الحزم الناتجة مع كل خط خلوي وعدد الحزم الكلي وعدد الحزم المتعددة شكلياً والنسبة المئوية للتعددية الشكلية

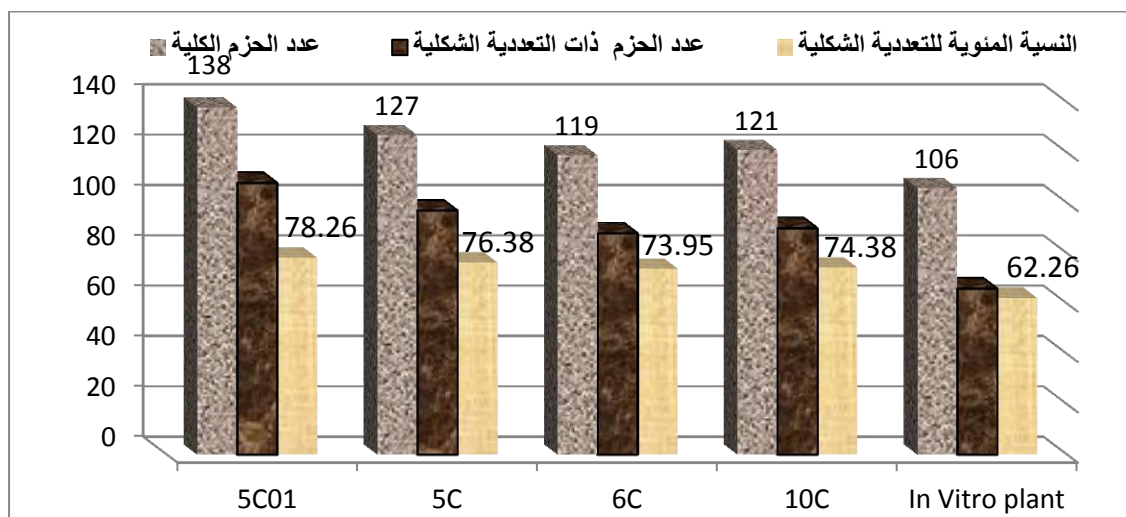
| المرنسة                        | عدد الحزم الكلية | عدد الحزم المتعددة شكلياً | % للتعددية الشكلية | 5C01  | 5C    | 6C    | 10C   | النبات الأم |
|--------------------------------|------------------|---------------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| oligo 34                       | 7                | 6                         | 85.71              | 6     | 6     | 6     | 7     | 2           |
| oligo 35                       | 4                | 3                         | 75                 | 3     | 3     | 3     | 3     | 2           |
| oligo 36                       | 13               | 13                        | 100                | 11    | 10    | 10    | 0     | 4           |
| oligo 37                       | 9                | 6                         | 66.67              | 8     | 7     | 6     | 7     | 5           |
| oligo 39                       | 13               | 11                        | 84.62              | 11    | 9     | 11    | 8     | 4           |
| oligo 40                       | 8                | 5                         | 62.5               | 6     | 7     | 5     | 8     | 4           |
| oligo 41                       | 12               | 9                         | 75                 | 8     | 9     | 8     | 4     | 4           |
| oligo 42                       | 6                | 6                         | 100                | 6     | 0     | 5     | 1     | 0           |
| oligo 43                       | 8                | 5                         | 62.5               | 6     | 6     | 7     | 5     | 5           |
| oligo 44                       | 11               | 8                         | 72.72              | 7     | 7     | 8     | 8     | 6           |
| oligo 45                       | 11               | 10                        | 90.91              | 6     | 7     | 6     | 9     | 1           |
| oligo 46                       | 8                | 8                         | 100                | 2     | 6     | 5     | 6     | 0           |
| oligo 47                       | 6                | 5                         | 83.3               | 2     | 1     | 1     | 3     | 6           |
| oligo 48                       | 7                | 7                         | 100                | 5     | 5     | 4     | 3     | 4           |
| oligo 49                       | 4                | 4                         | 100                | 1     | 1     | 1     | 1     | 3           |
| oligo 50                       | 5                | 4                         | 80                 | 1     | 2     | 3     | 4     | 1           |
| oligo 51                       | 8                | 8                         | 100                | 7     | 5     | 5     | 6     | 0           |
| oligo 52                       | 4                | 4                         | 100                | 4     | 4     | 0     | 3     | 0           |
| oligo 53                       | 9                | 9                         | 100                | 4     | 3     | 3     | 2     | 5           |
| oligo 54                       | 16               | 15                        | 93.75              | 9     | 8     | 6     | 10    | 7           |
| oligo 55                       | 7                | 7                         | 100                | 4     | 3     | 4     | 5     | 1           |
| oligo 56                       | 11               | 11                        | 100                | 5     | 5     | 1     | 1     | 11          |
| oligo 57                       | 8                | 6                         | 75                 | 3     | 3     | 2     | 2     | 7           |
| oligo 58                       | 14               | 10                        | 71.43              | 9     | 8     | 6     | 11    | 7           |
| oligo 59                       | 8                | 7                         | 87.5               | 4     | 2     | 2     | 3     | 7           |
| المجموع                        | 217              | 187                       | 86.175             | 138   | 127   | 119   | 121   | 106         |
| المتوسط                        | 8.68             | 7.48                      | 3.45               | 5.52  | 5.08  | 4.76  | 4.84  | 4.24        |
| عدد الحزم ذات التعددية الشكلية | -                | -                         | -                  | 108   | 97    | 88    | 90    | 66          |
| % للتعددية الشكلية             | -                | -                         | -                  | 78.26 | 76.38 | 73.95 | 74.38 | 62.26       |



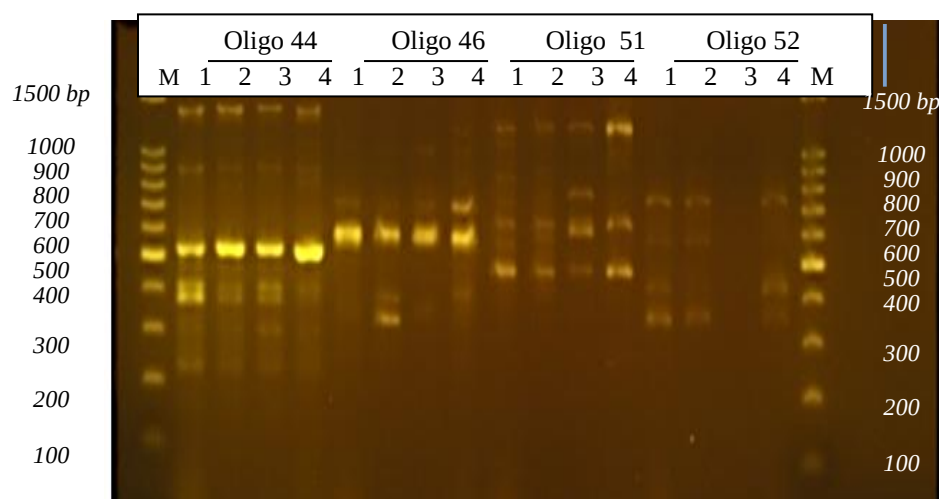
الشكل رقم (17): عدد الحزم الكلية والحزم المتعددة شكلياً الناتجة عن تطبيق تقنية PCR-ISSR

وقد أعطت المرئسات (Oligo 36، Oligo 42، Oligo 46، Oligo 48، Oligo 49، Oligo، Oligo 51، Oligo 52، Oligo 53، Oligo 55، Oligo 56) أعلى نسبة للتعددية الشكلية 100%، في حين أعطت المرئستان Oligo 40 و Oligo 43 أقل نسبة تعددية شكلية 62.5%، كما أعطت المرئسة Oligo 54 أكبر عدد من الحزم 16 حزمة، في حين أعطت المرئسات (Oligo 35، Oligo 49، Oligo 52) أقل عدد من الحزم (4) لكل منها.

كما يبين الجدول (17) والشكل (18) عدد الحزم الكلية وعدد الحزم ذات التعددية الشكلية والنسبة المئوية للتعددية الشكلية في كل خط خلوي من الخطوط الخلوية Cellular Lines المدروسة بالإضافة إلى النبات النامي في الزجاج *In Vitro*، حيث بلغ مجموع عدد الحزم الكلية (138)، (127)، (119)، (121)، (106) حزمة في كل من الخطوط الخلوية 5C01، 5C، 6C، 10C، والنبات النامي في الزجاج *In Vitro* على التوالي، أما عدد الحزم ذات التعددية الشكلية فقد بلغ (108)، (97)، (88)، (90)، (66) حزمة في كل من الخطوط الخلوية 5C01، 5C، 6C، 10C، والنبات النامي في الزجاج *In Vitro* على التوالي، كما نلاحظ أن أعلى نسبة تعددية شكلية كانت في الخط الخلوي الشاهد (78.26%) تلاها مباشرة الخط الخلوي 5C بنسبة (76.38%)، مما يجعله الخيار الأول لعمليات الانتخاب والتحسين الوراثي لرفع محتواه من القلويدات، في حين بلغت نسبة التعددية الشكلية في الخط الخلوي 6C (73.95%) و في الخط الخلوي 10C (74.38%) بينما كانت في النبات النامي في الزجاج *In Vitro* (62.26%).



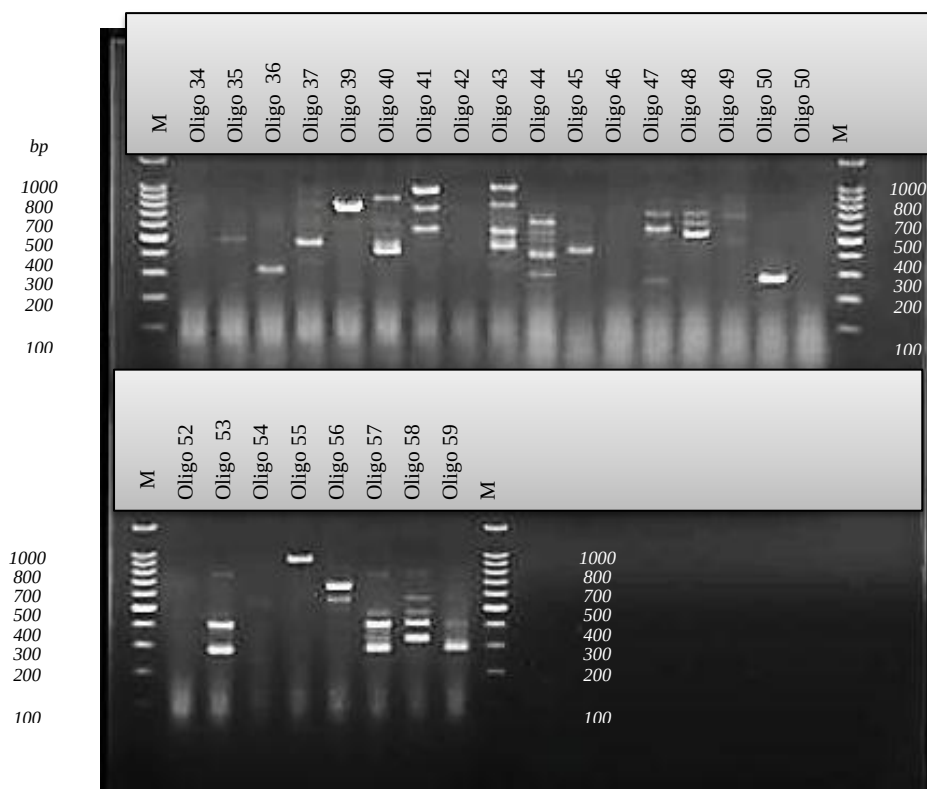
الشكل رقم (18): عدد الحزم الكلية وعدد الحزم ذات التعددية الشكلية والنسبة المئوية للمئوية للتعددية الشكلية في الخطوط الخلوية والنبات النامي في الزجاج



الشكل رقم (19): ترحيل نواتج PCR مع المرئسات Oligo 44، Oligo 46، Oligo 51، Oligo 52 بدءاً من

اليسار ويوجد DNA Marker 1000bp على هلامة أغاروز 2%:

10C:4, 6C:3, 5C:2, 5C<sub>01</sub>:1



الشكل رقم (20): نواتج ترحيل DNA النبات الأم مع المرئسات المستعملة في تطبيق تقنية ISSR وبوجود DNA Marker 1000bp على هلامه أغاروز 2%

وعند تطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق PDV (Percent Disagreement Values) (الجدول رقم 18)، حيث يدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود اختلاف وراثي ويزداد بازديادها التباين الوراثي، فقد تراوحت أقل قيمة لمعامل Jaccard (0.26) بين الشاهد 5C<sub>01</sub> والخط الخلوي 5C ما يعني أنهما الأكثر تشابهاً وراثياً، بينما كانت أعلى قيمة (0.78) بين النبات الأم النامي في الزجاج *In Vitro* والخط الخلوي 6C، ما يدل على أنهما الأبعد وراثياً.

الجدول رقم (18): مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق PDV بين الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي *H. aureus* والنااتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقانة ISSR

|                  | 5C <sub>01</sub> | 5C   | 6C   | 10C  | In vitro plant |
|------------------|------------------|------|------|------|----------------|
| 5C <sub>01</sub> | 0                |      |      |      |                |
| 5C               | 0.26             | 0    |      |      |                |
| 6C               | 0.33             | 0.32 | 0    |      |                |
| 10C              | 0.45             | 0.38 | 0.48 | 0    |                |
| In vitro plant   | 0.74             | 0.76 | 0.78 | 0.75 | 0              |

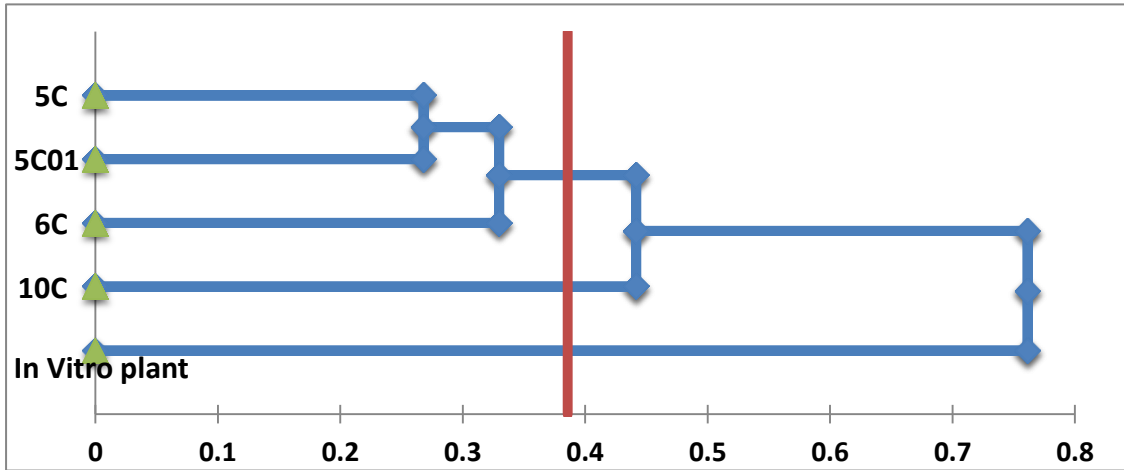
إن لمكونات الوسط المغذي الدور الرئيس في هذا التباعد الوراثي بين الخطوط الخلوية Cellular Lines، تتفق هذه النتائج مع نتائج (Iwase وزملاؤه، 2011) التي تؤكد اختلاف أنواع مزارع الكالوس Callus Cultures وراثياً والعائدة للنبات نفسه، وذلك لأن عملية تنشئة الكالوس تتضمن تغييرات هائلة في التعبير الجيني نتيجة لتغير مستوى تمايز الخلايا وفقد التمايز بعد التحول إلى الحالة المريسيمية (غير المتميزة) المنقسمة (Ohtani و Sugiyam، 2005)، مما يؤكد أن خاصية التباينات الوراثية في مزارع الكالوس Callus Cultures محدودة بالتفاعل ما بين البيئة والتركيب الوراثي، حيث تعزى هذه التباينات إلى مجموعة من الآليات أهمها (Kunakh، 2013):

- تغيرات في مثيلة عدد من تتاليات الـ DNA.
- تضخيم تتاليات خاصة من الـ DNA.
- تخليق إضافي للـ DNA وغالباً ما يكون بشكل كبير.
- تغير في كمية المخزون الوراثي ونمط توزيعه على الصبغيات.
- إطلاق المادة الوراثية خارج حدود الخلايا أو ما يعرف بالقذف.
- تبادل المادة الوراثية بين الخلايا.
- فقد كمية كبيرة من الـ DNA النووي (خاصة في الخلايا متعددة الصيغة الصبغية حيث يحدث نقص بعدد الصبغيات أو الكروماتينات).
- الشذوذات التي تحدث في الانقسام الخيطي والسيتوبلازمي وتشكل التراكيب متعددة النوى التي تنتج عن الشذوذات التي تصيب البوليميرات الأنوبية .
- الاندماج النووي في الخلايا متعددة النوى.
- انفصال المادة الوراثية في طور التمهيدي والاستوائي مما يقلل عدد الصبغيات.

### 3.4.6. التحليل العنقودي Cluster Analysis للخطوط الخلوية Cellular Lines

لكالوس نبات البنج *H. aureus* والنبات الأم النامي في الزجاج *In Vitro*:

يظهر التحليل العنقودي في الشكل (21) انفصال الخطوط الخلوية حسب درجة تشابهها الوراثي، فقد انفصل النبات الأم النامي في الزجاج *In Vitro* بشكل منفصل، في حين تجمعت الخطوط الخلوية Cellular Lines في عنقود آخر بمسافة قدرها 0.76 عن النبات الأم، وهذه انفصلت بدورها إلى تحت عنقودين ضم الأول الخط الخلوي 10C منفرداً، والذي انفصل بمسافة 0.44 عن تحت العنقود الآخر الذي ضم الخطوط الخلوية 5C<sub>01</sub>، 5C، 6C، وهذا بدوره انفصل إلى مجموعتين أصغر: الأولى ضمت الخط الخلوي 6C والثانية ضمت الخطين الخليين 5C، 5C<sub>01</sub> وكانت المسافة بين هاتين المجموعتين 0.33، في حين كان الخطين الخليين 5C، 5C<sub>01</sub> الأقرب إلى بعضهما وراثياً حيث وضعاً في مجموعة واحدة بمسافة 0.27.



الشكل رقم (21): التحليل العنقودي للخطوط الخلوية لكالوس البنج والنبات الأم النامي في الزجاج الناتج عن تطبيق تقنية ISSR

يبين هذا التحليل أن التباين الوراثي الظاهر حُرض حسب مكونات وسط زراعة الكالوس التي كان لها دوراً رئيس في إحداث هذه التباينات الوراثية بين الخطوط الخلوية Cellular Lines من جهة، على الرغم من أنها أُخذت من المصدر نفسه (5C<sub>01</sub>)، وبينها وبين النبات الأم النامي في الزجاج من جهة أخرى، وذلك لأن خلايا الكالوس فقدت صفة التمايز وعادت للحالة المنقسمة المرستيمية غير المتميزة، فأصبحت تختلف عن النبات النامي في الزجاج مورفولوجياً وفيزيولوجياً

وراثياً ( Ikeuchi وزملاؤه، 2013 ; Ohtani و Sugiyama، 2005)، مما أدى إلى انفصال النبات النامي في الزجاج في شكل منفصل عن جميع مزارع الكالوس Callus Cultures الأخرى بما فيها الشاهد، كما يفسر التباين الحاصل بين الخطوط الخلوية بعمليات التكيف الفيزيولوجي للخلايا متبوعاً بعمليات التكيف الوراثي للتجمعات الخلوية التي تتجلى كتغير في التركيب الوراثي (Kunakh، 1975 ; Sidorenko و Kunakh، 1972)، إذ تبدأ عملية تكيف التجمع الخلوي بمرحلة التجمع الأولي (من 2-3 بساجات)، تتميز بتغيرات وراثية غير معنوية نسبياً بالمقارنة مع الخلايا النشطة ميتويزياً للنبات الأصلي، تليها مرحلة التأسيس (من 2-8 بساجات وأحياناً حتى 12 بساج)، التي تشهد اختفاءً نهائياً لآليات تكامل الكائن الحي (النبات الكامل)، حيث تتحول الخلايا لظروف النمو التي هي خارج ردة فعل التركيب الوراثي (الظروف المجهدة) (Kunakh، 1975 ; Sidorenko و Kunakh، 1972)، وعندها يبدأ الانتخاب المستقر Stabilizing selection بتأثيره على التجمعات الخلوية، وتتميز هذه المرحلة بمعظم التغيرات الجذرية كنتيجة لتكيف الخلايا، حيث تظهر التجمعات الخلوية تغيراً وراثياً متزايداً من حيث مدة الدورة الخلوية وأطوارها بشكل عام والانقسام الخيطي بشكل خاص (Kunakh، 2013)، كذلك تزداد فيها التغيرات الجينومية وأهمها تغيرات العدد الصبغي ومستوى الشذوذات الصبغية (الجسور الصبغية، القطع الجسرية، الكسرات الصبغية)، وزيادة مستوى التغير الوراثي لمعظم المؤشرات الخلوية والكيميائية والحيوية والجزيئية، وأخيراً يحدث انتخاب إيجابي للخلايا التي تكيفت للنمو في الظروف الجديدة وإزاحة الخلايا التي لم تتكيف (Kunakh، 2005<sup>a</sup>)، والمرحلة الأخيرة من تكيف التجمعات الخلوية هي مرحلة السلالة المستقرة أو الخطوط الخلوية الثابتة (من عمر السنة وما فوق)، وتتميز ليس فقط بالتوازن الفيزيولوجي بل أيضاً بالتوازن الوراثي الناتج عن الفعل المسيطر والسائد للانتخاب المستقر (أحد أشكال الانتخاب الطبيعي) (Kunakh، 2013)، وقد أظهرت الدراسات ارتباط مباشر بين قدرة خلايا الكالوس على النمو لفترات طويلة (سنين) ونسبة الخلايا ذات الجينوم المعاد تنظيمه (Kunakh، 2005<sup>a</sup>)، وهكذا فإن الخلايا تحت ظروف النمو الطويل والمستمر في الزجاج محكوم ومحدد بإعادة تنظيم الجينوم للمستأصل النباتي الأصل، وأن إعادة تنظيم الجينوم (تجمع المورثات) في السلالات الخلوية المستقرة ليست عشوائية، مما يشير إلى أن آليات التكيف والتطور مشتركة إلى حد ما بين جينوم النبات سواء في الطبيعة أو في ظروف النمو في الزجاج *In Vitro*، بالإضافة إلى عمومية

آليات التكيف للتجمعات الخلوية بغض النظر عن درجة تطور الكائن الحي (Kunakh, 2013).

وعموماً يمكن حصر آليات التباين بالتجمعات الخلوية بتغيرات في عدد وهيئة الصبغيات ومستوى الشذوذات الصبغية، وحالات العبور وتغيرات التعبير المورثي متضمنة كبح بعض المورثات وإبطال كبح بعضها الآخر مسببة تغيرات في مثيلة الـ DNA بشكل أساسي، بالإضافة إلى تبادل المواقع وحالات الإضافة والحذف في تتاليات الـ DNA والطفرات المورثية وإعادة ترتيب المورثات على الصبغي مؤدية لاختلاف على مستوى تتابعات الـ DNA، والأهم ظهور خلايا بمجموعات صبغية مختلفة واستقرار عددها ونسبتها عند حد معين (Kunakh, 2013). كل هذا يؤكد على أهمية مزارع الكالوس Callus Cultures كمصدر مهم للاختلافات الوراثية وفعالية تقانة ISSR في كشف هذه الاختلافات، وأن تقانة زراعة الكالوس هي تقانة مفيدة في عمليات الانتخاب الخلوي للوصول إلى سلالات خلوية يمكن أن تكون مرتفعة الإنتاجية من المواد الفعالة حيويًا.

تتوافق هذه النتائج مع نتائج Kunakh وزملائه (2015) في دراستهم التي تناولت التباينات الوراثية المحرصة بزراعة الأنسجة لأنواع الجنتيانا *Gentiana spp*، حيث بينت النتائج وجود تباينات وراثية بين كل نوع من الأنواع المدروسة ومزارع الكالوس المشتقة منها، فعلى سبيل المثال كانت المسافة الوراثية بين النوع *G.lutea* والكالوس المشتق منه 0.31، وعدد الحزم الناتجة بتطبيق تقنية ISSR (118) حزمة منها (65) حزمة ذات تعددية شكلية (بنسبة 55.1%)، أما التحليل العنقودي بين انفصال النبات الأم (المانح Donor) والكالوس الأولي Primary Callus (بعمر 6 أشهر) والنباتات المتجددة منه Regenerated plants بعنقود منفصل، في حين توضع مزارع الكالوس (بعمر سنة) مع مزارع مستتباتات الجذور الشعرية Hairy Root Culture في عنقود آخر.

وفي دراسة لـ Spiridonova وزملائه (2007) حول ثباتية جينوم الخط الخلوي K-27 لنبات الراولفيا الثعبانية *Rauwolfia serpentina* عند تغيير ظروف التسمية، خاصة اختلاف محتوى الوسط من المعادن والسكريز ونوع الوسط (صلب أو سائل)، بينت النتائج وجود تغير على المستوى الجينومي للخط الخلوي K-27 تم الكشف عنه بتطبيق تقنية RAPD، حيث اختلف

عدد الحزم الناتجة عن كل مرئسة باختلاف مكونات الوسط، كما أن التنمية السطحية على وسط صلب نتج عنه مستوى تباين وراثي أقل منه عند التنمية العميقة (المغمورة) في وسط سائل، وفسر الباحثون ذلك بأن التنمية العميقة قد يكون لها تأثير مجهد بشكل أكبر على جينوم الأنسجة المزروعة، وأن هذا الضغط أو التوتر المطبق على الجينوم نتج بشكل أساسي بفعل الاتصال المباشر للخلايا مع مكونات الوسط المغذي في التنمية العميقة، بينما في التنمية السطحية فإن عدد قليل من الخلايا يكون على اتصال مباشر مع مكونات الوسط المغذي، إضافة إلى أن الحركة المستمرة ودرجة تهوية المزرعة السائلة تسهم بشكل ما في تحفيز ذلك التوتر.

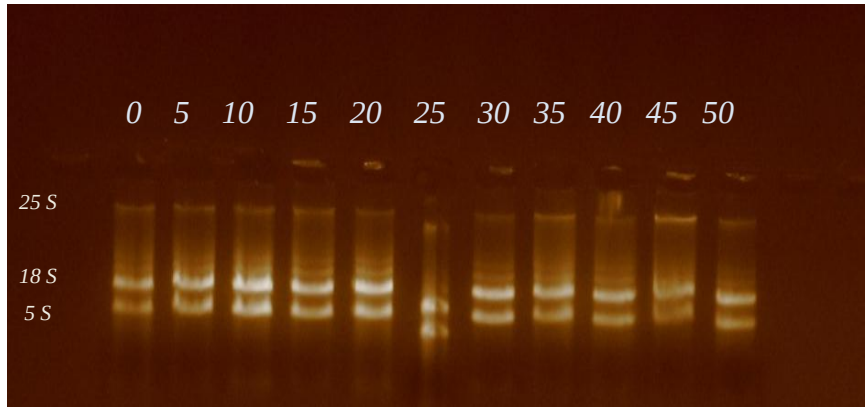
كما بيّن Bublyk وزملائه (2008) حول التباين الوراثي الحاصل في عدة خطوط خلوية (2، 3، 6، 7، 9) لكالوس نبات أنجيرنيا *Ungernia victoris* المنمّاة في أوساط مغذية مختلفة التركيب، فقد كشفت نتائج تطبيق تقنية RAPD أن عدد الحزم الناتجة عن 24 مرئسة قد تراوح من 4 إلى 16 حزمة بمتوسط قدره 9.9 حزمة لكل مرئسة مع تباين الحزم الناتجة بشدتها الضوئية، وعند تطبيق مصفوفة عدم التوافق الوراثي تراوحت المسافة بين الخطوط الخلوية من 0.84 إلى 2.99، أما التحليل العنقودي فقد بيّن توزيع الخطوط الخلوية المدروسة بعنقودين أساسيين ضم العنقود الأول الخطوط الخلوية (2، 6، 7) في حين ضم العنقود الثاني الخطين الخلويين (3 و 9).

وفي دراسة Maidanyuk وزملائه (2007) حول التباين الوراثي الحاصل في كالوس نبات الذرة *Zea mays* (الخط الخلوي P346) والسلالات الجسمية الخضرية المشتقة منه، كشفت نتائج الدراسة الجزيئية وجود تباينات وراثية بين السلالات الخضرية النامية في الزجاج *In Vitro* وبين النبات المانح Donor plant من جهة، وبين مزارع الكالوس المتعددة للسلالة الخضرية نفسها من جهة أخرى، وظهرت هذه التباينات بشكل حزم ذات تعددية شكلية، بالإضافة لاختلاف نسبة التعددية التي تعطيها كل مرئسة بين مزارع الكالوس للسلالة الواحدة، فبعض الحزم كانت موجودة في مزارع الكالوس لمختلف السلالات الخضرية، لكنها كانت غائبة في النبات المانح، وبعض الحزم الأخرى تباينت بشدتها أو كثافتها بين مزارع الكالوس، كما انخفضت نسبة هذه التباينات إلى النصف تقريباً بإطالة مدة الزراعة من شهرين إلى أربعة شهور (4 بسّاجات)، وأحد

الأسباب المحتملة لذلك قد يكون التغير الكمي بالتتابع (التسلسل) المضخم في جينوم الخلايا أو التبدل بنسبة (عدد) الخلايا الحاملة لهذا التتابع.

#### 5.6. دراسة التعبير المورثي Gene Expression Studying:

قيس تركيز ونقاوة RNA المستخلص من 100 ملغ من الخطوط الخلوية لكالوس البنج *Hyoscyamus* والنبات النامي في الزجاج *In Vitro* بجهاز المطياف الضوئي (UV-Spectrophotometer)، حيث تراوحت التراكيز بين 413.6 و 2085.6  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  ، ونقاوة العينات بين 0.92 – 2 ومُدد تركيز RNA ليصبح 50  $\mu\text{L} \cdot \text{ng}^{-1}$  وعند تطبيق عملية الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز بتركيز 1% لمعرفة نوعية RNA المستخدم، ظهر RNA الناتج بشكل 3 حزم واضحة وغير متقطع. كما في الشكل (22)، ويبين الجدول (19) تراكيز ونقاوة عينات RNA المدروسة.



الشكل رقم (22): نواتج ترحيل RNA المعزول من الخط الخلوي 5C01 خلال مراحل عمرية مختلفة على هلامة أغاروز 1% للتأكد من النوعية الجيدة

الجدول رقم (19): تركيز ونقاوة عينات RNA في المزارع الخلوية خلال مراحل عمرية مختلفة

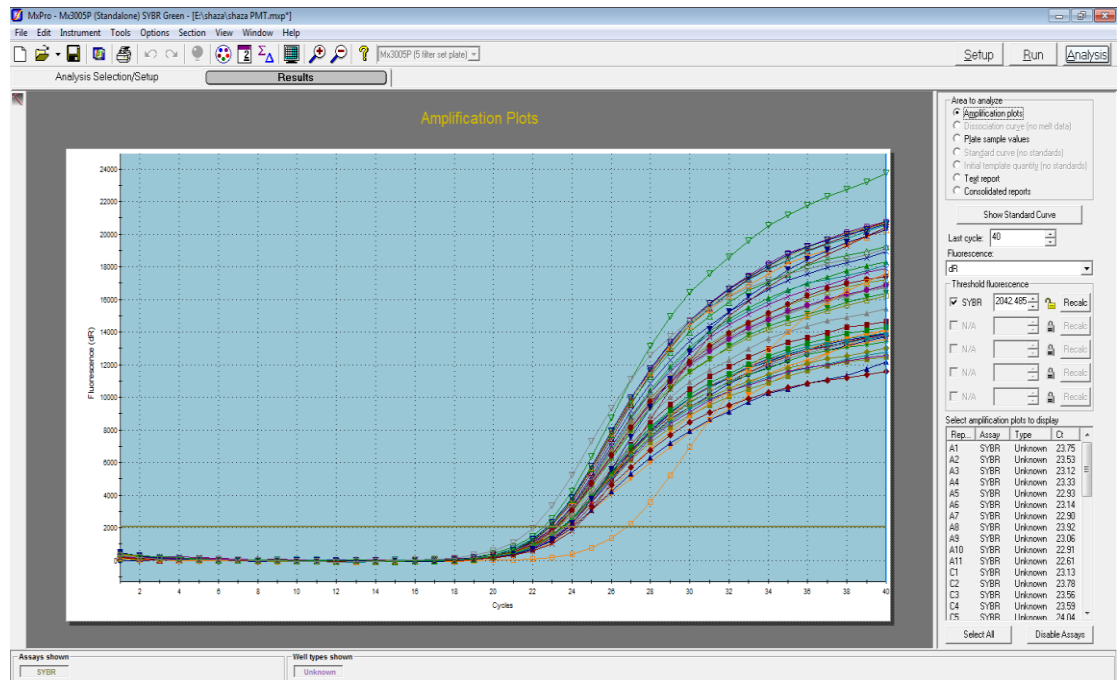
| العمر (يوم) | تركيز RNA $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ |        |        |        | نقاوة RNA |      |      |      |
|-------------|------------------------------------------------|--------|--------|--------|-----------|------|------|------|
|             | 5C01                                           | 5C     | 6C     | 10C    | 5C01      | 5C   | 6C   | 10C  |
| 0           | 1188                                           | 1716   | 1478.4 | 1848   | 1.41      | 1.04 | 0.97 | 1.03 |
| 5           | 1346.4                                         | 1434.4 | 677.6  | 1496   | 0.97      | 1.92 | 1.6  | 0.92 |
| 10          | 695.2                                          | 1980   | 413.6  | 1522.4 | 1.22      | 1.09 | 1.8  | 0.74 |
| 15          | 915.2                                          | 1047.2 | 642.4  | 1645.6 | 1.24      | 1.34 | 1.28 | 0.96 |
| 20          | 774.4                                          | 1126.4 | 809.6  | 1795.2 | 1.45      | 1.56 | 1.64 | 1.03 |

|    |       |       |        |        |      |      |      |      |
|----|-------|-------|--------|--------|------|------|------|------|
| 25 | 510   | 862.4 | 563.2  | 1346.4 | 1.7  | 1.32 | 2    | 0.93 |
| 30 | 422.4 | 563.2 | 1047.2 | 1716   | 1.45 | 1.77 | 1.43 | 1.04 |
| 35 | 448.8 | 642.4 | 677.6  | 1425.6 | 1.5  | 2.02 | 1.6  | 1.06 |
| 40 | 466.4 | 668.8 | 475.2  | 2085.6 | 2    | 1.41 | 1.5  | 1    |
| 45 | 510.4 | 114.4 | 765.6  | 1654.4 | 1.7  | 1.3  | 1    | 1.22 |
| 50 | 844   | 915.2 | 642.4  | 1751.2 | 1.29 | 1.55 | 1.46 | 0.97 |

### 1.5.6. تغير تعبير مورثة PMT (Putrescine N-Methyl transferase) في الخطوط

الخلوية Cellular lines لكالوس نبات البنج الذهبي *H.aureus* خلال 50 يوماً:

يبين الشكل رقم (23) قيم Ct (Cycle threshold) الناتجة باستعمال المورثة المرمزة لأنزيم PMT، كما يبين الجدول رقم (20) والشكل رقم (24) أن تعبير المورثة المرمزة لأنزيم PMT انخفض في الخطوط الخلوية (5C، 6C، 10C) في طور المتلكئ Lag phase بالمقارنة مع الخط الخلوي الشاهد 5C<sub>01</sub> باستثناء اليوم الخامس من عمر مزارع الكالوس، أما مرحلة الطور الأسّي Exponential phase فقد شهدت أعلى قيمة لتعبير مورثة PMT لتسجل (4.563) و (1.516) و (7.728) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد في الخطوط الخلوية 5C، 6C، 10C على التوالي وبفروقات معنوية فيما بينها. ثم بدأ بالانخفاض ليرتفع من جديد في بداية طور الثبات Stability phase في اليوم 40 من عمر مزارع الكالوس ليبلغ (2.585) و (3.074) و (3.656) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد في الخطوط الخلوية 5C، 6C، 10C على التوالي وبفروقات معنوية فيما بينها، وينخفض بعد ذلك حتى نهاية فترة النمو.



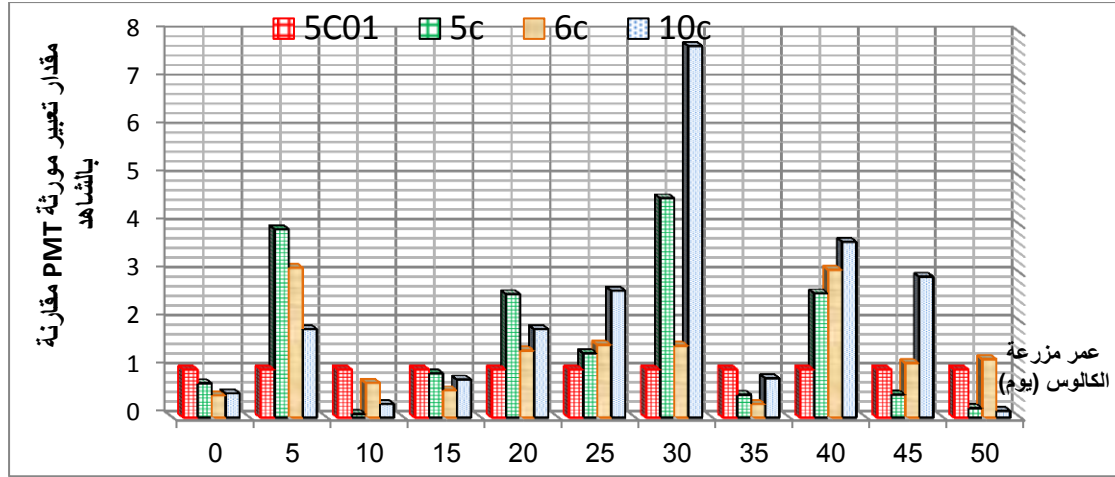
الشكل (23). قيم Ct الناتجة باستعمال المرئسة الخاصة بالمرمزة لأنزيم PMT

Ct: هي عدد حلقات التفاعل التي يبدأ عندها الجهاز بإمكانية قياس التوهج الناتج عن التفاعل

جدول (20). قيمة تعبير مورثة PMT في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي *H. aureus* خلال 50 يوماً

| age (day)<br>Medium         | الطور المتكئ       |                    |                    | الطور الأسّي       |                    |                    |                    |                    | طور الثبات         |                    |                    |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                             | 0                  | 5                  | 10                 | 15                 | 20                 | 25                 | 30                 | 35                 | 40                 | 45                 | 50                 |
| Control (5C <sub>01</sub> ) | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     |
| 5C                          | 0.712 <sup>b</sup> | 3.918 <sup>b</sup> | 0.076 <sup>b</sup> | 0.163 <sup>b</sup> | 2.567 <sup>b</sup> | 1.338 <sup>b</sup> | 4.563 <sup>b</sup> | 0.473 <sup>b</sup> | 2.585 <sup>b</sup> | 0.480 <sup>b</sup> | 0.196 <sup>b</sup> |
| 6C                          | 0.463 <sup>c</sup> | 3.117 <sup>c</sup> | 0.722 <sup>c</sup> | 0.162 <sup>b</sup> | 1.395 <sup>c</sup> | 1.516 <sup>c</sup> | 1.495 <sup>c</sup> | 0.283 <sup>c</sup> | 3.074 <sup>c</sup> | 1.133 <sup>c</sup> | 1.214 <sup>c</sup> |
| 10C                         | 0.504 <sup>d</sup> | 1.840 <sup>d</sup> | 0.283 <sup>d</sup> | 0.160 <sup>b</sup> | 1.840 <sup>d</sup> | 2.639 <sup>d</sup> | 7.728 <sup>d</sup> | 0.818 <sup>d</sup> | 3.656 <sup>d</sup> | 2.928 <sup>d</sup> | 0.140 <sup>d</sup> |
| L.S.D (0.01)                | 0.0042             | 0.0307             | 0.0046             | 0.0307             | 0.0172             | 0.0046             | 0.0037             | 0.0046             | 0.0027             | 0.0309             | 0.0313             |

الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 1%



الشكل رقم (24): قيمة تعبير مورثة مورثة PMT في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي H. aureus خلال 50 يوماً

لكن زيادة قيمة تعبير مورثة PMT لم تتوافق بزيادة تركيز قلويدات التروبان (TAs) بالمقارنة مع الشاهد، ويعزى ذلك ربما إلى أن الزيادة في تركيز المغنزيوم Magnesium في الوسط المغذي غير من اتجاه مسار تخليق القلويدات من بوتريسسين- تروبان (Putrescine to Tropane) إلى بوتريسسين - سبيرميدين (Putrescine to Spermidine) (والسبيرميدين Spermidine هو عديد أمين يشترك البوتريسسين Putrescine في استقلابه، ويحفز مرحلة التطور الجنيني في المزارع الخلوية) (Bouché، 1981، Tabor و Tabor، 1984)، كون نشاط أنزيم PMT حساس جداً لتغير تركيز مكونات الوسط المغذي، وهذا يتوافق مع نتائج Pinol وزملاؤه عام (1999)، علماً أن زيادة تعبير المورثة المرمزة لأنزيم PMT يزيد فقط من تراكم مركب ن- ميثيل بوتريسسين N-Methylputrescine دون أن يؤثر على مستوى تراكم قلويدات التروبان كما بين Sato وزملاؤه (2001). كذلك فإن النسبة بين شوارد الأمونيوم  $NH_4^+$  وشوارد النترات  $NO_3^-$  تؤثر على تركيز الهيوسيامن Hyoscyamine ومن ثم تحويله إلى السكوبولامين Scopolamine، من خلال تأثيرها على تعبير المورثات المرمزة للأنزيمات المفتاحية في مسار تخليق قلويدات التروبان TAs، فكلما اقتربت نسبة  $NH_4^+/NO_3^-$  من 1 زادت مستويات التعبير المورثي وقابلها زيادة في تركيز القلويدات (Wei وزملاؤه، 2018)، إلا أن النتائج المبينة في الجدول رقم (21) تبين ابتعاد نسبة  $NH_4^+/NO_3^-$  بشكل واضح عن 1، الأمر الذي أدى إلى زيادة التعبير المورثي دون أن يقابلها زيادة في تركيز قلويدات التروبان. ويعزى

تأثير شكل الآزوت الممتص من قبل الخلايا على التعبير المورثي (Mäck و Schjoerring، 2002) إلى تأثيره على امتصاص الكاتيونات والآنيونات الأخرى إضافة إلى دوره في تنظيم الأس الهيدروجيني الخلوي (Marschner، 1995)، إذ ينشط امتصاص شوارد الأمونيوم  $\text{NH}_4^+$  في الوسط القاعدي لغياب المنافسة مع شوارد الهيدروجين  $\text{H}^+$ ، لكن امتصاص شوارد  $\text{NH}_4^+$  من قبل الخلايا يقابله خروج شوارد  $\text{H}^+$  فيصبح الوسط أكثر حامضية، ما يثبط امتصاص شوارد  $\text{NH}_4^+$  وينشط امتصاص شوارد النترات  $\text{NO}_3^-$  في الوسط الحامضي لغياب المنافسة مع شوارد الهيدروكسيل  $\text{OH}^-$ ، لكن امتصاص شوارد  $\text{NO}_3^-$  من قبل الخلايا يقابله خروج شوارد  $\text{OH}^-$  فيصبح الوسط أكثر قاعدية، ما يثبط امتصاص شوارد  $\text{NO}_3^-$  وينشط امتصاص  $\text{NH}_4^+$  من جديد وهكذا دواليك (Marschner، 1995).

الجدول رقم (21): نسبة شوارد الامونيوم إلى شوارد النترات في الأوساط المغذية المدروسة

| Medium                        | 5C01  | 5C    | 6C    | 10C   |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ | 0.195 | 0.195 | 0.214 | 0.291 |

تتوافق نتائجنا مع نتائج دراسة Moyano وزملائه (2003) حول تأثير تعبير مورثة PMT على إنتاج القلويدات في نبات الداتورة ميتيل (*D. metel*) والبنج المصري (*H. muticus*)، حيث تبين أن أعلى قيمة للتعبير المورثي كانت بعمر 7 أيام عندما كان تركيز القلويدات منخفضاً، ثم تناقصت بعد ذلك بمرور الوقت، كما أنه لم يكن هناك ارتباط دائم بين تعبير مورثة PMT والمحتوى القلويدي، حيث ارتفاع فعالية PMT لا يمكن اعتبارها عاملاً وحيداً ومؤثراً في ارتفاع المحتوى القلويدي، أما في دراسة Rothe وزملاؤه (2003) على نبات الأتروبا *A. belladonna* التي هدفت لمعرفة تعبير مورثة PMT وتركيز قلويدات التروبان (TAs) ومشتقاتها، بينت أن زيادة تعبير مورثة PMT وحده غير كافية لزيادة إنتاج القلويدات، وأن تركيز كل من: الهيوسيامين Hyoscyamine، السكوبولامين Scopolamine، التروبين Atropine، بسيدوتروبين Psedutropine، تروبينون Tropinone، كاليستيجين Calystegine بقيت دون تغيير، وانخفض تعبير مورثة PMT بشكل طفيف بالمقارنة مع جذور الشاهد، ربما يعود هذا إلى الفرضية القائلة بأن خطوة أو أكثر في مسار التخليق الحيوي لقلويدات التروبان ما بين N- Tropinone و Methylputrescine تم تثبيطها (Hashimoto وزملاؤه، 1990)، قد تتضمن

إحدى هذه الخطوات عمل الأنزيم ديامين أوكسيداز Diamine oxidase على مركب N-Methylputrescine لينتج المركب الكاتيوني 1-Methyl-D-Pyrrolinium ومن ثم Tropinone، إذ من الممكن أن هناك عدة خطوات تحد من معدل تخليق هذه المنتجات في مسار تخليق القلويدات (Hashimoto وزملاؤه، 1990).

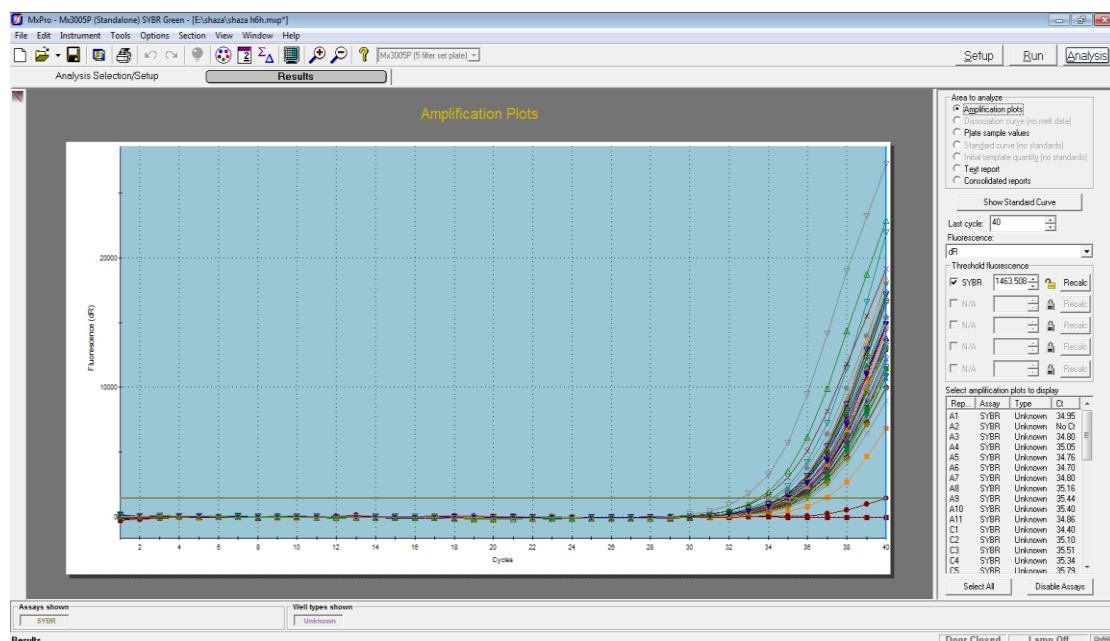
كما أن زيادة تركيز السكرور في تجربة Rothe وزملائه (2003) زاد من تراكم الكاليسيجين Calystegine في معاملته الشاهد، لكنه لم يؤثر على تراكم الكاليسيجين Calystegine في مزارع الجذور التي أدخلت إليها مورثة PMT، ويفسر ذلك ربما بأن مورثة PMT ليست الوحيدة المتضررة، بل هناك مورثات مرمزة لأنزيمات أخرى في مسار التخليق الحيوي قد تأثرت سلباً بهذه المعاملات.

ولزيادة الإنتاج من الهيوسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine تم العمل على نوعين نباتيين غنيين بالسكوبولامين (الداتورة: *D. methel* والدوبوسيا *Duboisia spp*) ونوع نباتي فقير بالسكوبولامين (البنج المصري *H. muticus*)، وبعد العدوى بكتيريا *Agropacterium* بينت النتائج أن جميع الجذور المعاملة امتلكت قدرة كبيرة على النمو، لكن السلوك الأيضي اختلف بشكل معنوي بين الأنواع المدروسة، فقد زادت مستويات مركب N-Methyl Putrescine (المنتج المباشر المحفز بواسطة PMT) في نبات *Duboisia* بمقدار 4 أضعاف مقارنة بالجذور البرية، لكن المحتوى من الهيوسيامين والسكوبولامين لم يزد بشكل معنوي (Moyano وزملاؤه، 2002)، أما في نبات الداتورة *Datura* فقد زاد محتوى الهيوسيامين والسكوبولامين لكن محتوى السكوبولامين وحده زاد بشكل معنوي، وفي نبات البنج *Hyoscyamus* كان المحتوى القلويدي مشابه لمثله في الجذور البرية (Moyano وزملاؤه، 2003)، وهذا يفيد بأن زيادة تعبير مورثة PMT زاد من تراكم N-Methyl Putrescine في بعض الأنواع كنبات *Duboisia*، لكن زيادة المحتوى القلويدي كانت هامشية وغير معنوية على عكس أنواع أخرى كالداتورة *Datura*، مما يؤكد اختلاف المسارات التنظيمية المؤثرة في الأنواع النباتية المنتجة لقلويدات التربان (TAs)، حيث مسار التخليق الحيوي لقلويدات التربان في نوعين نباتيين قريبين يتم التحكم به بشكل مختلف، وإن زيادة تعبير المورثة المستهدفة لا يؤدي بالضرورة إلى نمط تراكم مشابه لنواتج الاستقلاب الثانوية (Palazón وزملاؤه، 2008).

## 2.5.6. تغير تعبير مورثة H6H (Hyoscyamine 6 $\beta$ Hydroxylase) في الخطوط

الخلوية Cellular lines لكالوس نبات البنج الذهبي *H.aureus* خلال 50 يوماً:

يبين الشكل رقم (25) قيم Ct الناتجة باستعمال المورثة المرمزة لأنزيم H6H، كما تبين النتائج المدونة في الجدول رقم (22) والشكل رقم (26) أن أعلى قيمة لتعبير المورثة المرمزة لأنزيم H6H تحققت في اليوم الخامس من الطور المتلكي Lag phase لتسجل (2.676) و (3.364) و (2.297) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد في الخطوط الخلوية 5C، 6C، 10C على التوالي وبفروقات معنوية فيما بينها، أما في مرحلة الطور الأسّي Exponential phase فقد كانت أعلى قيمة لتعبير مورثة H6H في اليوم 20 (2.028) و (0.986) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد 5C01 في الخليين 5C و 6C على التوالي وبفروقات معنوية فيما بينها، في حين كانت أكبر قيمة لتعبير المورثة في الخط الخلوي 10C بعمر 30 يوم بمقدار (1.717) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد وبفروقات معنوية فيما بينهما. ثم انخفض بعد ذلك وما لبث أن ارتفع من جديد في طور الثبات Plateau phase ليبلغ (1.892) و (1.405) و (1.24) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد في الخطوط الخلوية 5C، 6C، 10C على التوالي وبفروقات معنوية فيما بينها، وينخفض بعد ذلك في نهاية فترة النمو.

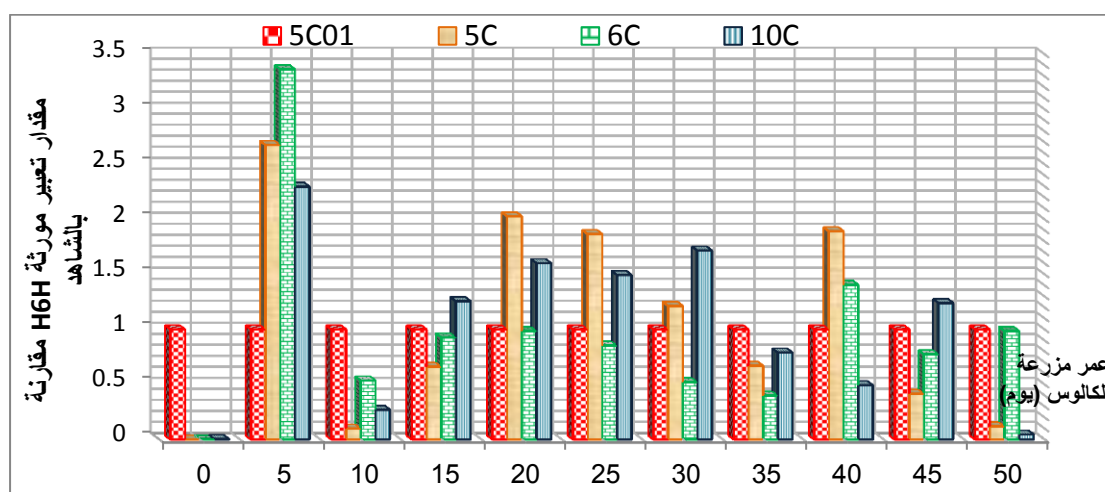


الشكل رقم (25): قيم Ct الناتجة باستعمال المورثة المرمزة لأنزيم H6H

الجدول رقم (22): قيمة تعبير مورثة H6H في الخطوط الخلوية Cllular lines لكالوس نبات البنج الذهبي H. aureus خلال 50 يوماً

| age (day)<br>Medium         | الطور المتلكئ  |                     |                     | الطور الأسّي        |                    |                    |                    |                     | طور الثبات         |                    |                    |
|-----------------------------|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                             | 0              | 5                   | 10                  | 15                  | 20                 | 25                 | 30                 | 35                  | 40                 | 45                 | 50                 |
| Control (5C <sub>01</sub> ) | 1 <sup>a</sup> | 1 <sup>a</sup>      | 1 <sup>a</sup>      | 1 <sup>a</sup>      | 1 <sup>a</sup>     | 1                  | 1 <sup>a</sup>     | 1                   | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     |
| 5C                          | 0.0002 b       | 2.676 <sup>b</sup>  | 0.0990 <sup>b</sup> | 0.6600 <sup>b</sup> | 2.028 <sup>b</sup> | 1.866 <sup>b</sup> | 1.214 <sup>b</sup> | 0.669 <sup>b</sup>  | 1.892 <sup>b</sup> | 0.415 <sup>b</sup> | 0.119 <sup>b</sup> |
| 6C                          | 0.0002 b       | 3.3640 <sup>c</sup> | 0.5360 <sup>c</sup> | 0.9270 <sup>c</sup> | 0.986 <sup>c</sup> | 0.853 <sup>c</sup> | 0.521 <sup>c</sup> | 0.398 <sup>c</sup>  | 1.405 <sup>c</sup> | 0.774 <sup>c</sup> | 0.986 <sup>c</sup> |
| 10C                         | 0.0035 c       | 2.2970 <sup>d</sup> | 0.2700 <sup>d</sup> | 1.2570 <sup>d</sup> | 1.602 <sup>d</sup> | 1.495 <sup>d</sup> | 1.717 <sup>d</sup> | 0.7900 <sup>d</sup> | 0.943 <sup>d</sup> | 1.240 <sup>d</sup> | 0.045 <sup>d</sup> |
| L.S.D (0.01)                | 0.0003         | 0.0053              | 0.0307              | 0.0157              | 0.0053             | 0.0047             | 0.0037             | 0.0173              | 0.0037             | 0.0306             | 0.0065             |

الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 1%



الشكل رقم (26): قيمة تعبير مورثة مورثة H6H في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي H. aureus خلال 50 يوماً

إن زيادة تعبير مورثة H6H لم تترافق بزيادة تركيز قلويدات التروبان (TAs) بالمقارنة مع الشاهد، ويفسر ذلك بأن خلايا نبات البنج امتلكت القدرة على تخليق قلويد الهيوسيامين Hyoscyamine في حين لم تكن قادرة على تحويله إلى سكوبولامين Scopolamine، نتيجة امتلاك النبات لفعالية منخفضة جداً للمورثة المرمزة لأنزيم H6H. تختلف هذه النتائج مع ما توصل إليه Hashimoto وزملاؤه (1993<sup>b</sup>) الذين بينوا أن زيادة تعبير مورثة H6H زاد تركيز السكوبولامين Scopolamine في مزارع الجذور المحورة لنبات الأتروبا *A. belladonna*

بمقدار 5 أضعاف بالمقارنة مع النبات البري. كما تختلف مع نتائج Jouhikainen وزملاؤه (1999) الذين بينوا ازدياد تركيز الهيوسيامين والسكوبولامين في مزارع الجذور الشعرية لنبات البنج المصري (*H. muticus*) بما يزيد عن 100 ضعف بالمقارنة مع الشاهد.

ومن المعلوم أن أنزيم H6H يحفز اثنين من نفاعلات الأكسدة في مسار التخليق الحيوي لقلويدات التروبان (TAs) (Palazón وزملاؤه، 2003) محولاً الهيوسيامين إلى أكثر أشكال قلويدات التروبان TAs أهمية (السكوبولامين) (Jabber-Vazdekis وزملاؤه، 2009; Hashimoto وزملاؤه، 1993<sup>a</sup>; Matsuda وزملاؤه، 1991). فإذا كانت زيادة تراكم الهيوسيامين في الأنسجة النباتية ستتسبب بزيادة السكوبولامين (كون آخر خطوة في مسار تخليق قلويدات التروبان هي تحويل الهيوسيامين إلى سكوبولامين بفعل الأنزيم H6H ما يجعله أنزيم مستهدف في الدراسات العلمية)، فإن العديد من النباتات الغنية بالهيوسيامين والفقيرة بالسكوبولامين يمكن تحويلها إلى مصادر صناعية للسكوبولامين (Zhang وزملاؤه، 2004)، كونه القلويد الأكثر فعالية وقيمة دوائية من بين قلويدات التروبان، ما جعل الطلب العالمي عليه يفوق 10 أضعاف الطلب على الهيوسيامين ونظيره الراسيمي الأتروبين (palazo'n وزملاؤه، 2008)، ولذلك فقد نفذت العديد من الأبحاث على نباتات فقيرة بالسكوبولامين كـ بعض أنواع البنج *Hyoscyamus* والأتروبا *Atropa*، حيث أدخل Yun وزملاؤه (1992) مورثة H6H من التبغ *Tobacco* إلى نبات الأتروبا *Atropa*، وأظهر التحليل الكروماتوغرافي تراكم مستويات مرتفعة من السكوبولامين كنتيجة لتحويل شبه كامل للهيوسيامين إلى سكوبولامين في المادة النباتية، كما عمل Hashimoto وزملاؤه (1993) على مزارع الجذور الشعرية للأتروبا *Atropa*، ووجدوا أن زيادة التعبير المورثي لـ H6H أدى إلى إنتاج أعلى للسكوبولامين من الهيوسيامين، على عكس معاملة الشاهد (الجذور البرية) التي راكمت الهيوسيامين بشكل رئيس، ونتائج مشابهة تم الحصول عليها في مزارع الجذور الشعرية لنبات البنج المصري (*H. muticus*) عند زيادة تعبير المورثة نفسها، حيث راكمت إحدى الخطوط الخلوية السكوبولامين بكميات أكبر بـ 100 مرة من الشاهد بينما كانت زيادة الهيوسيامين غير مهمة، ويمكن تفسير ذلك بزيادة فعالية الأنزيم نفسه H6H، مما انعكس إيجاباً على معدل تدفق نواتج الاستقلاب في مسار التخليق الحيوي للقلويدات (Zhang وزملاؤه، 2004). تقترح هذه النتائج أن زيادة تعبير مورثة H6H يمكن أن تكون

طريقة فعالة لزيادة إنتاج السكوبولامين في الأنواع النباتية ذات المحتوى المنخفض منه، كما تقترح أن زيادة تعبير مورثة H6H يغير نمط القلويد السائد من الهيوسيامين إلى السكوبولامين (Zarate وزملاؤه، 2006).

أما الأبحاث المنفذة على النباتات الغنية بالسكوبولامين كهجن الدوبوسيا *Dubosia* والداتورة *Datura*، فقد بينت النتائج أن زيادة تعبير H6H يزيد محتوى السكوبولامين حتى نهاية فترة الزراعة مع وجود اختلافات ملحوظة بالإنتاج القلويدي بين الخطوط الخلوية لكل نبات، كما تحسن الإنتاج القلويدي الكلي (محسوباً على أساس الهيوسيامين والسكوبولامين)، ما يؤكد على أن زيادة تعبير مورثة H6H لا تزيد المقدرة على تحويل الهيوسيامين إلى سكوبولامين فقط، وإنما يزيد من التراكم القلويدي الكلي (Palazon وزملاؤه، 2003).

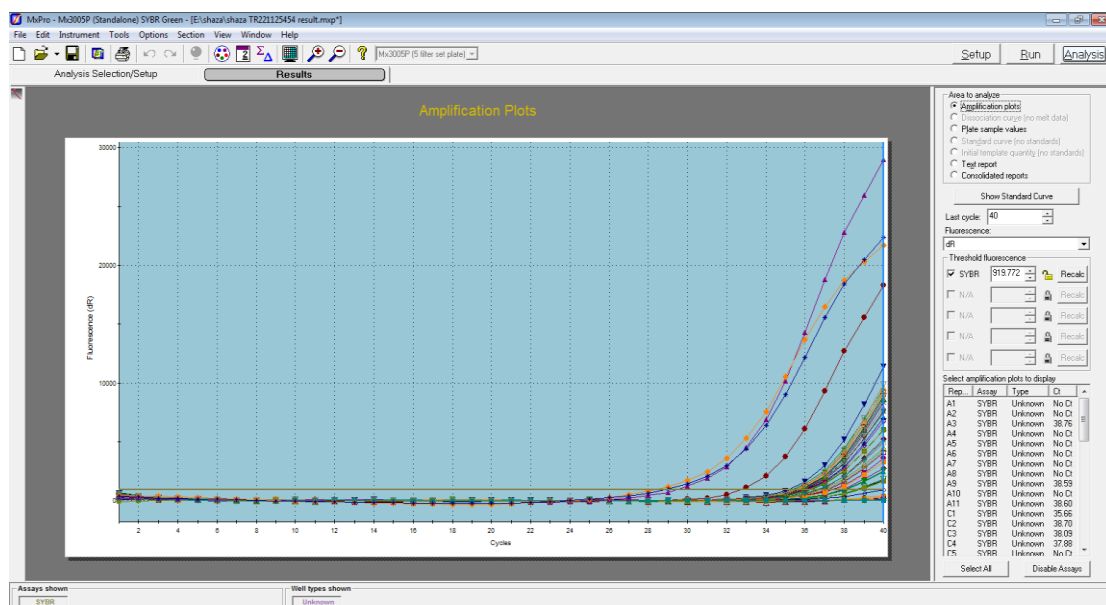
وفي دراسة Yang وزملاؤه (2011<sup>a</sup>) حول تحسين إنتاج قلويدات التربان (TAs) من مزارع الجذور الشعرية لنبات الأتروبا *A. belladonna* من خلال زيادة تعبير مورثي PMT وH6H، وجد أن جميع الخطوط الخلوية المدروسة ترافق فيها زيادة التعبير المورثي مع زيادة الإنتاج من قلويدات التربان، حيث قدر أقصى إنتاج للهيوسيامين (2.2 ملغ.غ<sup>-1</sup>) بـ11 ضعف إنتاج معاملة الشاهد و24 ضعف إنتاج النبات البري، في حين قدر أقصى إنتاج للسكوبولامين (1 ملغ.غ<sup>-1</sup> من الوزن الجاف) بـ5 أضعاف إنتاج معاملة الشاهد و4 أضعاف إنتاج النبات البري .

وبدراسة أخرى لم تحسن زيادة تعبير مورثة PMT وحدها من إنتاج الهيوسيامين والسكوبولامين في مزارع الأتروبا *A. belladonna* (Rothe وزملاؤه، 2003)، لكن زيادة تعبير مورثي PMT و H6H معاً حسن إنتاج قلويدات التربان TAs للنبات نفسه (Yang وزملاؤه، 2011<sup>a</sup>)، وهذا ما أكدته دراسة Zhang وزملائه (2004) على الجذور الشعرية لنبات البنج الأسود (*H.niger*) المستضيئة لكلا المورثتين PMT و H6H والجذور الشعرية المستضيئة لإحدى المورثتين فقط، مما يؤكد وجود فعل تآزري بين مورثي PMT و H6H (Yang وزملاؤه، 2011<sup>a</sup>). وهذا يؤكد الفرضية المقترحة من قبل Rothe وزملاؤه (2003) التي تقود إلى أنه لزيادة إنتاج قلويدات التربان يجب أن تتحقق زيادة في تعبير المورثات المرمزة للعديد من الأنزيمات في مسار التخليق الحيوي بوقت واحد.

### 3.5.6. تغير تعبير TR1 (Tropinone Reductase I) في الخطوط الخلوية Cellular

Lines لكالوس نبات البنج الذهبي *H. aureus* خلال 50 يوماً:

يبين الشكل رقم (27) قيم Ct الناتجة باستعمال المرئسة الخاصة بالمورثة المرمزة لأنزيم TR I، كما يبين الجدول (23) والشكل رقم (28) أنّ تعبير المورثة المرمزة لأنزيم TR I انخفض في الخطوط الخلوية المختبرة في بداية الطور المتلكى Lag phase بالمقارنة مع الشاهد، باستثناء اليوم الخامس حيث بلغ (6.364) و (5.776) و (3.182) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد في الخطوط الخلوية 5C، 6C، 10C على التوالي وبفروقات معنوية فيما بينها، كما كان التفوق معنوياً في مرحلة الطور الأسّي Exponential phase ليسجل أعلى قيمة في اليوم 30 بمقدار (9.781) و (2.144) و (8.168) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد في الخطوط الخلوية 5C، 6C، 10C على التوالي وبفروقات معنوية فيما بينها، ثم انخفض بعد ذلك في طور الثبات Platue phase حتى نهاية فترة النمو باستثناء اليوم 45 من عمر الخط الخلوي 10C الذي شهد ارتفاعاً جديداً في تعبير مورثة TR I ليسجل (4.028) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد وبفروقات معنوية.

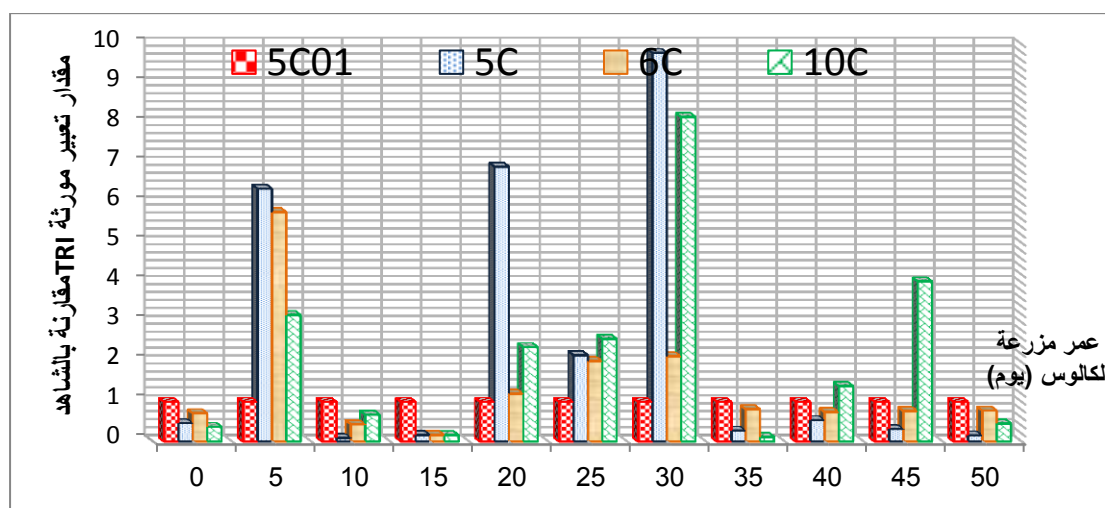


الشكل رقم (27): قيم Ct الناتجة باستعمال المرئسة الخاصة بالمورثة المرمزة لأنزيم TR I

الجدول رقم (23): قيمة تعبير مورثة TRI في الخطوط الخلوية Cellular Lines لكالوس نبات البنج الذهبي خلال 50 يوماً

| age (day)                   | الطور المتكئ   |                    |                    | الطور الأسّي       |                    |                    |                    |                     | طور الثبات          |                     |                     |
|-----------------------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                             | 0              | 5                  | 10                 | 15                 | 20                 | 25                 | 30                 | 35                  | 40                  | 45                  | 50                  |
| Control (5C <sub>01</sub> ) | 1 <sup>a</sup> | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>      | 1 <sup>a</sup>      | 1 <sup>a</sup>      | 1 <sup>a</sup>      |
| 5C                          | 0.463          | 6.364 <sup>b</sup> | 0.093 <sup>b</sup> | 0.163 <sup>b</sup> | 6.916 <sup>b</sup> | 2.174 <sup>b</sup> | 9.781 <sup>b</sup> | 0.5400 <sup>b</sup> | 0.5400 <sup>b</sup> | 0.3160 <sup>b</sup> | 0.1550 <sup>b</sup> |
| 6C                          | 0.712          | 5.776 <sup>c</sup> | 0.435 <sup>c</sup> | 0.162 <sup>b</sup> | 1.206 <sup>c</sup> | 2.028 <sup>c</sup> | 2.144 <sup>c</sup> | 0.742 <sup>c</sup>  | 0.742 <sup>c</sup>  | 0.768 <sup>c</sup>  | 0.779 <sup>c</sup>  |
| 10C                         | 0.371          | 3.182 <sup>d</sup> | 0.678 <sup>d</sup> | 0.160 <sup>b</sup> | 2.378 <sup>d</sup> | 2.585 <sup>d</sup> | 8.168 <sup>d</sup> | 1.395 <sup>d</sup>  | 1.395 <sup>d</sup>  | 4.028 <sup>d</sup>  | 0.457 <sup>d</sup>  |
| L.S.D (0.01)                | 0.0037         | 0.0037             | 60.0029            | 0.0046             | 0.0092             | 0.0064             | 0.0046             | 0.0920              | 0.09201             | 50.007              | 0.0091              |

الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى 1%



الشكل رقم (28): قيمة تعبير مورثة TRI في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي *H. aureus* خلال 50 يوماً

وتفسر عدم زيادة تركيز قلويدات التروبين (TAs) بزيادة تعبير مورثة TRI بعدم مقدرة أنزيم TRI المكون للتروبين Tropine على المنافسة على تدفق الكربون باتجاه تخليق مركب التروبين، كون طريق التخليق الحيوي لكل من التروبين والكاليسينجين يشتركان بالخطوات الأولى ويتنافسان بتدفق الكربون. هذا يتفق مع نتائج Dräger (2006) و Richter وزملاؤه (2005) على نبات الأتروبا *Atropa*.

تختلف هذه النتائج مع نتائج Zhao وزملاؤه (2017) في دراستهم حول تأثير تعبير مورثة TRI على المحتوى القلويدي في مزارع مستبتات الجذور الشعرية Hairy Root Cultures

للسكوبوليا *Scopolia lurida*، حيث بيّنوا أن التعبير المفرط للمورثة المدروسة تسبب بزيادة إنتاج الهيوسيامين بشكل رئيس في مزارع الجذور الشعرية، حيث تراوح من 0.892 إلى 1.492 ملغ.غ<sup>-1</sup> أي ما يعادل 1.7 إلى 2.9 أضعاف بالمقارنة مع الشاهد (0.515 ملغ.غ<sup>-1</sup>)، كذلك تحسن إنتاج السكوبولامين بشكل ملحوظ حيث تراوح من 0.268 إلى 0.632 ملغ.غ<sup>-1</sup>.

كما بيّن Kai وزملاؤه (2012) في دراستهم حول تأثير تعبير مورثتي H6H و TR1 على إنتاج قلويدات التربان في مزارع مستبتات الجذور الشعرية المحورة لنبات *Anisodus acutangulus*، أن مزارع الجذور التي هجنت بالمورثتين معاً أنتجت كمية أكبر معنوياً من قلويدات التربان بالمقارنة مع الشاهد ومزارع الجذور التي طعمت بإحدى المورثتين فقط (H6H أو TR 1)، وبلغ أقصى إنتاج من القلويدات 4.293 ملغ.غ<sup>-1</sup> في الخط TH53 والذي تفوق بمقدار 4.49 ضعف بالمقارنة مع الشاهد (0.96 ملغ.غ<sup>-1</sup>)، كذلك تحسن إنتاج قلويد الأنيسودين anisodine بشكل ملحوظ في الخط الخلوي نفسه الذي شهد زيادة تعبير المورثتين المدروستين، وبلغ 0.984 ملغ.غ<sup>-1</sup> ما يعادل 18 ضعف بالمقارنة مع الشاهد (0.053 ملغ.غ<sup>-1</sup>).

وفي محاولة مماثلة لزيادة إنتاج قلويدات التربان في مزارع مستبتات الجذور الشعرية لنبات *Anisodus acutangulus* المهجّنة بالمورثتين PMT و TR1، بيّنت النتائج أن مزارع الجذور التي هجنت بالمورثتين معاً أنتجت كمية أكبر معنوياً من قلويدات التربان بالمقارنة مع الشاهد ومزارع الجذور التي هجنت بإحدى المورثتين فقط (PMT أو TR 1)، وبلغ أقصى إنتاج من القلويدات 8.104 ملغ.غ<sup>-1</sup> في الخط PT18 والذي تفوق بمقدار 8.66 ضعف بالمقارنة مع الشاهد (0.935 ملغ.غ<sup>-1</sup>)، و 4.04 ضعف بالمقارنة مع أعلى إنتاجية في الخطوط المهجّنة بمورثة PMT فقط (2.004 ملغ.غ<sup>-1</sup>)، و 3.11 ضعف بالمقارنة مع أعلى إنتاجية في الخطوط المهجّنة بمورثة TR1 فقط (2.604 ملغ.غ<sup>-1</sup>). مما يدل على مقدرة مزارع مستبتات الجذور الشعرية على إنتاج وتجميع هذه القلويدات بشكل مشابه للنبات الأصلي (Kai وزملاؤه، 2011).

#### 4.5.6. تغير تعبير مورثة (Tropinone Reductases II) TR II في الخطوط الخلوية

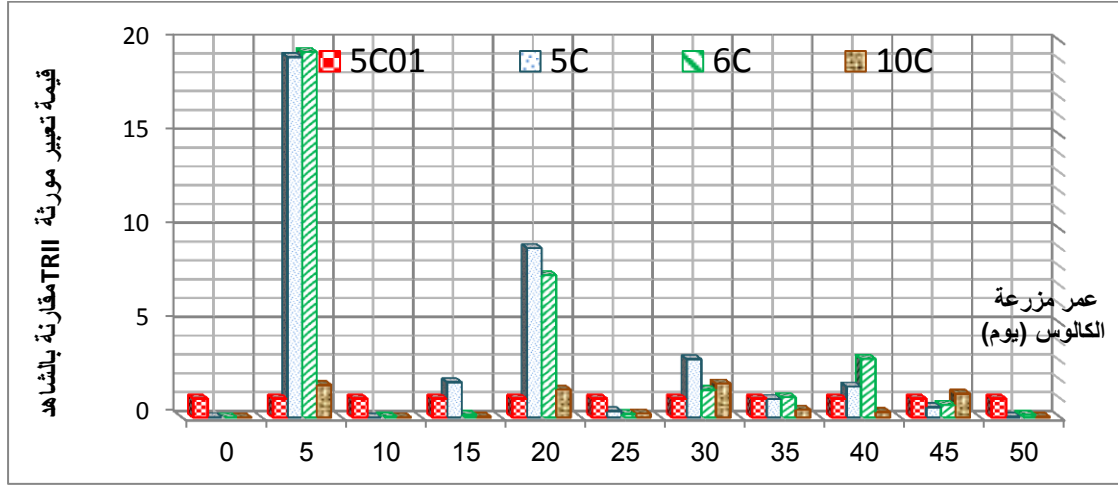
**Cellular Lines** لكالوس نبات البنج الذهبي *H. aureus* خلال 50 يوماً:

يبين الجدول رقم (24) والشكل رقم (29) أن تعبير المورثة المرمزة لأنزيم TR II انخفض في الخطوط الخلوية المدروسة في بداية الطور المتلكي Lag phase بالمقارنة مع الشاهد، في حين سجل أعلى قيمة في اليوم الخامس بمقدار (19.16) و (9.987) و (1.729) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد في الخطوط الخلوية 5C، 6C، 10C على التوالي وبفروقات معنوية فيما بينها، كما كان التفوق معنوياً في مرحلة الطور الأسّي Exponential phase ليسجل أعلى قيمة لتعبير المورثة في اليوم 20 (9.001) و (9.849) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد في الخططين الخليين 5C و 6C على التوالي وبفروقات معنوية فيما بينها، بينما أعلى قيمة لتعبير المورثة المدروسة في الخط الخلي 10C كانت في اليوم 30 بمقدار (1.803) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد. ثم بدأ بالانخفاض ليرتفع من جديد في طور الثبات Platue phase ليسجل في اليوم 40 (1.647) و (3.117) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد في الخططين الخليين 5C و 6C على التوالي وبفروقات معنوية فيما بينها، كما سجل في اليوم 45 (1.266) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد في الخط الخلي 10C وبفروقات معنوية بينهما، ثم انخفض تعبير المورثة في نهاية فترة النمو.

الجدول رقم (24): قيمة تعبير مورثة TRII في الخطوط الخلوية Cellular Lines لكالوس نبات البنج الذهبي *H. aureus* خلال 50 يوماً

| age (day)<br>Medium         | الطور المتلكي       |                    |                    | الطور الأسّي       |                    |                    |                    |                    | طور الثبات         |                    |                    |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                             | 0                   | 5                  | 10                 | 15                 | 20                 | 25                 | 30                 | 35                 | 40                 | 45                 | 50                 |
| Control (5C <sub>01</sub> ) | 1 <sup>a</sup>      | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     | 1 <sup>a</sup>     |
| 5C                          | 0.014 <sup>b</sup>  | 19.16 <sup>b</sup> | 0.003 <sup>b</sup> | 1.866 <sup>b</sup> | 9.001 <sup>b</sup> | 0.335 <sup>b</sup> | 3.095 <sup>b</sup> | 0.979 <sup>b</sup> | 1.647 <sup>b</sup> | 0.555 <sup>b</sup> | 0.035 <sup>b</sup> |
| 6C                          | 0.008 <sup>bc</sup> | 9.987 <sup>c</sup> | 0.045 <sup>c</sup> | 0.141 <sup>c</sup> | 9.849 <sup>c</sup> | 0.183 <sup>c</sup> | 1.474 <sup>c</sup> | 1.079 <sup>c</sup> | 3.117 <sup>c</sup> | 0.669 <sup>c</sup> | 0.148 <sup>c</sup> |
| 10C                         | 0.007 <sup>c</sup>  | 1.729 <sup>d</sup> | 0.017 <sup>d</sup> | 0.041 <sup>d</sup> | 1.485 <sup>d</sup> | 0.216 <sup>d</sup> | 1.803 <sup>d</sup> | 0.415 <sup>d</sup> | 0.287 <sup>d</sup> | 1.266 <sup>d</sup> | 0.033 <sup>b</sup> |
| L.S.D (0.01)                | 0.0063              | 0.0613             | 0.0051             | 0.0037             | 0.0079             | 0.0099             | 0.0090             | 0.0027             | 0.0079             | 0.0084             | 0.0084             |

الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 1%



الشكل رقم (29): قيمة تعبير مورثة مورثة TR II في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي H. aureus خلال 50 يوماً

وتفسر عدم زيادة تركيز قلويدات التربان TAs بزيادة تعبير مورثة TR II بأن أنزيم TR II يحرض تشكل البسيدوتروبيين Pseudotropine من خلال تنظيم أيض الكربون والمنافسة على تدفقه من قلويدات التربان Tropane alkaloids إلى الكاليسيتيجين Calystegine، وأن زيادة مستويات Reductase المشكل للبسيدوتروبان يزيد من تراكم الكاليسيتيجين في حين يبقى مستوى الهيسوسيامين ثابت، ووهذا يتفق مع نتائج Dräger (2006).

تختلف هذه النتائج مع نتائج Richter وزملائه (2005) الذين درسوا تأثير زيادة تعبير المورثتين المرزتين لأنزيمي TR1 و TR II في مزارع مستنبات الجذور الشعرية للأثروبا A. brilladonna، حيث أظهرت النتائج أن الجذور المحورة التي تضمنت تعبير مفرط للمورثتين المدروستين شهدت مستويات مرتفعة من فعالية أنزيم Reductase ومنتجاته (التروبيين Tropine الناتج عن Reductase I وبسيدوتروبيين Pseudotropine الناتج عن Reductase II)، وأن زيادة تعبير مورثة أنزيم TR1 الملحوظة ترافقت مع زيادة معنوية بمحتوى الهيسوسيامين (بمقدار 3 أضعاف بالمقارنة مع جذور الشاهد) والسكوبولامين (بمقدار 5 أضعاف بالمقارنة مع جذور الشاهد)، بينما كانت مستويات الكالستيجي أقل بنسبة 30-90% بالمقارنة مع الشاهد، على الرغم من زيادة مستوى البسيدوتروبيين بمقدار 4.5 ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد، تظهر هذه

النتائج تأثير واضح للنظم الأنزيمية والمورثية في تركيز إنتاج قلويدات التروبان في مزارع الجذور الشعرية.

وفي دراسة نفذها Kai وزملاؤه (2009) حول تأثير تعبير المورثتين المرمزتين لأنزيمي TR I و TR II على قلويدات التروبان (TAs) المنتجة في مزارع مستبتات الجذور لنبات *Anisodus acutangulus*، تبين أن مستويات نسخ TR I كانت أقل بكثير من مستويات نسخ TR II، ومع ذلك فقد راكمت مزارع الجذور الشعرية كمية من الهيوسيامين بلغت 1.87 ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد، في حين راكمت كمية من السكوبولامين بلغت 8 أضعاف أكبر بالمقارنة مع الشاهد. كما بينت الدراسة ذاتها أن أنزيمي TR I و TR II متشابهان بنسبة 60.8%، حيث يحوي عديد الببتيد المرمز للأنزيم الأول TR I (273) حمضاً أمينياً بينما يحوي عديد الببتيد المرمز للأنزيم الثاني TR II (260) حمضاً أمينياً، وهما يطابقان إلى حد ما أنزيمي TR I و TR II في نبات البنج الأسود (*H. niger*).

نستنتج مما سبق أن نقل الخلية إلى نظام الزراعة في الزجاج *In Vitro* يعني إنهاء وجودها كأحد العناصر الهيكلية في كائن لا يتجزأ، وتشكيل الكالوس (عودة الخلايا للحالة غير المتميزة) يتسبب في تغير بعض الخصائص المورفولوجية والوظيفية الملازمة للخلايا المتميزة الطبيعية، إضافة إلى أن الخلية في ظروف *In Vitro* قد تفقد السيطرة على العوامل الموجهة والضابطة لأنشطة مختلف الأعضاء أو الأنسجة أو الخلايا كوحدة متكاملة، فيبدأ الانتخاب عمله في التجمع الخلوي، ما يؤدي إلى تعزيز التباين الوراثي كنتيجة لاضطرابات نظم الكائن الحي المترابطة، لا سيما النظام الهرموني الذي ينشأ تحت تأثير تغير ظروف التغذية (Kunakh، 2005<sup>d</sup>)، والذي يؤدي إلى تغير في تعبير المورثات وعمليات النسخ والترجمة وغيرها العديد من الوظائف الخلوية (solov'yan وزملاؤه، 1994؛ Andreev، 2012). مؤدياً في النهاية إلى زيادة معتبرة في التنوع الوراثي للتجمع الخلوي المتشكل. كما أن ظروف وطريقة تغذية الخلية قد تحمل تغيرات ضرورية تفرض ردة فعل معينة على جينوم الخلية، تؤدي إلى إعادة ترتيب وظائف الخلية الأساسية وعمليات الاستقلاب، وزيادة كبيرة في التباينات الجينومية والمورثية وتغير في توجه وشدة الانتخاب الخلوي، وأخيراً تغيرات جوهرية في تركيب التجمعات الخلوية، فعلى سبيل المثال يختلف التجمع الخلوي عن أنسجة النبات الأصل بامتلاكه نسبة مرتفعة من التغاير الوراثي " عدم

التجانس أو التعددية الشكلية"، وإعادة ترتيبات جينومية واسعة، حيث حجم وعمق وأهمية إعادة الترتيبات الجينومية هذه قد تتجاوز الاختلافات بين الأنواع التي تحدث في الطبيعة. (solov'yan وزملاؤه، 1994؛ Andreev؛ 2012؛ Kunakh؛ 2005<sup>a</sup>).

#### 6.6. دراسة التضاعفات الصبغية:

يمثل النمط الصبغي صفة خلوية ومورفولوجية مهمة، كما تقترح الملاحظات الخلوية المتعلقة بعدد وتركيب الصبغيات أن النمط الصبغي للخلايا النباتية يخضع للتغير بسهولة في ظروف الزراعة بالزجاج *In Vitro* (Hanzel وزملاؤه، 1985).

وغالباً تنفذ الدراسات الخلوية على مزارع الكالوس Callus Cultures للأنواع النباتية من بعد البساج السادس، حيث لا يستقر التجمع الخلوي ويتسم بالثبات قبل ذلك، وذلك لحدوث تغيرات كبيرة في خصائص الخلايا المكونة للتجمع الخلوي كنتيجة لتكيف التجمع الخلوي كنظام بيولوجي مع ظروف الزراعة في الزجاج *In Vitro*، وقد بينت الدراسات المتعلقة بفحص الهيئة الصبغية (Karyotyping) لخلايا الكالوس في العديد من الدراسات دخول معظم الخلايا في طور الاستوائي خلال المرحلة الأسية من نمو الخلايا حيث سرعة الانقسام وزيادة كتلة الكالوس (Kunakh وزملاؤه، 2015).

#### 1.6.6. معامل الانقسام الخيطي Metotic index:

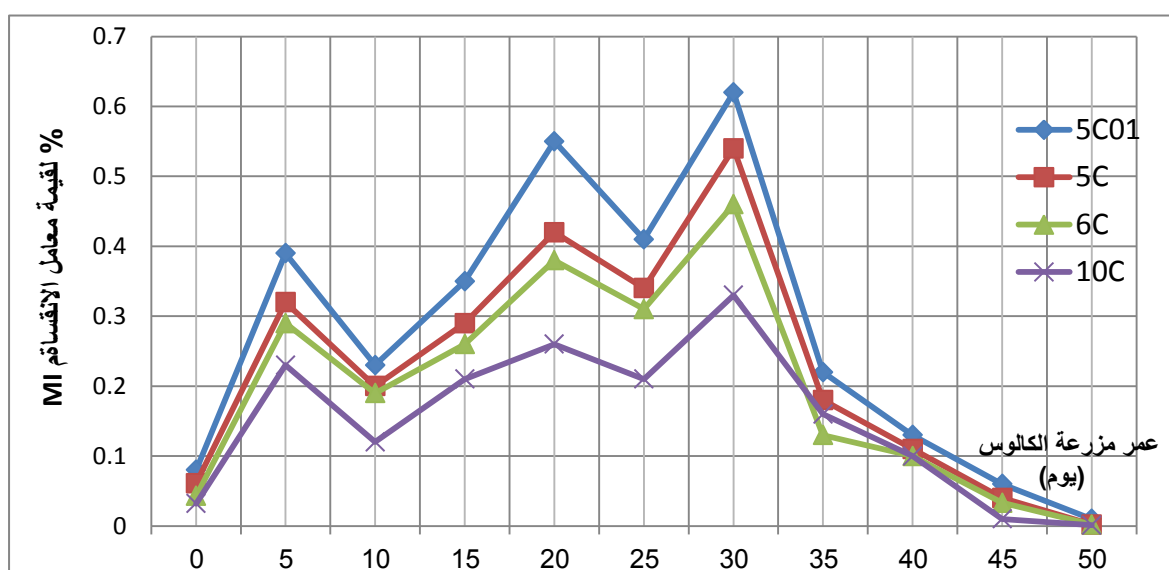
عند دراسة الأطوار المختلفة للانقسام الخيطي Metosis أظهرت نتائجنا ارتفاع قيم معامل الانقسام الخيطي MI في بعض مراحل النمو وانخفاضها في مراحل أخرى كما هو مبين في الجدول رقم (25)، حيث نلاحظ وجود ثلاث قمم ذروة لقيمة معامل الانقسام الخلوي الخيطي MI (الشكل رقم 30) للخطوط الخلوية النامية في جميع الأوساط المغذية وهي الأيام 5 و 20 و 30 من الزراعة، وهي الفترات الزمنية التي شهدت تشكيل كتلة خلوية Biomass كبيرة (معدل انقسام عال) كما أنها تطابقت مع بعض الفترات التي شهدت قيم مرتفعة لتعبير المورثات المرمزة لأنزيمات تخليق قلويدات التروبان PMT، H<sub>6</sub>H، TR I، TR II، حيث بلغت قيمة معامل الانقسام الخيطي MI في اليوم الخامس من الزراعة 0.39%، 0.32%، 0.29%، 0.23% في كل من الخطوط الخلوية 5C01، 5C، 6C، 10C على التوالي مع تفوق الشاهد 5C01.

بينما بلغت أعلى قيمة لمعامل الانقسام الخيطي MI في الطور الأسّي بعمر 30 يوم 0.62%، 0.54%، 0.46%، 0.33% في كل من الخطوط الخلوية 5C01، 5C، 6C، 10C على التوالي مع تفوق الشاهد. وبدأت قيمة معامل الانقسام بالانخفاض بعد ذلك وحتى نهاية طور الثبات بشكل حاد مع عدم وجود فروقات معنوية بين التجمعات الخلوية نتيجة انتهاء دورة حياة الخلية بسبب الشيخوخة أو استنزاف مكونات الوسط المغذي.

الجدول رقم (25): % لقيمة معامل الانقسام الخيطي في الخطوط الخلوية Cellular Lines لكالوس نبات البنج الذهبي *H. aureus* خلال مراحل عمرية مختلفة

| Medium | الطور المتكثف      |                          |                    | الطور الأسّي       |                    |                    |                           |                     | طور الثبات         |                    |                    |
|--------|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|        | 0                  | 5                        | 10                 | 15                 | 20                 | 25                 | 30                        | 35                  | 40                 | 45                 | 50                 |
| 5C01   | 0.08 <sup>a</sup>  | <b>0.390<sup>a</sup></b> | 0.230 <sup>a</sup> | 0.350 <sup>a</sup> | 0.550 <sup>a</sup> | 0.410 <sup>a</sup> | <b>0.620<sup>a</sup></b>  | 0.220 <sup>a</sup>  | 0.130 <sup>a</sup> | 0.060 <sup>a</sup> | 0.010 <sup>a</sup> |
| 5C     | 0.061 <sup>b</sup> | <b>0.320<sup>b</sup></b> | 0.20 <sup>ab</sup> | 0.290 <sup>b</sup> | 0.420 <sup>b</sup> | 0.340 <sup>b</sup> | <b>0.540<sup>ab</sup></b> | 0.180 <sup>ab</sup> | 0.110 <sup>a</sup> | 0.040 <sup>a</sup> | 0.002 <sup>a</sup> |
| 6C     | 0.043 <sup>c</sup> | <b>0.290<sup>b</sup></b> | 0.190 <sup>b</sup> | 0.260 <sup>c</sup> | 0.380 <sup>b</sup> | 0.310 <sup>b</sup> | <b>0.460<sup>b</sup></b>  | 0.130 <sup>b</sup>  | 0.100 <sup>a</sup> | 0.033 <sup>a</sup> | 0.002 <sup>a</sup> |
| 10C    | 0.032 <sup>c</sup> | <b>0.230<sup>c</sup></b> | 0.120 <sup>c</sup> | 0.210 <sup>d</sup> | 0.260 <sup>c</sup> | 0.210 <sup>c</sup> | <b>0.330<sup>c</sup></b>  | 0.160 <sup>b</sup>  | 0.100 <sup>a</sup> | 0.010 <sup>a</sup> | 0.001 <sup>a</sup> |
| I.s.d  | 0.0139             | 0.0363                   | 0.0363             | 0.0274             | 0.114              | 0.0597             | 0.1105                    | 0.0531              | 0.0531             | 0.0566             | 0.0199             |

الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 1%



الشكل رقم (30): النسبة المئوية لمعامل الانقسام الخيطي MI في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي *H. aureus* خلال مراحل عمرية مختلفة

وبما أن معامل الانقسام الخلوي الخيطي Metotic Index هو مؤشر للتكاثر الخلوي ومدى نشاط الانقسام الخيطي في التجمع الخلوي، فإن ارتفاع قيمة معامل الانقسام الخيطي تدل على ارتفاع معدل الانقسام الخلوي، وبهذا يمكن توقع ارتفاع معامل الانقسام الخيطي في التجمعات الخلوية النامية في ظروف مثالية، وانخفاض قيمته في التجمعات الخلوية النامية في ظروف غير مثالية، وهذا ما أكدته نتائج الدراسة الحالية التي بينت ارتفاع قيمة معامل MI في الشاهد 5C01 بالمقارنة مع الأوساط الأخرى المختبرة، ويفسر ذلك بغنى وسط الشاهد 5C01 بعوامل النمو من الأوكسينات والسيتوكينينات والفيتامينات والأحماض الأمينية الضرورية لتحقيق أفضل نمو للخلايا، مما شجع بناء البروتينات ونشاط الأنزيمات وتخليق الأحماض النووية تمهيداً لانقسام الخلايا وبوتيرة مرتفعة، لا سيما في الطور الأسّي الذي اتسم بمعدلات أيض مرتفعة وازدياد تراكم العوامل المشجعة على الانقسام لتكوين كتلة خلوية بأعداد كبيرة من الخلايا، وهذا يتفق مع نتائج George وزملاؤه (2008) ونتائج Eriksson (1965) و نتائج Centeno وزملاؤه (1996).

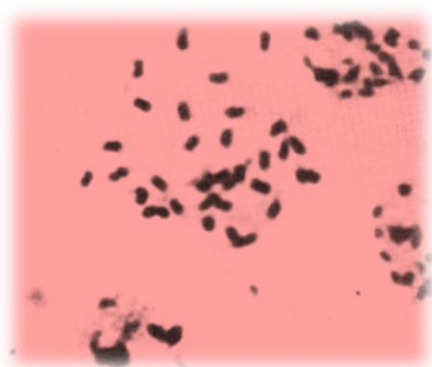
وقد أشارت العديد من الدراسات إلى وجود أكثر من نشاط ميتوزي واحد في اليوم الواحد ضمن المزرعة الخلوية الواحدة إذا يمكن ملاحظة عدة قمم (4 أو أكثر) للنشاط الخيطي خلال 24 ساعة، ( Madlung و Comal، 2004، Belyayev و Raskina، 2013، Houben وزملاؤه، 2013)، وهذا يتفق مع نتائج دراسة Bublyk وزملاؤه (2008) على نبات *Ungernia* حيث لاحظوا وجود ثلاث فترات لذورة الانقسام الخيطي وهي الأيام الخامس والثامن والثالث عشر من عمر مزرعة الكالوس.

## 2.6.6. تباينات العدد الصبغي Chromosome Number في الخطوط الخلوية Cellular

### Lines لكالوس نبات البنج الذهبي *H. aureus* خلال 50 يوماً:

إن توافر (إتاحة) ومستوى التغيرات الخلوية تم تقديرها بمقارنة عدد الصبغيات في خلايا الكالوس مع الصيغة الصبغية الثنائية للنوع النباتي، على الرغم من عدم توفر أية معلومة عن الصيغة الصبغية الثنائية لنوع البنج الذهبي (*H.aureus*)، لذلك تم دراسة العدد الصبغي في جذور النبات النامي في الزجاج *In Vitro* لتتم مقارنة مستوى التضاعفات الصبغية الحاصلة في التجمعات الخلوية.

بيّن التحليل الوراثي الخلوي لجذور نبات البنج الذهبي (*H. aureus*) وجود 17 زوجاً من الصبغيات في النمط النووي الثنائي  $2n=34$ ، كما في الشكل رقم (31)، ونظراً لعدم توفر مرجع يؤيد هذه النتيجة، إلا أن الدراسات المرجعية أوضحت العدد الصبغي لبعض أنواع جنس البنج *Hyoscyamus*، فمثلاً الصيغة الصبغية الثنائية للنوع *H. albus* ( $2n=34, 68$ )، بينما الصيغة الصبغية للنوع *H. niger* كانت ( $2n=34$ ) وللنوع *H. pusillus* كانت ( $2n=68$ )، بينما كانت الصيغة الصبغية في النوع *H. muticus* ( $2n=28$ ) وللنوع *H. georfei* ( $2n=102$ ) حسب (Fedorov، 1969، Tyagy و Dubey، 1989، Lavania وزملاؤه، 2010).

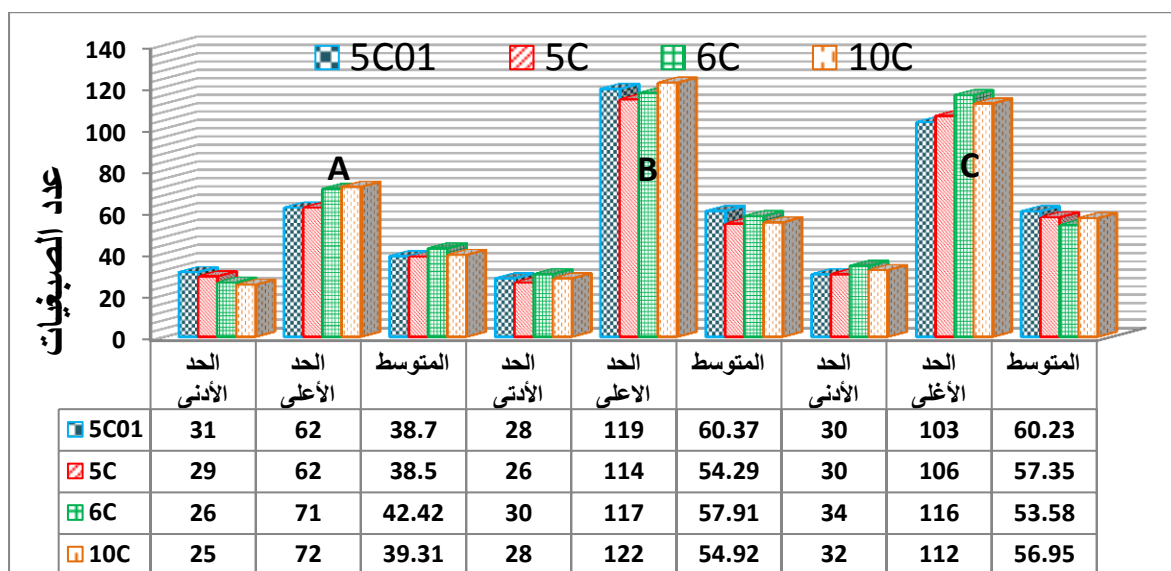


الشكل رقم (31): العدد الصبغي في جذور نبات البنج الذهبي ( $2n=34$ )

كما بينت نتائج الدراسة الصبغية اختلاف العدد الصبغي بين مزارع الكالوس المشتقة من نباتات النوع نفسه، وكذلك اختلاف العدد الصبغي بين خلايا مزرعة الكالوس الواحدة، حيث لوحظ وجود نطاق واسع في عدد الصبغيات ضمن المزرعة الخلوية الواحدة لنبات البنج الذهبي (*H. aureus*)، ويبيّن الجدول رقم (26) والشكل رقم (32) أنّ عدد الصبغيات قد تراوح في الطور المتكئ من 31 وحتى 62 بمتوسط قدره (38.7) في الخط الخلوي الشاهد 5C01، بينما تراوح عدد الصبغيات في الخط الخلوي 5C من 29 إلى 62 صبغي بمتوسط قدره (38.5)، وفي الخط الخلوي 6C تراوح عدد الصبغيات من 26 إلى 71 صبغي بمتوسط قدره (42.42)، بينما تراوح عدد الصبغيات في الخط الخلوي 10C من 25 إلى 72 صبغي بمتوسط قدره (39.31).

وفي الطور الأسّي تراوح عدد الصبغيات من 28 وحتى 119 بمتوسط قدره (60.37) في الخط الخلوي الشاهد 5C01، بينما تراوح عدد الصبغيات في الخط الخلوي 5C من 26 إلى 114

صبغي بمتوسط قدره (54.29)، وفي الخط الخلوي 6C تراوح عدد الصبغيات من 30 إلى 117 صبغي بمتوسط قدره (57.91)، بينما في الخط الخلوي 10C تراوح عدد الصبغيات من 28 إلى 122 صبغي بمتوسط قدره (54.92). أما بطور الثبات فقد تراوح عدد الصبغيات من 30 وحتى 103 صبغي بمتوسط قدره (60.23) في الخط الخلوي الشاهد 5C01، بينما تراوح عدد الصبغيات في الخط الخلوي 5C من 30 إلى 106 صبغي بمتوسط قدره (57.35)، وفي الخط الخلوي 6C تراوح عدد الصبغيات من 34 إلى 116 بمتوسط قدره (53.58)، وفي الخط الخلوي 10C تراوح عدد الصبغيات من 32 إلى 112 بمتوسط قدره (56.95).



الشكل رقم (32): تباين العدد الصبغي في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي *H. aureus* خلال أطوار النمو المختلفة A: الطور المتكاثف ، B: الطور الأسّي ، C: طور الثبات

تتوافق هذه النتائج مع نتائج دراسة Kunakh وزملاؤه (2015) على المزارع الخلوية لنبات الجنتيانا *Gentiana lutea* ( $2n=40$ ) والنامي في عدة مناطق بيئية في أوكرانيا، حيث تراوح عدد الصبغيات من 130-18 صبغي بمتوسط قدره 41.9 صبغي لكالوس نبات *G. lutea* النامي في وادي mt.Rohneska، بينما تراوح عدد الصبغيات من 84-19 صبغي بمتوسط قدره 37.8 صبغي لكالوس نبات *G. lutea* النامي في منطقة Troyaska، في حين كان أعلى مستوى من التباين في عدد الصبغيات في خلايا كالوس النوع *G.punctata* ( $2n=40$ ) حيث تراوح عدد الصبغيات من 240-16 صبغي بمتوسط قدره 96.1 صبغي لنوع *G.punctata* النامي في منطقة Breskul، مع سيادة خلايا ذات عدد صبغي تجاوز 6x بنسبة (21%) .

الجدول رقم (26): متوسط عدد الصبغيات في الخطوط الخلوية Cellular Lines لكالوس نبات البنج الذهبي *H. aureus* خلال أطوار النمو المختلفة

| الوسط | الطور المتلكئ      |                    |                    |                    | الطور الأسّي        |                    |                    |                    |                    |                     | طور الثبات         |                    |                     |                    |
|-------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|       | 0                  | 5                  | 10                 | المتوسط            | 15                  | 20                 | 25                 | 30                 | 35                 | المتوسط             | 40                 | 45                 | 50                  | المتوسط            |
| 5C01  | 34.7 <sup>a</sup>  | 43.53 <sup>a</sup> | 37.87 <sup>a</sup> | 38.7 <sup>a</sup>  | 51.26 <sup>a</sup>  | 51.6 <sup>a</sup>  | 56.07 <sup>a</sup> | 66.87 <sup>a</sup> | 76.07 <sup>a</sup> | 60.37 <sup>a</sup>  | 67.5 <sup>a</sup>  | 53.7 <sup>a</sup>  | 59.5 <sup>a</sup>   | 60.23 <sup>a</sup> |
| 5C    | 35.5 <sup>ba</sup> | 42.7 <sup>a</sup>  | 37.3 <sup>a</sup>  | 38.5 <sup>a</sup>  | 49.67 <sup>ab</sup> | 50.27 <sup>a</sup> | 48.87 <sup>a</sup> | 60.73 <sup>b</sup> | 61.93 <sup>b</sup> | 54.29 <sup>b</sup>  | 58 <sup>bc</sup>   | 61 <sup>b</sup>    | 53.06 <sup>b</sup>  | 57.35 <sup>a</sup> |
| 6C    | 34.87 <sup>a</sup> | 49.53 <sup>b</sup> | 42.87 <sup>a</sup> | 42.42 <sup>b</sup> | 51.67 <sup>a</sup>  | 58.13 <sup>b</sup> | 52.73 <sup>a</sup> | 65.53 <sup>a</sup> | 61.47 <sup>b</sup> | 57.91 <sup>ab</sup> | 54.07 <sup>c</sup> | 56.8 <sup>ab</sup> | 49.87 <sup>b</sup>  | 53.58 <sup>a</sup> |
| 10C   | 38.07 <sup>b</sup> | 42.13 <sup>a</sup> | 37.73 <sup>a</sup> | 39.31 <sup>a</sup> | 47.73 <sup>b</sup>  | 52.47 <sup>a</sup> | 48.6 <sup>a</sup>  | 65.8 <sup>a</sup>  | 60 <sup>b</sup>    | 54.92 <sup>ab</sup> | 61.33 <sup>b</sup> | 56.2 <sup>a</sup>  | 53.33 <sup>ab</sup> | 56.95 <sup>a</sup> |
| L.S.D | 2.019              | 1.832              | 6.526              | 1.38               | 2.74                | 2.89               | 10.262             | 2.037              | 9.001              | 5.69                | 4.94               | 4.55               | 6.35                | 9.3                |

الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى 1%

كما تبين نتائج الدراسة الحالية أنَّ الهيئة الشكلية السائدة للصبغيات في مزارع الكالوس لنبات البنج الذهبي (*H. aureus*) هي الصيغة الصبغية الثنائية Diploidy مع انحرافاتها Anueploidy (الجدول رقم 27 والشكل رقم 33)، حيث شكلت ما نسبته 78% و 76% و 60% و 73% في الخطوط الخلوية 5C01، 5C، 6C، 10C على التوالي في طور المتكئ Lag phase ومع وجود نسبة قليلة للصيغة الثلاثية (3x) Triploidy والرابعة Tetraploidy (4x)، في حين غابت الخلايا ذات الصيغة الصبغية المتعددة Polyploidy، بينما انخفضت نسبة الصيغة الصبغية الثنائية في طور الأسّي Exponential phase مع بقائها سائدة في جميع الخطوط الخلوية المدروسة باستثناء الشاهد 5C01، وارتفعت بالمقابل كل من الصيغ الصبغية الثلاثية (3x) والرابعة (4x) والمتعددة، وكذلك الأمر في طور الثبات Platue phase. وبذلك نجد أن الصيغة الصبغية الثنائية لم تتأثر بالزراعة طويلة الأمد حيث حافظت الصيغة الصبغية الثنائية على سيادتها في التجمعات الخلوية مما يشير إلى استقرار نسبي في جينوم نبات البنج (*H. aureus*).

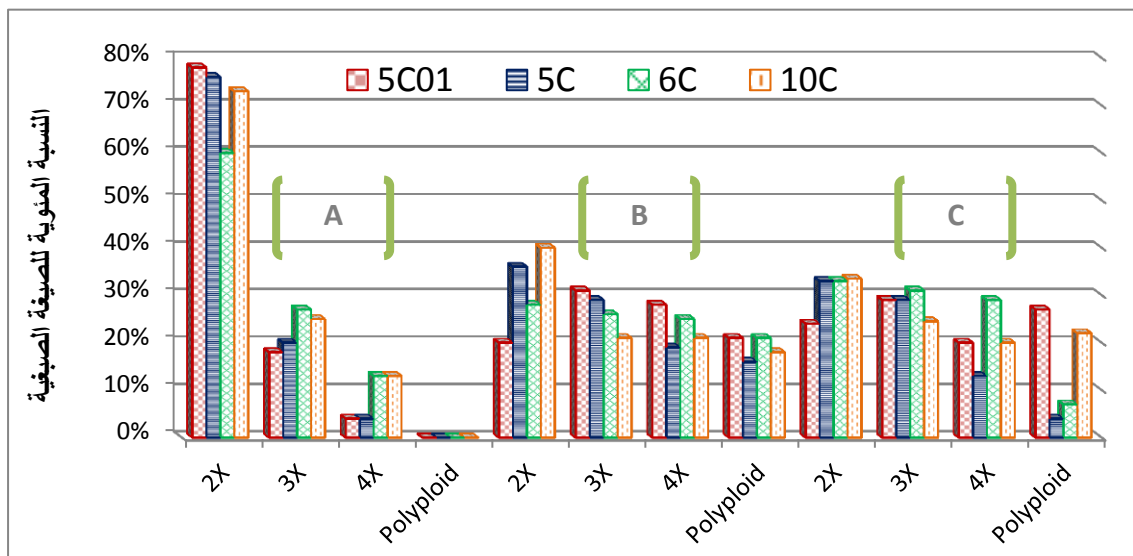
الجدول رقم (27): النسبة المئوية للصيغة الصبغية السائدة في الخطوط الخلوية Cellular Lines لكالوس

نبات البنج الذهبي *H.aureus* خلال مراحل عمرية مختلفة

| Medium | الطور المتكئ      |                  |                  |      | الطور الأسّي     |                   |                  |                   | طور الثبات         |                    |                  |                   |
|--------|-------------------|------------------|------------------|------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------|
|        | X2                | X3               | 4X               | POLY | X2               | X3                | 4X               | POLY              | X2                 | X3                 | 4X               | POLY              |
| 5C01   | %78 <sup>a</sup>  | %18 <sup>a</sup> | %4 <sup>a</sup>  | %0   | %20 <sup>a</sup> | %31 <sup>a</sup>  | %28 <sup>a</sup> | %21 <sup>a</sup>  | %24 <sup>a</sup>   | %29 <sup>ab</sup>  | %20 <sup>a</sup> | %27 <sup>a</sup>  |
| C5     | %76 <sup>ab</sup> | %20 <sup>a</sup> | %4 <sup>a</sup>  | %0   | %36 <sup>b</sup> | %29 <sup>ab</sup> | %19 <sup>b</sup> | %16 <sup>b</sup>  | %33 <sup>b</sup>   | %29 <sup>ab</sup>  | %13 <sup>b</sup> | %24 <sup>ab</sup> |
| C6     | %60 <sup>c</sup>  | %27 <sup>b</sup> | %13 <sup>b</sup> | %0   | %28 <sup>c</sup> | %26 <sup>b</sup>  | %25 <sup>a</sup> | %21 <sup>a</sup>  | %33 <sup>b</sup>   | %31 <sup>a</sup>   | %29 <sup>c</sup> | %7 <sup>c</sup>   |
| 10C    | %73 <sup>b</sup>  | %25 <sup>b</sup> | %13 <sup>b</sup> | %0   | %40 <sup>b</sup> | %21 <sup>c</sup>  | %21 <sup>b</sup> | %18 <sup>ab</sup> | %33.5 <sup>b</sup> | %24.5 <sup>b</sup> | %20 <sup>a</sup> | %22 <sup>b</sup>  |
| L.S.D  | 4.332             | 4.332            | 2.74             | --   | 5.48             | 3.623             | 3.623            | 4.332             | 4.595              | 4.595              | 4.332            | 3.625             |

الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 1%

أما وجود بعض الخلايا متعددة الصيغة الصبغية في المزارع الخلوية (موضوع الدراسة) والنامية لفترات طويلة ربما يعزى إلى زيادة تواتر شذوذات الطور الخيطي Metaphase لا سيما شذوذات العدد الصبغي Chromosome number، وهذا يتوافق مع نتائج Twardovska وزملائه (2008) في دراستها على المزارع الخلوية لنبات *Gentiana*.

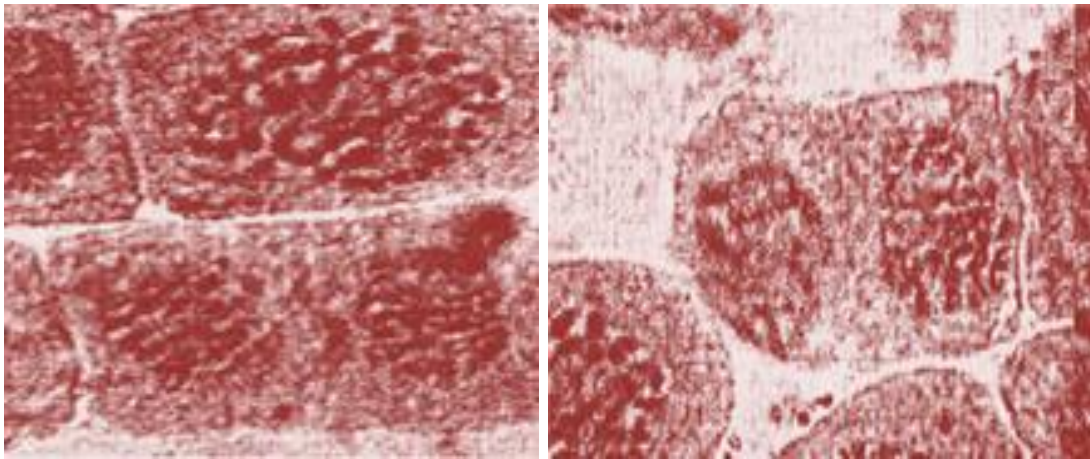


الشكل رقم (33): النسبة المئوية للصيغة الصبغية السائدة في الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي H. aureus خلال أطوار النمو المختلفة A: الطور المتكاثف ، B: الطور الأسّي ، C: طور الثبات

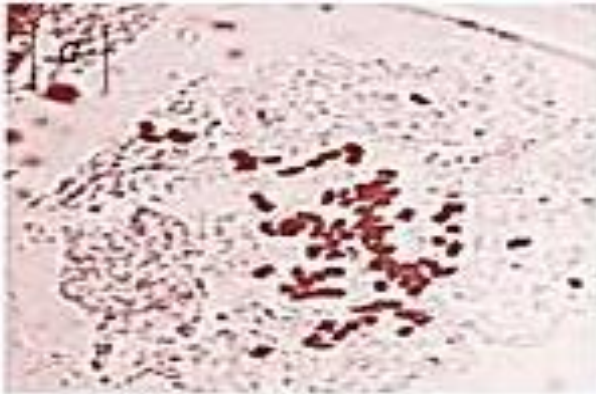
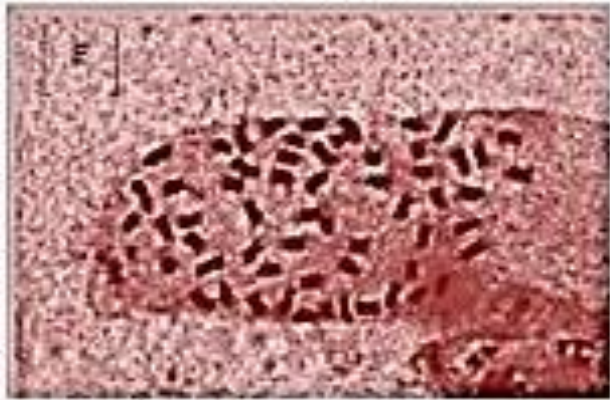
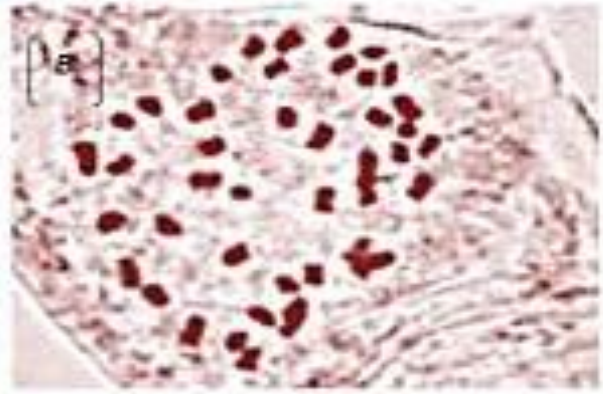
وفي دراسة لـ Bublyk وزملائه (2008) حول تباين الصيغة الصبغية في عدة خطوط خلوية (2، 3، 6، 7، 9) لكالوس نبات أنجيرنيا *Ungernia victoris* المنمّاة في أوساط مغذية مختلفة التركيب، تبين وجود مزيج من الصيغ الصبغية ضمن كل تجمع خلوي، مع وجود انحرافات Aneuploidy لكل صيغة صبغية يمكن أن تصل نسبتها (الانحرافات) حتى 50%، وقد سادت الصيغة الصبغية الثنائية في الخطين الخلويين 2 و 9 بنسبة 82.3% و 85.8% على التوالي، بينما لوحظ ثلاثة مستويات صبغية في الخط الخلوي 3، وهي الصيغة الثنائية (41.5%) والثلاثية (32.1%) والرابعة (17.9%)، أما في الخطين الخلويين 6 و 7 فقد كانا أكثر تغايراً بتركيبهما الصبغي حيث سادت في خلاياهما الصيغة الصبغية الرباعية بنسبة 57.8% و 49.5% على التوالي مع وجود نسبة لا بأس بها من الصيغة الثلاثية (14.6%) والخماسية Pentaploidy (13.5%) في الخط الخلوي 6، بينما لوحظ وجود نسبة قليلة لكل من الصيغة الصبغية الثنائية والثلاثية والخماسية والسداسية Hexaploidy والسباعية Heptaploidy في الخط الخلوي 7 والتي كانت نادرة الوجود في باقي الخطوط الخلوية.

عموماً، يمكن القول أن تنوع النمط الصبغي الموجود في خلايا كالوس نبات البنج *Hyosyamus* (الشكل رقم 35) يعود لأسباب عديدة، منها حدوث الطفرات الجسمية وتنوع

الصيغ الصبغية في الكالوس الأولي الناتج عن اختلاف النسيج المكونة للمستأصل النباتي (اختلاف الحالة الفيزيولوجية والشكلية الظاهرية)، مما ينتج عنه خطوط خلوية بصيغ صبغية مختلفة على الرغم من امتلاك النسيج المكونة للمستأصل النباتي نمط صبغي واحد ( $2n$ )، كما أن إعادة الزراعة Subculture المتكررة تؤدي أحياناً إلى أذية خيوط المغزل، مسببة اختلاف توزيع الصبغيات أثناء طور الهجرة Anaphase، وعدم حدوث الانقسام السيتوبلازمي أحياناً ينتج عنه خلايا متعددة النوى، كما أن ظروف تنمية المزارع الخلوية من حرارة وإضاءة... إلخ ومكونات الوسط المغذي، لا سيما الهرمونات النباتية من حيث نوعها وتركيزها وتوافقاتها بالإضافة إلى زيادة وتيرة الانقسام الخيطي تحت تأثير مكونات الوسط المغذي، وما يترتب على زيادة وتيرة الانقسام هذه من شذوذات بالمقارنة مع الصيغة الصبغية الثنائية المستقرة في النبات النامي في الطبيعة، جميعها عوامل تؤدي إلى تنوع النمط الصبغي في المزارع الخلوية.



الشكل رقم (34): خلية كالوس بطور الهجرة Anaphase (يمين) وبالطور التمهيدي Prophase (يسار)



الشكل رقم (35): العدد الصبغي في بعض خلايا الكالوس لنبات البنج الذهبي *H.aureus*

A:  $2n=28$ , B:  $2n=36$ , C:  $2n=44$ , D:  $2n=55$ , E:  $2n=60$ , F:  $2n=70$ , G:  $2n=84$ , H:  $2n=100$

نستنتج مما سبق ظهور اختلافات وراثية خلوية رسخت نفسها في التجمعات الخلوية خلال فترة التأسيس ومابعدھا (فترة السلالة المستقرة أو الخطوط الخلوية الثابتة)، لكن بالرغم من الوجود الكبير لخليط الصيغ الصبغية في التجمعات الخلوية المدروسة، كانت الصيغة الصبغية الثنائية أو قريبة من الصيغة الصبغية الثنائية (منقوصة أو مفرطة الصيغة الثنائية) هي الهيئة الشكلية السائدة، وهذا يؤكد على حفظ الخصائص الوراثية الخلوية للأنواع النباتية من خلال الزراعة النسيجية. وأن الاختلاف الوراثي في الخلايا المستزرعة في الزجاج تعتمد على تركيب وسط الزراعة الذي يمارس تأثيراً كبيراً (جوهرياً) على نمط التباين الوراثي في التجمعات الخلوية، حيث تعد مكونات الوسط أهم العوامل المسؤولة عن تنوع الصيغة الصبغية، خصوصاً تعدد الصيغة الصبغية وظهور مستوى عال من الشذوذات الصبغية، بالإضافة إلى أن الأنماط الوراثية (الخطوط الخلوية) للنوع النباتي نفسه الناتجة عن اختلاف تركيب الوسط المغذي تتسبب بظهور تراكيب سيتولوجية (وراثية خلوية) مختلفة، نتيجة فعل الانتخاب المستقر الذي يمارس تأثيره على التجمعات الخلوية لا سيما في مرحلة التأسيس وما بعد (عمر السنة وما فوق)، حيث تتميز هذه المرحلة بمعظم التغيرات الجذرية كنتيجة لتكيف الخلايا، وفيه تظهر التجمعات الخلوية تغيّراً وراثياً متزايداً من حيث مدة الدورة الخلوية وأطوارها بشكل عام والانقسام الخيطي بشكل خاص (Kunakh، 2013)، كذلك تزداد فيها التغيرات الجينومية وأهمها تغيرات العدد الصبغي ومستوى الشذوذات الصبغية (الجسور الصبغية، القطع الجسرية، الكسرات الصبغية)، وأخيراً يحدث انتخاب إيجابي للخلايا التي تكيفت للنمو في الظروف الجديدة وإزاحة الخلايا التي لم تتكيف (Kunakh، 2005<sup>a</sup>)، لتنتهي بتكيف التجمعات الخلوية المتمسكة بالتوازن الفيزيولوجي والوراثي الناتجين عن الفعل المسيطر والسائد للانتخاب المستقر (Kunakh، 2013)، ويظهر بعدها إما استقرار للتجمع الخلوي على مستوى جديد من التغيرات الوراثي، أو العودة (التقارب) إلى التركيب الوراثي الأصلي للتجمع (Kunakh، 2013).

## 7. الاستنتاجات والتوصيات:

1. نجاح تنمية الكالوس على أوساط مغذية خالية من منظمات النمو النباتية (5C، 6C، 10C) انطلاقاً من الخط الخلوي الأم 5C01 الغني بالفيتامينات والأحماض الأمينية ومنظمات النمو النباتية.
2. سيادة قلويد الهيوسيامين في الخطوط الخلوية، ويعود ذلك لحقيقة أن نبات البنج من الأنواع النباتية التي تنتج الهيوسيامين بشكل رئيس، ومن ثم تحوله في مراحل لاحقة إلى السكوبولامين.
3. تحقق أعلى إنتاج من قلويدات التربان في الخط الخلوي الشاهد 5C01 خلال مرحلة الطور الأسّي Exponential Phase بعمر 30 يوماً بمقدار 0.49%، في حين امتلكت الخطوط الخلوية النامية في الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو المقدرة على النمو وإنتاج الهيوسيامين Hyoscyamine بشكل رئيس ولكن بكميات أقل بالمقارنة مع الشاهد.
4. أدى اختلاف ظروف التنمية والنمو في مزارع الكالوس خاصة اختلاف عوامل التغذية المعدنية إلى ظهور اختلافات على مستوى جزي الـ DNA أمكن الكشف عنها بتقنية ISSR بالمقارنة مع النبات الأم النامي في *In Vitro*.
5. أظهر التحليل العنقودي وشجرة القرابة الوراثية انفصال النبات الأم المانح عن الخطوط الخلوية الناتجة عنه بشكل مستقل، في حين توضع الأخيرة في مجموعات متباينة حسب درجة قرابتها الوراثية.
6. أثبتت جميع المرئسات المستعملة في تطبيق تقنية ISSR فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية، حيث أعطت 217 حزمة كان منها 187 حزمة ذات تعددية شكلية بنسبة 86.175%، في حين كانت أعلى نسبة للتعددية الشكلية في الخط الخلوي 5C01 بنسبة 78.26% تلاه الخط الخلوي 5C بنسبة 76.38%، ما يجعله الخيار الأول لعمليات الانتخاب والتحسين الوراثي لرفع محتواه من القلويدات.
7. إمكانية تحفيز التباينات الجسمية Somaclonal variations بين التجمعات الخلوية في مزارع الكالوس، ما يجعل من ثقافة زراعة الكالوس مصدراً مهماً للاختلافات الوراثية، يمكن الاستفادة منها في عمليات الانتخاب الخلوي للوصول إلى خطوط خلوية مرتفعة الإنتاجية من المواد الفعالة حيويًا.

8. عمليات التكيف والنمو في المزارع الخلوية (غير المتميزة) تتضمن إعادة برمجة الجينوم حيث يتحول من حالة الخلايا المتخصصة إلى خصائص الخلايا المتقسمة (غير المتميزة).
9. كانت أعلى قيمة لتعبير مورثة PMT في عمر 30 يوماً في الوسط 10C بمقدار (7.728) ضعف أكبر بالمقارنة مع الشاهد 5C01، ولكن لم تكن هذه الزيادة كافية لزيادة إنتاج قلويدات الهوسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine في مزارع الكالوس لنبات البنج الذهبي (*H. aureus*).
10. زيادة تعبير المورثات التي تلت بموقعها موقع مورثة PMT ضمن مسار التخليق الحيوي لقلويدات التروبان (TAs) لم تكن ذات فعالية في زيادة مستويات الهوسيامين Hyoscyamine والسكوبولامين Scopolamine، نتيجة تحول مسار التفاعل من بوتريسين - تروبان (Putricine - Tropane) إلى بوتريسين - سبيرميدين (Spermedine - Putricine) في بدايته .
11. كانت النسبة المئوية لمعامل الانقسام الخيطي MI أعظمية بمرحلة الطور الأسّي Exponential Phase وهذا يسمح بالانتخاب لصالح أعلى تركيز لقلويدات التروبان TAs والتي تحققت في طور النمو نفسه، ما يتيح فرصة انتخاب خط خلوي ذي إنتاجية جيدة من القلويدات في هذه المرحلة.
12. الحفاظ على صيغة صبغية ثنائية Diploid أو قريبة من الصيغة الصبغية الثنائية يؤكد على حفظ الخصائص الوراثية للنوع النباتي المدروس واستقرار نسبي في الجينوم الخاص به.
13. حدوث تعدد للصيغة الصبغية في الخطوط الخلوية بالمقارنة مع الصيغة الصبغية الثنائية ( $2n=34$ ) يؤكد أن مزارع الكالوس مصدراً مهماً للاختلافات الوراثية يمكن الاستفادة منه في عمليات التحسين الوراثي.
14. نمو الخلايا في نظم الزراعات الخلوية ينتج عنه اضطراب توازن الأنسجة والأعضاء وهو السبب الشائع لحدوث الطفرات، لذلك كلما انحرفت ظروف التنمية عن الشروط المثالية زاد مستوى تباين المخزون الوراثي وزادت نسبة التباين الوراثي في التجمع الخلوي.
15. كان الخط الخلوي 5C الأقرب وراثياً ومورفولوجياً وكيميائياً إلى الخط الخلوي الأم 5C01 لذلك نوصي بمتابعة البحث عليه والعمل على تحسين محتواه من القلويدات.

16. اعتماد الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو النباتية في تنمية الخطوط الخلوية لكالوس النباتات الطبية، للحفاظ على الثباتية الوراثية لهذه الخطوط وتخفيف تكاليف إنتاج المواد الحيوية الفعالة.

17. بعد الوصول لمرحلة الثبات الوراثي للخطوط الخلوية المدروسة نوصي بتحسين إنتاجها من قلويدات التروبان (TAS) باستعمال طرائق الانتخاب الخلوي والتطهير الصناعي، أو باستعمال بادئات محفزة لإنتاج وتمثيل قلويدات التروبان مثل أحد الأحماض الأمينية التي تعد طلائع تخليق لهذه القلويدات .

18. بيئة الإنتاج (الوسط المغذي) قد لا تكون كافية للحصول على درجة النمو المطلوبة للحصول على أعلى معدل نمو للخلايا، ولذلك يوصى باستعمال طريقة التربية ثنائية الخطوات التي تتضمن: الخطوة الأولى استعمال وسط مغذي يسمح بالحصول على أعلى نمو للخلايا، والخطوة الثانية استعمال وسط مغذي يسمح بإنتاج وتراكم أعلى معدل من نواتج الاستقلاب الثانوية.

## 8- المراجع References

### المراجع العربية:

- أبو زيد، الشحات نصر. (2006). فسيولوجيا وكيمياء القلويدات في النباتات الطبية وأهميتها الدوائية والعلاجية، الطبعة الأولى، المركز القومي للبحوث، القاهرة.
- بكر، رعد هاشم؛ عبد الجاسم، محيسن الجبوري وحمي، حامد خضير. (2001). تأثير كلوريد الصوديوم في نمو مكونات خلايا كالس الفصاة *Medicago sativa* L.، مجلة العلوم العراقية، المجلد (32)، العدد2.
- بشر، شذى والعموري، يوسف ولاوند، سلام. (2012). التنوع الوراثي لنبات البنج الذهبي وإنتاج قلويداته بالزرع في الزجاج. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة دمشق.
- بشر، شذى و العموري، يوسف و لاوند سلام. (2014). التوصيف الجزيئي والشكلي لبعض الطرز البرية لنبات البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus* L. في المختبر. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، المجلد 30(1): 79-95.
- توما، روفانييل شليمون وعبد الجبار إسماعيل، مرعي. (2004). استجابة حاصل البطاطا *Solanum tuberosum* L للكثافة النباتية والبورون وحجم التقاوي. مجلة جامعة دهوك. 7(2): 8-20.
- الجبوري، خزعل ضبع وادي و الموسوي، علي حسين عيسى. (2011). العدد الصبغي الاحادي لبعض انواع الجنس *Nepeta* L. من العائلة الشفوية (Labiatae) في العراق. Diyala Journal for Pure Sciences، Vol: 7 No: 3, pp: 14-23.
- الجبوري، خزعل ضبع وادي (2010). دراسة تصنيفية مقارنة لانواع الجنس *Nepta* L spp (Labiatae) في العراق. اطروحة دكتوراه، جامعة بغداد -كلية العلوم.
- جندية، حسن. (2003). فسيولوجيا أشجار الفاكهة. الطبعة الأولى.الدار العربية للنشر والتوزيع جمهورية مصر العربية. ع ص 482.
- الحاتمي، كريم طالب خشان. (2010). دراسة فعالية أنزيم اليوريز داخل الجسم الحي وخارجه في كمية البروتين وإنتاج قلويدات التروبين في نوعي الداتورة. *Datura metel* Linn و *Datura innoxia* Mill، جامعة الكوفة، كلية العلوم.
- الحديدي، محمد علي حسين (2002). زراعة الخلايا النباتية. ( ترجمة ) . دار الفكر للطباعة والنشر .
- حرامي، ثناء محمد. (2002). دراسة تصنيفية كيميائية وبيئية لجنس البنج في جنوب سورية، جامعة دمشق، كلية العلوم، أطروحة ماجستير.
- الدجوي، علي. (1996). موسوعة النباتات الطبية والعطرية، مكتبة الدجوي، جمهورية مصر العربية، ص 285-292.
- الدليمي، خلف صوفي (1976). التسمم الغذائي، مطبعة الشعب، بغداد، ص 229.
- الرفاعي، عبد الرحيم توفيق والشوبكي، سمير عبد الرزاق. (2002). تقنيات القرن 21 لتحسين النبات باستعمال زراعة الأنسجة، دار الفكر العربي، القاهرة.

- الزبيدي، عادل موحان عداي. ( 1998 ). دراسة تصنيفية للأجناس *Marrubium L.*, *Ajuga L.* ، *Lamium L.* ، *Lallemantia Fisch.&C.A.Mey.* العائدة للعائلة الشفوية Labiatae في العراق ، أطروحة دكتوراه . جامعة بغداد - كلية العلوم
- ساعور، كوكب يعقوب وصباح، مهدي وعلي، صادق محمد. (2000). الكشف والتنقية والتقدير الكمي لمركب الفانكسترين في خلايا كالس نبات عين البزون *Catharanthus Roseus*، مجلة أبحاث التقانة الحياتية، العدد 2، المجلد (1)، ص: 35 – 52.
- السامرائي، خلود وهيب عبود. (1983). توزيع القلويدات وأهميتها التصنيفية في بعض الأنواع البرية في العائلة الباذنجانية Solanaceae في العراق. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد.
- سعيد، ز. م. (2001). الكيمياء وأثرها في دراسة النباتات الطبية، مجلة العلوم والتكنولوجيا، معهد الكويت للأبحاث العلمية، الكويت: 83: 41-46.
- سيد، محمود هيثم. (2001). استعمال مؤشرات من الدنا DNA في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير، جامعة دمشق، كلية الزراعة، أطروحة دكتوراه.
- شلاهي، ستار عبدالله (2009). دراسة تأثير بعض العوامل في استحثاث الكالوس من متوك الفاصوليا. مجلة ديالى للعلوم الصرفة.
- الشماع، علي عبد الحسين (1989). العقاقير وكيمياء النباتات الطبية، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، بيت الحكمة، ص128.
- صالح، مصلح محمد سعيد (1990) . فسيولوجيا منظمات النمو النباتية . الطبعة الاولى ، مطبعة جامعة الموصل ، العراق .
- عطية، حاتم جبار وعبد الجاسم، محيسن وابراهيم، عبد الله الشمري. (2002). تأثير D-2,4 والكينتين في تكوين الكالس وتماييز الاعضاء من الأجزاء النباتية لثلاثة أصناف من قصب السكر مجلة العلوم الزراعية العراقية، المجلد (33)، العدد 2 .
- العودة، أيمن الشحاذة وخيتي، مأمون ونصر، ريماء رباح. (2016). فزيولوجيا المحاصيل الحقلية، الجزء النظري، منشورات جامعة دمشق، كلية الزراعة ص 234.
- العودة، أيمن الشحاذة وخيتي، مأمون. (2007). فزيولوجيا المحاصيل الحقلية، الجزء النظري، منشورات جامعة دمشق، كلية الزراعة ص 289.
- الغانمي، علي عبد الكاظم جاسم. (2000). إنتاج وتنقية وتوصيف المواد المضادة للأورام من مصادر محلية، أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة بغداد.
- فهيم، فكري جلال محمد. (2003). زراعة الأنسجة النباتية. كلية الزراعة جامعة أسيوط. ص: 142 – 137.
- الكعبي، حسين خلف وحسين، ونام مناضل. (2011). تأثير إضافة مستخلص البطاطا *Solanum tuberosum* وعصير الليمون *Citrus sinensis* في استحثاث الكالوس لصنفي الحنطة *Triticum aestivum* هاشمية ومكسبياك. مجلة أبحاث البصرة (العلميات)، العدد 37، الجزء B.5 .
- ماكثير، هـ. م وبونيلي، ا. ج. (1979). أسس الكروماتوغرافيا الغازية. ترجمة: مراد يوسف 1980، وزارة التعليم العالي، الجمهورية العربية السورية، ص: 338.

- محمد أمين، سامي كريم و عبد العزيز، نسرين خليل و علوان، نوال محمد. (2009). تأثير رش كبريتات النحاس والمفنيديوم في نمو وإزهار نبات الشبوي الأصفر *Erysimum cheiri*. مجلة الكوفة للعلوم الزراعية. المجلد (1)، العدد (2)، ص: 43-55.
- محمد، عبد المطلب سيد وعمر، مبشر صالح. (1990). المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والأنسجة والأعضاء النباتية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل، مديرية دار الكتب للطباعة والنشر، ص 145.
- المختار، سراب عبد الهادي. (2008). دراسة إنتاج بعض القلويدات المورفينية من نبات الخشخاش *Papaver somniferan* خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير، كلية الزراعة قسم البستنة، جامعة بغداد. ص 51-50.
- الملاح، مزاحم قاسم ويونس، أواب وعد الله (2001). عزل وتشخيص الهبوسين والهبوسيامين في الكالس والنباتات الناتجة منه لنبات *Datura Innoxia*، مجلة التربية والعلم، العدد 35.
- مور، توماس. (1982). الهرمونات النباتية، فسيولوجيتها وكيميائها الحيوية، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل.
- الشالط، عمر محمود . 2006. أعراض نقص وسمية العناصر الغذائية في الخضار والفاكهة . سلسلة النشرات الزراعية . غرفة زراعة دمشق. سوريا . ع ص 66 .
- المياح، عبد الرضا علوان. (2001). النباتات الطبية والتداوي بالأعشاب، مركز عبادي للطباعة والنشر، صنعاء، اليمن. ص 225.
- يونس، أواب وعد الله ومزاحم، قاسم الملاح. (2001). تغير استجابة أنسجة نبات الداتورة *Datura innoxia* للزراعة النسيجية في ثلاثة أنواع من الوسط الغذائي. مجلة التربية والعلوم، المجلد 3، العدد 6، ص: 44-53.

- Abrahamian, P and Kantharajah, A. (2011).** Effect of Vitamins on In Vitro Organogenesis of Plant *American Journal of Plant Sciences*, 2:669-674.
- Adams, D. S (2003).** In: Lab Math: A Handbook of Measurements, Calculations and Other Quantitative Skills for Use at the Bench Chapter 5, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY:127–45.
- Adibfar, A.; Dilmaghani, K.; Hekmat Shoar, H. (2011).** 'Alkaloids contents of *Hyoscyamus niger* L. at different organs in different growth stages'. *Iranian Journal of Plant Physiology* .1 (3): 187-192
- Ajungla, L. P.; Patil, P.; Barmukh, R. B and Nikam. T. D. (2009).** Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root culture of *Datura metel* L. *Indian Journal of Biotecnology*, 8:317 -322.
- Alaghemand. A.; Ghorbanpour. M.; Moghaddasian. B. (2013).** Tropane alkaloids elicitation of *Black Henbane* parts with calcium and nitrogen application under hydroponics culture. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnolog* 17(4): 107- 113,.
- Al-Ammouri, Y and Beshar, S. (2013).** production of tropane alkaloids from callus culture of *Hyoscyamus aureus*. *Journal of The bulletin of the Ukrainian Society for Genetics and Selections*.
- Al-Ammouri, J. (2006).** Submerged maintenance technology drill for *Rauwolfia serpentine* tissue culture as indoline alkaloids producent. Manuscript. Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine Kyiv.
- Al-Hashimi, N. Z. (1999).** Extraction and purification of the Alkaloid Atropine from *Datura stramonium* and study its Biological activity, M.Sc. Thesis,college of science, Al – Mustansiriya University.
- Al-Humaid, A. I. (2004).** Effects of compound fertilization on growth and alkaloids of *Datura* plant. *Journal of Plant Nutrietion*, 27:2203- 2219.
- Ali, N.; Mulwa, R. M.; Mortan, M. A.; Skirvin, R. M. (2003).** Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*.78:739-741.
- Aljibouri, A. M. J.; AL-Samarraei, K. W.; Abd, A. S.; Mageed, D. M.; Ali, A. A. (2012).** Alkaloids production from callus of *Hyoscyamus niger* L. in vitro. *Journnal of life sciences* 6 :874-882.
- Al-Khayri, J. M. (2001).** “Optimization of Biotin and Thiamine Requirements for Somatic Embryogenesis of *Date Palm (Phoenix dactylifera* L.),” *In Vitro Cellular & Develop- mental BiologyPlant*, 37(4): 453- 456.

- Al-Maarri, K. W.; Al-Ghamdi, A. S. (1997).** Micropropagation of Five Date Palm Cultivars Through *in vitro* Axillary Buds Proliferation. *D.U.J. Agri. Sci.* Vol. 13.
- Altman, A and Uriel, B. (1981).** Involvement of polyamine in plant growth and Senescence. In *Advances in Polyamine research* , Vol. 3. Edited by B.C. Jarvis ; P.R.M. Shannon and S. Yasmin , *Plant and Cell Physiol* . 24 (4): 677 – 683.
- Aly, U. I.; El-Shabrawi, H. M.; Hanafy, M. (2010).** Impact of Culture Conditions on Alkaloid Production from Undifferentiated Cell Suspension Cultures of Egyptian Henbane. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(10): 4717-4725,
- Ammirato, P. V.; Evans, D. V.; Sharp, W. R and Yamada, Y. Y. (1983).** “Handbook of Plant Cell Culture”. Manchester University, U.K.
- Anderson J. A.; Mousset D. C.; Williams, E. G. and Taylor, N. L. (1991).** An *in vitro* chromosome doubling method for clovers (*Trifolium spp.*). *Genome* 34 (1):1-5.
- Andreev I. O. (2012)** . Plant tissue culture as a model of evolutionary processes // Achievements and problems of genetics, breeding and biotechnology / Ed. V. A. Kunakh.–K.: Logos. 4: 7–12.
- Andrijany, V. S.; Indrayanto, G and Soehono, L. D. (1999).** Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt on sapogenin steroids content in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 55: 103-108.
- Arafah, R. M. H.; Sapir, Y.; Shmida, A.; Iraki, N.; Fragman, O and Comes, P. (2002).** Patterns of genetic and phenotypic variation *Iris hayni* and *I. atrofusca* (*Iris* sect. *Onocyclus* = the royal irises) along an ecogeographical gradient in Palestine and the West Bank, *Mol. Ecol.* 1:39-53
- Arroo, R.; Woolly, J.; Oksman, K. M. (2007).** *Henbane, Belladonna, Datura and Dubosia*. *Phys. Plant.* 25: 189-204.
- Ayabe, S.; Takano, H.; Fujita, T.; Hirota, H and Takahashi, T. (1990).** Triterpenoid biosynthesis in tissue cultures of *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera*. *Plant Cell Reports*, 9: 181-184.
- Ayabe, S.; Iida, K and Furuya, T. (1986).** Induction of stress metabolites in immobilized *Glycyrrhiza echinata* cultured cells. *Plant Cell Reports*, 3: 186-189.
- Ayad, W. G.; Hodgkin, T.; Jaradat, A and Rao, V. R. (1997).** Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report for an IPGRS workshop. *IGPRS, Rome, Italy*, 11-12.

- Bago, B.; Zipfel, W.; Williams, R. M.; Jun, J.; Arreola, R.; Lammers, P. J.; Pfeffer, P.; Shchar Hill, Y. (2002).** Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant physiology* . 128: 108-124.
- Baharathi, B.; Sharmiladovi, R and Daniel, G. S. (2010).** Studies on antibacterial activity and phytochemical analysis of *Datura metel* L. against bacterial pathogens associated with AIDS. *Advanced Biotech.* 10(03):21-25.
- Bracket, A. H and Stenlake, J. B. (1975).** Practical Pharmaceutical Chemistry . The Athlone Press , London . Cited by Jorgenson , E . C and Daniels , T . C.
- Barthe, G. A.; Jourdan, P. S.; McIntosh, C. A.; and Mansell, R. L. (1987).** Naringin and limonin production in callus cultures and regenerated shoots from *Citrus* sp. *Journal of Plant Physiology*, 127: 55-65.
- Bashir Khana J. M and Harborne, B. (1991).** Potassium deficiency increases tropane alkaloid synthesis in *Atropa acuminata* via arginine and ornithine decarboxylase levels. *Phytochemistry*, 30(11): 3559-3563.
- Baskaran, P and Jayabalan, N. (2005).** Role of basal medium, carbon source and growth regulator in micropropagation of *Eclipta alba* - a valuable medicinal herb. *KMITL Sci J*, 5: 469-682
- Belyayev, A and Raskina, O. (2013).** Chromosome evolution in marginal populations of *Aegilops speltoides*: causes and consequences. *Ann Bot.*; 111: 531–538.
- Bensaddek, L.; Gillet, F.; Nava-Saucedo, J. E.; Fliniaux, M. A. (2001)** The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *J Biotechnol* 85:35-40 .
- Bernard, F. P. (2001).** B.S.C (hons) (Macquarie). M.A. (Wurzburg) beans and leaves a history of the chemical therapy of Parkinsonism. University, Warburg. Pp: 59-60.
- Besher, S.; Al-Ammouri, Y.; Murshed, R. (2014).** Production of tropane alkaloids from *in vitro* and callus cultures of *Hyoscyamus aureus* and their genetic stability assessment using ISSR markers. *Journal of physiology and molecular biology of plants*, 20 (3): 343-349. India
- Bhalsing, S. R and Maheshwari, V. L. (1998).** Plant tissue culture-a potential source of medicinal compounds. *J. Scient. Indust. Res.* 27: 703-708.
- Blair, M. W.; Panaud, O and Mc Couch, S. R. (1999).** Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 98:780-792.
- Bornet, B and Branchard, M. (2001).** Non-anchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22:427- 432.

- Bouché, J. P. (1981).** The effects of spermidine on endonuclease inhibition by agarose contaminants. *Anal. Biochem.* 115: 42-50.
- Bown, D. (1995).** Encyclopaedia of herbs and their uses. Dorling Kindersley, London. ISBN0. 22: 7513-12031.
- Brain, K. R. (1976).** Accumulation of L-DOPA in cultures from *Mucuna pruriens*. *Plant Science Letters*, 7: 157-161.
- Brekov, S.; Pavlov, A.; Kovatcheva, P.; Stanimirova, P.; Philipov, S. (2003).** Alkaloid spectrum in diploid and tetraploid hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Z Naturforsch* 58c:42-46.
- Brekov, S.; Philipov, S. (2002).** Alkaloid spectrum in diploid and autotetraploid plants of *Datura stramonium*. *Pharm Biol.* 40(8):617-621.
- Bronet, B.; Goraguer, F.; Joly, G and Branchard, M. (2002).** Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome*, 45:481- 484 .
- Bruce, R. C.; Dahlquist, K. D.; Salomonis, N.; Vranizan, K.; Lawlor, S. C.; (2002).** GenMAPP, a new tool for viewing and analyzing microarray data on biological pathways. Nature Publishing Group <http://genetics.nature.com>.
- Bryant, J. P., Chapin, F. S and Klein. D. R. (1983).** Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* 40: 357-368.
- Bublyk, O. M.; Andreev, I. O.; Spiridonova, K. V.; Kunakh, V. A. (2008).** Somaclonal variability of *Ungernia victoris*: the necessity for comprehensive genetic analysis. *Biopolym Cell* 24:487–493.
- Bustin, S. A. (2000).** Absolute quantification of mRNA using Real Time reverse transcription polymerase chain reaction assays *Journal of Molecular Endocrinology*. 25: 169-193.
- Cardillo, A. B.; Otálvaro, A. A. M.; Busto, V. D.; Talou, J. R.; Velásquez, L. M. E and Giulietti, A. M. (2010).** Scopolamine, anisodamine and hyoscyamine production by *Brugmansia candida* hairy root cultures in bioreactors . *Process Biochemistry*, 45(9): 1577-1581.
- Cavan, G.; Potier, V and Moss, S. R. (2000).** Genetic diversity of weeds growing in continuous wheat. *Weed Res*, 40: 301-310.
- Celine, D and Michele, B. C. (2005).** A strategy for over accumulation of scopolamine in *Datura innoxia* Hairy Root cultures, *J. Act. Biol. Cracovinsia*, 47: 101– 07.
- Centeno, M.; Rodviquez, L.; Feito, A and Fernade, I. (1996).** Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actini deliciosa* tissue culture. *plant-cell-Rep*, 16:58-62.

- Chalapian, F and Majd, A. (2003).** Study on changes in tropane alkaloid production in vegetative, pre-flowering, flowering and fruiting time and effect of microelements and sugars on alkaloids biosynthesis in tissue culture of *Hyocymus nigra*. *J. Basic Sci.*, 50: 23-40.
- Chatfield, S. P.; Stirnberg, P.; Forde, B. G.; and Leyser, O. (2000).** The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24:159–169.
- Chashmi, N. A.; Sharifi, M.; Karimi, F and Rahnama, H. (2010).** Differential Production of Tropane Alkaloids in Hairy Roots and *in vitro* Cultured Two Accessions of *Atropa belladonna* L. under Nitrate Treatments. *Z. Naturforsch.* 65c: 373 – 379.
- Chevallier, A. (1996).** The Encyclopedia of Medicinal Plants. Dorling Kindersley Publishers, London, UK.
- Chowdhury, M. A.; Vandenberg, B and Warkentin, T. (2002).** Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum* L). *Euphytica*, 127: 317- 325.
- Collett, C. E.; Harberd, N. P.; Leyser. O. (2000).** Hormonal interactions in the control of *Arabidopsis hypocotyl* elongation. *Plant Physiol.*124(2):553-62.
- Cordell, G. A. (1978).** Alkaloids. In: Mark HF, Othmer DF, Overberger CG, Seaborg GT eds Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology, vol 1. John Wiley & Sons, New York, 883–943.
- CY, M.; WK, L and Che, C. T. (2002).** Lignanamides and non alkaloidal components of *Hyoscyamus niger* seeds. *J Natural Prod*, 65:206-209.
- Darlington, C. D and LaCour, L. F. (1976).** The handling of chromosomes. 6<sup>th</sup> ed.
- Davuluri, G. R ; Van, T . A and Fraser, P. D. (2005).** Fruit specific RNAi – Mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes . *Nature Biotechnology* , 23(7) : 890 –895.
- Day, K. B.; Draper, J and Smith, H. (1986).** Plant regeneration and thebaine content of plants derived from callus culture of *Papaver bracteatum*. *Plant Cell Reports*, 5: 471-474.
- Desbene, S.; Hanquet, B.; Shoyama, Y.; Wagner, H and Lacaille-Dubois, M. (1999).** Biologically active triterpene saponins from callus tissue of *Polygala amarella*. *Journal of Natural Products*, 62: 923-926.
- De Luca, V and ST Pierre, B. (2000).** The cell and developmental biology of alkaoid biosynthesis. *Trends in plant science*. 5(4):168-173.
- Dehghan, E.; Suvi, T.; Kirsi-Marja, H.; Oksman, C. F.; Ahmadi, S. H. (2012).** Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and in

- vitro hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* .110:35–44.
- Demeyer, K.; Dejaegere, R. (1998).** Nitrogen and alkaloid accumulation and partitioning in *Datura stramonium* L. *Journal of Herbs, Spice and Medicinal Plants* 5(3): 15-23.
- Dixon, R. A. (1985).** “ Plant Cell Culture, a Practical Approach”. IRL press. Oxford, U.K.
- Doerk, K.; Witte, L and Wilham, A. (1991).** Identification of tropane alkaloids in hairy root culture of *Hyoscyamus albus*. *Z. Naturforsch*, 46:519-521.
- Doyle, J. J and Doyle. J. L. (1990).** Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus*. 12:13-15.
- Dräger, B. (2006).** Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry* 67 327–337.
- Ebrahimzadeh, H and Tarighi, G. H. (2004).** In vitro flower production in some species of *Hyoscyamus* (*H. pusillus* L., *H. arachnoideus* pojark, and *H. niger* . *Journal Of Sciences* .Islamic Republic Of Iran, 15(4):311 – 314.
- Ebrahimzadeh, H.; Teimoori, A and Lohraseb, T. (2003).** Hyoscyamine 6 B $\beta$  Hydroxylase Gene Isolation From In Vitro Cultured Roots Of *Hyoscyamus niger* L. And *Hyoscyamus tenuicaulis* Schonbeck-Temesy .*DARU*. 11(1):33-37.
- Elizabet M.; Sarah E- O'connor. (2009).** Opportunities in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production. *Journal of Natural products from plant cell cultures*:292- 300.
- El-Shawaf, I. I. S.; Bekhit, M. M. M.; Hassan, A. M.; El-Saied, F. M and Masoud, I. M. (2003).** Use of RAPD and ISSR markers for the identification of Egyptian Henbane (*Hyoscyamus muticus* L.) genotypes.
- Eriksson, T. (1965).** “Studies on the Growth Requirements and Growth Measurements of Cell Cultures of *Haplopappus gracilis*,” *Physiologia Plantarum*, 18(4): 976-993.
- Evans, W. C. (2002):** Trease and Evans' Pharmacognosy. 15<sup>th</sup> edition, W. B. Saunders Company Ltd. Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto.
- Evans, D. A. (1989).** Somaclonal variation. Genetic bass and breeding application .*Journal of Tarends Genet*, 95:46-50.
- Facchini, P. J.; Bird, D. A.; St-Pierre, B. (2004).** Can Arabidopsis make complex alkaloids. *Trends in plant science*. 9(3).116-220.
- Fang, D. Q and Roose, M. L. (1997).** Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet*. 95: 408-417.

- Federov, A. A. (1969).** (ed.) Chromosome numbers of flowering plants. Komarov Botanical Institute, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad, Russia.
- Ford, Y. Y.; Ratcliffe R. G.; Robins, R. J. (1996).** In Vitro NMR analysis of tropane alkaloid metabolism in transformed root and de-differentiated cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, 43:115-120.
- Frank, P and Rene, A. (2008).** Natural compounds as drugs. Volumel. Birkhauser. Pp:350.
- Fumihiko, S.; Hashimoto, T.; Hachiya, A.; Tamara, K.; Choi, K.; Morishing, T.; Fujimoto, H and Yamada, Y. (2000).** Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Journal of Academy Science*, 3:367-372
- Furuya, T.; Kojima, H.; Syono, K.; Ishi, T.; Uotani, K and. Nishio, M. (1973).** Isolation of saponin and sapogenins from callus tissue of *Panax ginseng*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 21: 98-101.
- Furuya, T.; Ikuta, A.; and Syono, K. (1972).** Alkaloids from callus cultures of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 11: 3041-3044.
- Galapian, F and Majd, A. (2003).** Study on changes in tropane alkaloids production in vegetative, pre-flowering, flowering and fruiting time and effect of microelements and sugar on alkaloid biosynthesis in tissue culture of *hyoscyamus nigra*. *J.Basic SCI*, 50:23-40.
- Gao, S. L.; Zhu, D. N.; Coi, Z. H and Xu. D. R. (1996).** Autotetraploid plant from colchicinetreated bud culture of *Salvia miltiorrhiza*. *Plant cell Tissue culture*, 47: 37 – 77.
- George, E. F.; Hall, M. A and De Klerk, G. J. (2008).** Plant Propagation by Tissue Culture. . The Background, 3rd Ed., Published by Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Ghorbanpour, M.; Hatami, M.; Khavazi, K. (2013).** Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloids production of *Hyoscyamus niger* under water deficit stress. *Turkish Journal of Biology*, 37, 350-360.
- Gibson, J. L.; Nelson, P. V.; Pitchay, D. S.; Whipker, B. E. (2001).** Identifying nutrient deficiencies of Bedding plants. NC. State university floriculture research . *Florex* , 004:1-4.
- Gibson, S. I. (2000).** Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiology* 124:1532–1539.
- Glaus, E. P.; Tyler, V. E and Brady, L. (1974).** *Pharmacognosy*. 6<sup>th</sup> ed. Indian: 234-240.
- Glenn, L. (1989).** Quantitative pharmaceutical chemistry, 6<sup>th</sup> Edition, New York, Toronto, Sydney, London.

- Goldy, R. G and Lyrene. P. M. (1984).** *In vitro* colchicine tretment of 4X bluebessie, *Vaccinium SP.* *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109:336 – 338
- Goleniowski, M and Trippi, V. S. (1999).** Effect of growth medium composition on psilostachyinolides and altamisine production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 56: 215-218
- Gontier, E.; Sangwan, B. S.; Barbotin, J. N. (1994).** Effect of calcium, alginate, and calciumalginate immobilization on growth and tropane alkaloid levels of stable suspension cell line of *Datura innoxia* Mill, *Plant Cell Rep.* 9(13):533-536.
- Grieve, A. (1984).** Modern herbal. Penguin. ISBN0-14-046-440-9.
- Gupta, M.; Chyi, Y. S.; Severson, J. R and Owen, J. L. (1994).** Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theor Appl Genet*, 89:998-1006.
- Gupta, S. (1972).** Tissue culture of *Nigella sativa* L. The behaviour of nucleus. *Experientia*, 28:441-443.
- Haberlandt, G. (1902).** Culturversuehe mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien Math. Naturwiss. 111: 69–92.
- Hank, H.; László, I.; Bálványos, I.; Tóth, E.; Kursinszki, L.; Kovács, G. y.; Szőke, É. (2003).** Effect of Magnesium on the Growth and Alkaloid Production of hairy Root Cultures: *Acta horticulturae*. 597(597): 271-274.
- Hancock, J. F. (1997).** The Colchicine Story. *HortScience*. 32: 1011-1012.
- Hanzel, J. J.; Miller, J. P.; Brinkman, M. A. & Fendos, E. (1985):** Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop. Sci.* 25: 27-31.
- Hara, Y.; Morimoto, T and Fujita, Y. (1987).** Production of shikonin derivatives by cell suspension culture. *Plant Rep.* 6:8-11.
- Hartman, H. T.; Kester, D. E and Davies, F. T. (1990).** Plant Propagation principles and practice .5 th .ed. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Hashimoto, T.; Matsuda, J.; Yamada, Y. (1993).** Two-steps epoxidation of Hyosciamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyosciamine 6B-hydroxylase. *FEBS LETT*, 329: 35-39.
- Hashimoto, T.; Yun, D. J.; Yamada, Y. (1993).** Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. *Phytochemistry*, 32: 713-718.
- Hashimoto, T.; Mitani, A.; Yamada, Y. (1990).** Diamine oxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*: its function in tropane alkaloid biosynthesis. *Plant Physiology* 93:216-221.

- Hashimoto, T.; Yukimune, Y. ; Yamada, Y. (1986).** Tropane alkaloid production in *Hyoscyamus* Root Cultures. *Journal of plant physiology*. 124(1-2):61-75.
- Haque, A. U.; Samad, M. A and Shapla, T. L .(2009).** *In vitro* callus initiation and regeneration of *potato*. *Bangladesh J. Agric. Res.* 34(3):449-456.
- Havlin, J. L.; Tisdale, S. L.; Nelson, W. L.; Beaton, J. D. (2014).** Soil Fertility and Fertilizers 8th Ed. Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River, NJ.
- Havlin, J. L and Halvorson, A. D. (1990).** MEY Wheat Management Conference. Denver, CO. pp. 8295.
- Heywood, V. H. (1976)** Plant taxonomy. 2nd. ed. Edward Arnold. 63 pp
- Hibi, N.; Higashiguchi, S.; Hashimoto, T.; Yamada, Y. (1994).** Gene expression in *tobacco* low-nicotine mutants. *The Plant Cell* .6:723-735.
- Hilton, M. G and Rhodes. M. J. C. (1994).** The effect of varying levels of gamborgs B5 salts and temperature on the accumulation of starch and hyoscyamine in batch culture of transformed roots of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tissue Org. Cult*, 38: 45-51.
- Hopkins, W. G. (1999).** Introduction to Plant Physiology. 2nd ed, John Wiley and Sons. Inc .US:110-118.
- Houben, A.; Banaei, M. A. M.; Klemme, S. (2013).** Biology and evolution of B chromosomes. In: Greilhuber J, Dolezel J, Wendel JF, editors. Plant Genome Diversity. Vienna: Springer:149–165.
- Ibrahim, A. I.; Abd El Kawi, M.; Nower, A. Abdel Motaal, A and Abd El Aal, A. (2009).** Alkaloid Production and Organogenesis from Callus of *Hyoscyamus muticus* L. *In vitro*. *Journal of Applied Sciences Research*, 5(1): 82-92.
- Ikeuchi, M.; Sugimoto, K and Iwase, A. (2013).** Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25: 3159–3173.
- Ikuta, A and Itokawa, H. (1988).** Alkaloids of tissue cultures of *Nandina domestica*. *Phytochemistry*, 27, 7: 2143-2145.
- IPNI: International Plant Nutrition Institute. gnesi(2007).** An introduction to magnesium.
- Iranbakhsh, A. R.; Oshagi, M. A.; Ebadi, M. (2007).** Growth and Production Optimization of Tropane Alkaloids in *Datura stramonium* Cell Suspension Culture. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 1236-1242.
- IUCN: International Union for the Conservation of Nature. (2000).** The 2000 IUCN Red List of Threatened Plants. Gland: Author.
- Iwasa, K. and Takao, N. (1982).** Formation of alkaloids in *Corydalis ophiocarpa* callus cultures. *Phytochemistry*, 21, 3:611-614.
- Iwase. A.; Ikeuchi. M.; Sugimoto, K. (2011).** Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression . *Plant Cell*. 25(9): 3159–3173.

- Jaber-Vazdekis, N.; Gonzales, C.; Ravelo, A.; Zarate, R. (2009).** Cloning, characterization and analysis of expression profiles of a Cdna encoding a hyoscyamine 6B- hydroxylase (H6H) from *Atropa baetica* willk. *Plant Physiol.Biochem*, 47:20-25.
- Jaccard, P. (1908).** Nouvelles recherches sur la distribution Florale. *Bull.Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44:223-270
- Jain, A.; Apparanda, C and Bhalla, P. L. (1999).** Evaluation of genetic diversity and genome fingerprinting of *Pandorea* (Bignoniaceae) by RAPD and inter-SSR PCR. *J Genome*, 4:714-719.
- James, E.; Reynolds, F. (1982). (1989). (1993).** Martindal, The Extra Pharmacopia. Twenty-eighth, edition, London, The Pharmaceutical press: 298-313-419-429-533-537.
- Jorgenson, E. C and Daniels, T. C. (1982).** Physicochemical properties relation to biological action. P. 13. 20. In: R.F. Doerge (ed) Wilson and Gisvold's textbook of organic medical and pharmaceutical chemistry. J.B. Lippincott. Co, U.S.A.
- Jouhikainen, K.; Lindgren, L.; Jokelainen, T.; Hiltunen, R, Teeri, T. H.; Okisman-calentey, K. M. (1999).** Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L hairy root culture by genetic engineering. *J. Planta* 208:545-551.
- Julkunen-Tiito, R. (1996).** Defensive efforts of *Salix myrsinifolia* plantlets in photomixotrophic culture conditions: The effect of sucrose, nitrogen and pH on phytomass and secondary phenolic accumulation. *Ecoscience* 3:297-303.
- Kaepler, S. M.; Kaepler, H. F and Rhee, Y. (2000).** Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*. 43: 179-188.
- Kai, G.; Zhang, A.; Guo, Y.; Li, L.; Cui, L.; Luo, X.; Liu, C and Xiao, J. (2012).** Enhancing the production of tropane alkaloids in transgenic *Anisodus acutangulus* hairy root cultures by over-expressing tropinone reductase I and hyoscyamine-6 $\beta$ -hydroxylase. *journal molecular biosystems*. 8(11):2883-2890.
- Kai, G.; Yang, S.; Luo, X.; Zhou, W.; Fu, X.; Zhang, A.; Zhang, Y and Xiao, J. (2011).** Co-expression of AaPMT and AaTRI effectively enhances the yields of tropane alkaloids in *Anisodus acutangulus* hairy roots. *BMC Biotechnology*. 11:43.
- Kai, G.; Li, L.; Jiang, Y.; Yan, X.; Zhang, Y.; Lu, X.; Liao, P.; Chen, J. (2009).** Molecular cloning and characterization of two tropinone reductases in *Anisodus acutangulus* and enhancement of tropane alkaloid production in AaTRI-transformed hairy roots. *journal of biotechnology and applied biochemistry*. 54(3):177-186

- Kang, Y. M.; Chen, J. Y.; Ouyang, W.; Qiao, J. T and Reyes, V. C. (2004).** Serotonin modulates hypothalamic neuronal activity. *International Journal of Neuroscience*, 114:293–319.
- Karam, N. S.; Jawad, F. M.; Arikat, N. S and Shibli, R. A. (2003).** growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 73: 117-121.
- Kehr, A. E. (1998).** Woody plant polyploidy . *Am. Nurseryman*. 183 (3): 38-47.
- Kennt, A. C. (1979).** Chemical stability of pharmaceuticals, New York. Chichester. Brisbane. Toronto: 186-188.
- Kevers, C.; Filali, M.; Petit-Paly. G.; Hagège, D.; Rideau, M and Gaspar, Th. (1996).** Habituation of Plant Cells Does Not Mean Insensitivity to Plant Growth Regulators. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*.32(3): 204-209.
- Khatun, M. M.; Ali, M. H and Desamero, N. V. (2003).** Effect of genotype and culture media on callus formation and plant regeneration from mature seed scutella culture in rice. *Plant Tiss. Cult.* 13: 99-107.
- Kinsara, A.M and Seif El-Naser, M. M. (1990).** Growth and production of tropane alkaloids by cell suspension cultures of *Hyoscyamus albus* L. *Qatar Univ. Sci. Bull*, 10: 145-53.
- Kitajima, M.; Fischer, U.; Nakamura, M.; Ohsawa, M.; Ueno, M.; Takayama, H.; Unger, M.; Stockigt, J and Aimi, N. (1998).** Anthraquinone from *Ophiorrhiza pumila* tissue and cell cultures. *Phytochemistry*, 48, 1: 107-111.
- Knobloch, K. H.; and Berlin, J. (1987).** Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Z. Naturforsch*, 35(C): 551-556.
- Korbin, M.; Kuras, A and Żurawicz, E. (2002).** Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR. *Cell Mol Biol Lett*: 785-794.
- Kossel, A. (1891).** On the chemical composition of the cell. *Arch Anat Physiol*.;181:181–6.
- Kumar, P. S and Mathur, V. L. (2004).** Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 78: 267-271.
- Kumar, S and Bhushan. S. (1978).** Effect of applying zinc, manganese and boron to the vines of cultivar *Thompson* seedlings on their vigour, yield and nutrient status. *J. of Res. Punjab Agric. Univ.*15(1)43:48
- Kunakh, V. A.; Mel'nyk, V. M.; Drobyk, N. M.; Andreev, I. O.; Spiridonova, K. V.; Twardovska, M. O.; Konvalyuk, I. I and Adonin, V. I. (2015).** Genetic Variation Induced by Tissue and Organ Culture in *Gentiana* Species. In book: *The Gentianaceae - Volume 2: Biotechnology and Applications*, Chapter: 9, Publisher: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Editors: J.J. Rybczyński et al:199-238.

- Kunakh, V. A. (2013).** Evolution of cell populations *in vitro*: peculiarities, driving forces, mechanisms and consequences. *Biopolymers and Cell*. 29(4): 295–310.
- Kunakh, V. A. (2008).** Plant biotechnology for human life improvement // *Biotechnology (Ukr.)*. 1(1): 28–39.
- Kunakh, V. A. (2005<sup>a</sup>).** Twenty five years long stable biosynthesis of ajmaline by related hormone-independed *Rauwolfia serpentine* cell lines // Euromedica-Hannover (16–17 Juni) International Congress and Exhibition: Programm Abstracts.–Hannover : 22.
- Kunakh, V. A. (2005<sup>b</sup>).** Biotechnology of medical plants. Genetic, physiological and biochemical basis.–Kyiv: Logos:730.
- Kunakh, V. A. (2004).** Katsan V. A. Biosynthesis of poppy quinoline alkaloids in nature and *in vitro* culture. 2. (*Papaver bracteatum* Lindl.) // *Ukr. Biokhim. Zh.* 76(5): 29–44.
- Kunakh, V. A. (2003<sup>a</sup>).** Mechanisms and some pegularities to somaclonal variability of the plants // *Bull. of Vavilov Soc. Geneticists and Breeders of Ukr* 1(1):101–106.
- Kunakh V. A., Katsan V. A. (2003<sup>b</sup>).** Biosynthesis of poppy isoquinoline alkaloids in nature and in the *in vitro* culture. 1. Opium poppy (*Papaver somniferum* L.) // *Ukr. Biokhim. Zh.*– 75(5): 41–54.
- Kunakh, V. A. (2001).** Plant genome evolution in cell culture *in vitro*. Peculiarities, reasons, mechanisms and consiquencies // *Genetics and breeding in Ukraine at the turn of millenniums* / Ed. V.V. Morgun.–K.: Logos: 53–67.
- Kunakh, V. A. (1996).** Somaclonal variation in *Rauwolfia* // *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somaclonal variation in crop improvement. II.*–Berlin; Heidelberg; New York: Springer. 36:315–332.
- Kunakh, V. A. (1975).** Cytogenetic studies on cell populations in culture of isolated plant tissues // Ph.D. thesis, 03.00.15 – *Genetics.*–Ê., 1975.–16 p.
- Kursinszki, L.; Hank, H.; László, I and Szóke, E. (2005).** Simultaneous analysis of hyoscyamine, scopolamine, 6 $\beta$ -hydroxyhyoscyamine and apoatropine in Solanaceous hairy roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1091(1-2): 32-39.
- Liang, W. J.; Wang, M. L.; San, X. O. (2008).** Effect of calcium on growth and yield of cucumber in solor-green house. *China vegetables*. 1:18-19.
- Larkin, P. J and Scowcroft, W. R. (1981).** Somaclonal variations a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet*, 60: 197-214.
- Lavania, U. C .; Kushwaha, J. S.; Lavania, S.; and Basu, S. (2010).** Chromosomal localization of rDNA and DAPI bands in solanaceous medicinal plant *Hyoscyamus niger* L. *Journal of Genetics*: 493-497.
- Lavania, U. C. (2005).** Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. *Plant Genet Resour.* 3: 170-177.

- Lawson, L. D.; Wang, Z. J. (2005).** Allicin and allicin-derived garlic compounds increase breath acetone through allyl methyl sulfide: use in measuring allicin bioavailability. *J Agric Food Chem.*;53(6):1974-1983.
- Launert, E. (1981).** Edible and medicinal plants. ISBN 0-600-37216-2.
- Lee, S.; Woffenden, B. J.; Beers, E. P and Roberts, A. W.(2000).** Expansion of cultured *Zinnia* mesophyll cells in response to hormones and light. *Physiol. Plant.* 108: 216-222.
- Lei , Z.; Ruxian, D.; Yourong, C. (2004).** Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root culture plant , *Nati . Acd. Sci.* 10: 786 – 791 .
- Leikin, J. B.; Paloucek, D. F. P.; Pharm, D. (1998).** Poisoning and Toxicology Compendium with Symptoms index. Lexi-Comp.pp: 1042.
- Leete, E. (1990).** Recent Developments in the biosynthesis of the tropane alkaloids . *Planta Medica.* 56:339-352.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25(4):402-8.
- Mäck, G and Schjoerring, J. K. (2002).** Effect of NO<sub>3</sub> supply on the metabolism of potato plants (*Solanum tuberosum* L.) with special focus on the tubers. *Plant, Cell & Environment* 25: 999–1009
- Madlung, A and Comal, L. (2004).** The effect of stress on genome regulation and structure. *Ann Bo.* 94: 481–495.
- Mahler, R. L. (2004).** Nutrient plants require for growth. University of Idaho Agriculture Experiments Station: 1-4.
- Maidanyuk, D. M.; Andreev, I. O.; Spiridonova, K. V.; Kunakh V. A. (2007).** Genetic poly morphism of maize somaclonal lines de rived from P346 line. *Biopolymers and cell.* 23(4): 324-331. Translated from Ukrainian.
- Malpathak, N. P and David, S. B. (1986).** Flavor formation in tissue cultures of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*, 5: 446-447.
- Maldonado, M. I. E and Loyola, V. V. M. (1995).** Establishment and characterization of photosynthetic of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 40: 197-208.
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F and Sambrook, J. (1982).** Molecular cloning: Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor/ NY.
- Mantell, S. H and H. Smith. (1984).** Cultural factors that influence secondary metabolite accumulation in plant cell and tissue cultures. In: *Plant*

- Biotechnology*. (Eds.): S.H. Mantell and H. Smith. Cambridge Uni. Press, Cambridge. pp. 75-108.
- Marschner, H. (1995)**. Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. San Diego: Academic Press.
- Mary, A. L. (2005)**. Valuable secondary products from *in vitro* culture 24 ed. CRC press. 285.
- Matsuda, J.; Okabe, S.; Hashimoto, T.; Yamada, Y. (1991)**. Molecular cloning of hyoscyamine 6b-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *Journal of Biological Chemistry*. 266:9460–9464.
- Merk, I and CO, N. C. (1976)**. The Merck Index, Ninth Edition, Rahway, N. J.; USA: 117-647-897-1088-1254-1255.
- Micheal, H.; Joanne, B.; Simon, G.; Elizabeth, M. W. (2004)**. Fundamentals of pharmacognosy and phytherapy. Chuchill Livingstone. Pp:309.
- Milcent, R. (2003)**. *Chimie organique Heterocyclique*. ISBN:2-86883-583-X.
- Miller, A. G and Morris, M. (1988)**. Plants of Dhofar. The office of the Adviser for Conservation of the Environment, Diwan of Royal Court. Sultanate of Oman.
- Mirzaee, H.; Sharafi, A.; Hashemi, S. H. (2016)**. *In vitro* regeneration and transient expression of sesquiterpene cyclase (SQC) in *Artemisia annua* L. *S Afr J Bot.*;104:225–231.
- Mithofer, A.; Schulze, B.; Boland, W. (2004)**. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *Febs Lett* 566: 1–5.
- Montrichard, F.; Renard, M. ; Alkhalfioui, F.; Duval, F. D.; Macherel, D.; (2003)**. Identification and differential expression of two thioredoxin h isoforms in germinating seeds from pea. *Plant physiology* 132, 1707-1715.
- Morimoto, S., Goto, Y and Shoyama, Y. (1994)**. Production of lithospermic acid B and rosmarinic acid in callus tissue and regenerated plantlets of *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Natural Products*, 57, 6: 817-823.
- Morimoto, H and Murai, F. (1989)**. The effect of gelling agents on plantlet accumulation in callus cultures of *Croton sublyratus* Kurz. *Plant Cell Reports*, 8:210-213.
- Mouterde, p. (1983)**. Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie. Tomes 3, pp: 578. Text and Atlas. Dar El Mashreq, Beyrouth, Liban.
- Moyano, E.; Ouhikainen, K.; Tammela, p.; Palazon, J.; Cusido, R. M.; Pinol, M. T.; Teeri, H. T.; Oksman, K. M. (2003)**. Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metels* and *Hyoscyamus muticus*. *Journal of Experimental Botany*, vol 54, 203-211.

- Moyano, E.; Fornale, S.; Palazon, J.; Cusido, R. M.; Bagni, N.; Pinol, M. T. (2002).** Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy root cultures overexpressing the pmt gene. *Phytochemistry* 59: 697-702.
- Mulabagal, V and Tsay, H. (2004).** Plant Cell Culture an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Internat. J. Appl. Sci. Eng.* 2:29–48.
- Mullis, K. B. (1990).** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262: 56-65.
- Murashige, T and Skoog, F. (1962).** Arevised Medium for Rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue culture. *Plant physic.*, 15(1):473-479.
- Murshed, R.; Lacroix, F.; Lauri, F and Sallanon, H. (2011).** Effect of Water Deficit and Salt Stress on Oxidative Parameters and Antioxidant Systems in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Fruits. *Plant Stress* 1: 98-106.
- Nagaraju, J.; Kathirvel, M.; Ramesh, R.; Kumar, E.; Siddiq, A and Hasnain, S. E. (2002).** Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:5836-5841.
- Nagella, P.; Murthy, H. N. (2010) .** Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide A. *Bioresour. Technol.* 101: 6735–6739.
- Nakazawa, Y and Toda, M. (1995).** *Eucommia ulmoides* oliv. (Eucommiaceae): *In vitro* culture and the production of iridoids, lignans, and other secondary Metabolites. in *Medicinal and Aromatic plants VIII*. Edited by Bajaj, A. P. S. Springer Verlag, Berlin. Pp:215–331.
- Napaporn, S. L.; Kerdchoechuen, O.; Laohakunjit, N. (2014).** Enhancement of Phenolics, Resveratrol and Antioxidant Activity by Nitrogen Enrichment in Cell Suspension Culture of *Vitis vinifera*. *Molecules*, 19: 7901-7912.
- Narula, A.; Kumar, S.; Bansal, K. C and Srivastava, P. S. (2004).** Biotechnological approaches towards improvement of medicinal plants. In: *Srivastava, P. S., Narula, A. and Srivastava, S. (eds.). Plant Biotechnology and Molecular Markers.* pp:78-116. Anamaya Publishers. New Delhi.
- Narayan, M. S and Venkataraman, L. V . (2002).** Effect of Sugar and Nitrogen on the Production of Anthocyanin in Cultured Carrot (*Daucus carota*) cells. *Journal of Food Science* 67(1):84 - 86 .
- Natasha, M.; Gizella, P.; Eva, S. (1993).** Some morphological and biochemical Peculiarities of *Datura Innoxia* callus and regeneration culture plant cell , *Tissue and organ culture* , 35 : 87 – 92.
- Neera, S and Ishimaru, K. (1992).** Tannin production in cell cultures of *Sapium sebiferum*. *Phytochemistry*, 31, 3: 833-836

- Neill S.; Desikan R.; Hancock J. (2002).** Hydrogen peroxide signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5(10): 388–395..
- Nejadhabibvash, F.; Rahmani, f.; Heidari, R.; Jami, R. (2012).** Assessment of genetic diversity among *Hyoscyamus* genotypes based on ISSR markers. *International Journal of Agriculture and crop sciences.* 4-17. 1300-1306.
- Newton, C. R and Graham, A. (1994).** PCR edition, Bois Scientific Publisher Ltd, UK.
- Nistor, A.; Gh, C.; Nicoleta, C and Diana, K. (2009).** Effect of auxine and cytokinin on callus induction in potato (*Solanum tuberosum* l.) explants. *Agricultura -Știință și practică.* 1(2): 69-7.
- Nowak, B.; Miczyński, K.; Hudy, L. (2004).** Sugar uptake and utilisation during adventitious buds differentiation on *in vitro* leaf explants of ‘Wegirka Zwykła’ plum (*Prunus domestica*) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 76: 255–260.
- Ohtani M and Sugiyama. M. (2005).** Involvement of SRD2-mediated activation of snRNA transcription in the control of cell proliferation competence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 43: 479–490.
- Oksman-Caldentey, K. M. (2007).** Tropane and nicotine alkaloid biosynthesis-novel approaches towards biotechnological production of plant-derived. Pharmaceuticals. *Curr Pharm.Biotechnol.* 8:203-210.
- Oksman–Caldentey, K.M.; Arroo, R. (2000).** Regulation of tropane Alkaloid Metabolism in plant and plant cell cultures. In : Verpoorte R, Alferman A.W, eds. *Metabolic Engineering of plant secondary Metabolism. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers*, 253 – 281.
- Ophilic, O.; Mesanard, F.; Raynaud, S.; Baltora, S.; Robins, R.J and Fliniaux, M. A. (2004).** Altered nitrogen metabolism associated with de-differentiated suspension cultures derived from root culture of *Datura stramonium* studied by heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) NMR spectroscopy. *Journal of Botany*, 55:1052-1060.
- Ortuno, A.; Oncina, R.; Botia, J. M. and Del Rio, J. A. (1999).** Regulation of the diosgenin expression in *Trigonella foenum-graecum* plants by different plant growth regulators. *Food Chem.* 65: 227-232.
- Ovečka, M.; Takač, T. (2014).** Managing heavy metal toxicity stress in plants: biological and biotechnological tools. *Biotechnol Adv* 32: 73–86.
- Palazón, J.; Navarro-Ocaña, A.; Hernandez-Vazquez, L and Mirjalili, M. H. (2008).** Application of Metabolic Engineering to the Production of Scopolamine. *Molecules*, 13, 1722-1742.
- Palazón, J.; Moyano, E.; Cusido, R. M.; Bonfill, M.; Oksman-Caldentey, K. M.; Piñol, M. T. (2003).** Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy roots and plants overexpressing the *h6h* gene. *Plant Sci.*, 165, 1289-1295.

- Pand, D and sirvastava, P. (1998).** In plant tissue culture and moleceuler biology. Application and prospects CPS srivastava Editor, Narosa publishing House . New Delhi , p.254.
- Patrick, H. B and Hening, H. (1998).** Boron mobility and consequent management in different Crops. *Better Crops* 82(2):28-31.
- Pavlov, A.; Berkov, S.; Weber, J.; Bley, T. H. (2009).** Hyoscyamine biosynthesis in *Datura stramonium* hairy root in vitro systems with different ploidy levels. *Appl Biochem Biotechnol* .157(2): 210–225
- Petersen, K. K.; Hagberg, P and Kristiansen, K. (2002).** *In vitro* chromosome doubling of *Misconthus sinensis*. *Plant Breeding* 121, 445-450.
- Philippe, CH.; Aoki, T and Shimomura, K. (1992).** Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyoscyamus albus* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4 *Plant Cell Reports* .11:597-600
- Pinol, M. T.; Palazon, J.; Cusido, R. M.; Ribo, M. (1999).** Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots, *Plant Sci.* 141, 41–49.
- Pitta-Alvarez, S. I.; Spollansky, T. C.; Giulietti, A. M. (2000).** The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microb Tech* 26: 252–258.
- Povh, J. A and Ono, E. O. (2006).** Rendimento de óleo essencial de *Salvia officinalis* L. sob ação de reguladores vegetais. *Acta Scientiarum: Biological Sciences* 1, 189–193.
- Pramod, K. K.; Satpal singh.; Jayabaskaran, C. (2010).** Expression pf hyoscyamine 6B hydroxylase in the root pericycle cells and accumulation of its product scopolamine in leaf and stem tissues of *Datura metel* L. *journal of plant science*,178: 202- 206.
- Pudersell, K.; Vardja, T.; Vardja, R.; Matto, V.; Arak, E.; Raal s. A. (2012).** Inorganic ions in the medium modify tropane alkaloids and riboflavin output in *Hyoscyamus niger* root cultures. *Pharmacogn Mag.* 8(29): 73–77.
- Pudersell, K. (2006).** Tropane alkaloid production and riboflavin excretion in the field and tissue cultures/press of henbane (*Hyoscyamus albus* L). a book of Current Developments in Biotechnology and Bioengineering PP:15-16.
- Purohit, S. S. (1999).** “Agricultural Biotechnology”. AgroBotanica, J.N. Vyas Naggr, Bikaner, India.
- Raina, S. N.; Rani, V.; Kojima, T.; Ogihara, Y.; Singh, K. P and Devarumath, R. M. (2001).** RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification and

- phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome*, 44:763-772.
- Rainham, D. (2001).** Post harvest nutrition for pome fruit Horticultural . News letter G.P.Dall Horticultural Consultant. vol. 7(4).
- Rajasekaran, T.; Rajendran, L.; Ravishankar, G. A and Venkataraman, L. V. (1991).** Influence of nutrient stress on pyrethrin production by cultured cells of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *Current Science*, 60, 12: 705-707.
- Ramawat, K. G. (2004).** Plant Biotechnology, S. Chand and Company LTD, Ram Nagar, New Delhi. India. Pp:58-69.
- Ramirez, M.; Alpizar, L.; Quiroz, J and Oropeza, C. (1992).** Formation of L-canavanine in *in vitro* cultures of *Canavalia ensiformis* (L) DC. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 30: 231-235.
- Redha, A.; Attia, T.; Buter, B.; Saisingtong, S.; Stamp, P and Schmid J. E. (1998).** Improved Production of doubled haploid by colchicine application to wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant cell reports* 17 (12), 974-979.
- Rensheng, X. U.; Yang, Y. E.; zhao, W. (2010).** Introduction To The Natural product chemistry, shanghai institute of material medica, chinese academy of sciences.
- Piatti, T.; Boller, T.; Brodelius, P. E. (1991).** Induction of ethylene biosynthesis is correlated with but not required for induction of alkaloid accumulation in elicitor-treated *Eschscholtzia* cells. *Phytochem*.30: 2151-2154.
- Richter, U. L; Rothe, G.; Fabian, A. K.; Rahfeld, B.; Dräger, B. (2005).** Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures. *J. Exp. Bot.* 56 645–652
- Richter, G. (1993).** Metabolisme de vegetaux. Physiologie et biochimie. Lausanne, presses Polytechniques et universitaires Romandes. pp: 431-454.
- Robbers, J. A.; Speedie M. K.; Tyler, V. A. (1996).** Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology:152. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Robins, R. J.; Bent, F. G.; Rhodes, M. J. C. (1991).** Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids by *Datura stramonium* L. transformed root cultures. 3. The relationship between morphological integrity and alkaloid biosynthesis. *Planta* 185, 390-395.
- Roddick, J. G. (1991).** The importance of the Solanaceae in medicine and drug therapy, In "Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution". Hawkes, J.; Lester, R.; Nee, M and ESTRADA, n.; eds. Royal Botanic Gardens Kew and Linnean Society of London. London. Pp:7-23.
- Rocha, P.; Stenzel, O.; Parr, A.; Walton, N.; Christou, P.; Dra'ger, B and Leech, M. J. (2002).** Functional expression of Tropinone Reductase I (TRI)

and Hyoscyamine-6B-Hydroxylase (H6H) from *Hyoscyamus niger* in *Nicotiana tabacum*. *Plant Science*. 162:905-913 .

**Rossignol, M.; Santoni, V.; Francois, J. M and Vanuyt, G. (1991).** Changing membrane sensitivity to auxin during development. In progress in plant growth regulation. C.M Karssen, L. C van Loon, D Vreugdenhil, eds. 207-213. Kluwer Academic. Dordrecht.

**Rothe, G.; Hachiya, A.; Yamada, Y.; Hashimoto, T.; Dräger, B. (2003).** Alkaloids in plants and root culture of *Atropa belladonna* overexpression putrescine N-methyltransferase. *Journal of Experimental Botany*, 54(390): 2065-2070.

**Rothe, G and Draeger, B. (2002).** Tropane alkaloids: metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of *Atropa belladonna*. *Plant. Science* 163, 979–985.

**Sachan, N. (2004).** Identification Of Signaling factors Involved In The regulation Of Alkaloid Metabolism in *N. Tabacum*. University of Kentucky Doctoral Dissertations.

**Saidon, N. A. (2008).** The establishment of embryogenic callus culture of *Hyoscyamus niger* and the detection of hyoscyamine in the culture.

**Saker, M. et al. (1997).** Fitoterapic LXVIII (V) 339.

**Sambrook, J.; Fritsh, E and Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

**Sasson, A. (1991).** Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: Biotechnological and economic aspects. *CIHEAM-Options Mediterraneennes (UNESCO)* .p:59-74.

**Sato, F.; Hashimoto, T.; Hachiya, A.; Tamura, K.; Choi, K. B.; Morishige, T.; Fujimoto, H.; Yamada, Y. (2001).** Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98:367-372.

**Sauerwein, M and Shimomura, K. (1991).** Alkaloid production in hairy roots of *Hyoscyamus albus* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Phytochemistry*. 30(10):3277-3280.

**Scalla, R. (1991).** Les herbicides, Mode d'action et principes d'utilisation. INRA. Paris, pp 450.

**Scandalios, J. (Ed) (1997).** Catalases in plant gene structure, properties, regulation and expression. In: *Oxidative Stress and Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp x-y

- Schmauder, H. P and Doebel, P. (1991).** *Nigella* spp.: in vitro culture, regeneration and the formation of secondary metabolites. *Biotech. Agricul. Forest.* 15: 311-338.
- Schroder, W and Bohm, H. (1984).** Betacyanin concentrations in young cell cultures from *Portulaca grandiflora* an analysis of variation. *Plant Cell Reports*, 3: 14-17.
- Shafik, I. A. (1981).** Medicinal plant constituents, Third Edition, General Organization for University and School Books. pp:372-437.
- Sharafi, A.; Hashemi, S. H.; Mousavi, A.; Azadi, P.; Dehsara, B.; Khalifani, B. H. (2013<sup>a</sup>).** Enhanced morphinan alkaloid production in hairy root cultures of *Papaver bracteatum* by over-expression of salutaridinol 7-o-acetyltransferase gene via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *World J Microbiol Biotechnol.* 29:2125–2131.
- Sharafi, E.; Khayam, N.; Fotokian, S. M.; Davoodi, M. H.; Hadav, D and Mirzaei, H.; Hasanloo T. (2013<sup>b</sup>).** Improvement of hypericin and hyperforin production using zinc and iron nano-oxides as elicitors in cell suspension culture of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) JMPB.;2:177–184.
- Sharma, A. K. (1993).** Plant taxonomy. Tata McGraw-Hill Co. Ltd, New Delhi, pp 482.
- Sharma, A. K. & Sharma, A. (1972).** Chromosomal techniques Theory and practice @nd. Ed. Butter worths.London, pp 575.
- Shilpa, K.; Varun, K and Lakshmi, B. S. (2010).** An Alternate Method of Natural Drug Production: Elciting Secondary Metabolite Production Using Plant Cell Culture. *Journal of plant sience*, 5(3):222-247.
- Shimada, Y.; Goda, H.; Nakamura, A.; Takatsuto, S.; Fujioka, S.; Yoshida, S. (2003).** Organ-specific expression of brassinosteroid-biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Plant physiology.* 131: 287-297.
- Short, K. C and Warburton, J. (1987).** *In vitro* hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. *Acta Horti.* 212:329–334.
- Sidorenko, P. G and Kunakh, V. A. (1972).** Production of culture of isolated tissues of *Haplopappus gracilis* and *Crepis capillaris* and their cytogenetic characteristic // *Tsitol. Genet.* 6, N 6.– P. 483–486.
- Simola, L. K. (1974).** Development of chloroplast in intact *Atropa belladonna* and in stem callus culture During Greeing and leaf Differentiaion. A nnales Academiae scintiarum Fennciae ,A(IV) 1973. No.196, 10.cited from Alkalidi. 2004.

- Skirvin, R. M and Janick. J. (1976).** Tissue culture- induced variation in scented *Pelargonium* spp. *J Am Soc Hort Sci.* 101: 281-290.
- Skrzypczak, L.; Wesolowska, M and Skrzypczak, E. (1993).** Gentiana species XII: In vitro culture, regeneration, and production of secoirridoid glucosides. In: Bajaj, Y.P.S, editor. *“Biotechnology in Agriculture and Forestry”*. 21, *Medicinal and aromatic plants IV*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag: 172-186.
- Smith, R. H. (2000).** Plant Tissue Culture Techniques and Experiments .2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. San Diego, New York.
- Smith, F. D. M; May, R. M.; Pellew, R.; Johnson, T. H and Walter, K.S. (1993).** Estimating extinction rates. *Nature* 364:494–496.
- Solov’yan, V. T.; Spiridonova K. V.; Kunakh V. A. (1994).** Genome rearrangements in cell culture of *Rauwolfia serpentina*. Diverse pattern of genome variations // *Tsitologiya*. 30(2).– P. 250–254.
- Song, X. S.; Hu, W. H.; Mao, W. H.; Ogwen, J. O.; Zhou, Y. H.; Yu, J. Q. (2005).** Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 1082-1088.
- Spiridonova, K. V.; Adnof, D. M.; Andreev, I. O.; Kunakh V. A. (2007).** Stability of the genome of highly productive *Rauwolfia serpentina* Benth K-27 cell line at changing maintenance conditions. *Biopolymers and cell*. 2007. Vol. 23(2): 86-92. Translated from Ukrainia
- Srivastava, S.; Srivastava, A. K. (2007).** Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit Rev Biotechnol.* 27:29–43.
- Stockigt, J ; Obitz, P ; Falkenhagen, H ; Lutterbach, R, and Endress, S, (1995 ).** Plant cell tissue culture and organ culture *Plant Physiol.* 6 : pp: 43 : 97.
- Stojakowska, A and Kisiel, W. (1999).** Secondary metabolites from a callus culture of *Scutellaria columnae*. *Fitoterapia*, 70: 324-325.
- Sundara, A and Raghavan, R. (1957).** Chromosome numbers in Indian medicinal plants. *Proceedings: Plant Sciences.* 45(6): 294-298.
- Syono, K and Furuya, T. (1974).** Induction of auxin non requiring tobacco callus and its reversal by treatment with auxins. *Plant Cell Physiol.* 15:7-17.
- Tabata, M and Hiraoka, N. (1976).** Variation of alkaloid production in *Nicotiana rustica* callus cultures. *Physiology Plantarum* 38: 19-23.
- Tabata, M.; Yamamoto, H.; Hiraoka, N and Konoshima, M. (1972).** Organization and alkaloid production in tissue cultures of *Scopolia parviflora*. *Phytochemistry.* 11: 949-955.

- Tabor, C. W and Tabor, H. (1984).** Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 749-90.
- Taniguchi, S.; Imayoshi, Y.; Kobayashi, E.; Takamatsu, Y.; Ito, H.; Hatano, T.; Sakagami, H.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Sugita, D.; Shimura, S and Yoshida, T. (2002).** Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry*, 59: 315-323.
- Taiz, A and Zeiger, E. (2002).** *Planta physiology*. Sinaure Associates, Inc. pp.283 – 308
- Taji, T.; Seki, M.; Satou, M.; Sakural, T.; Kobayashi, M.; Ishiyama, K.; Narusaka, Y.; Narusaka, M.; Zhu, J. K and Shinozaki, K. (2004).** Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis-related* halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiol* 135:1697-1709.
- Tang, J.; Zhang, L and He, M. (1997).** studies on the callus indudtion, tissue culture and regulation of secondary metabolism of *Eucmmia ulmoides* In proceeding of first international symposium on *Eucmmia ulmoides* XI an china August, pp:23-26.
- Thengane, S. R.; Kulkarni, D. K.; Shrikhande, V. A.; Joshi, S. P.; Sonawane, K. B and Krishnamurthy, K. V. (2003).** Influence of medium composition on callus induction and camptothecin(s) accumulation in *Nothapodytes foetida*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 72: 247-251.
- Tolonen, A. (2003).** Analysis of secondary metabolites in plant and cell culture tissue of *Hypericum perforatum* L and *Rhodiiola rosea* L. PP:15-17.
- Tolonen, A.; Anja, H and Jorma, J. (2003).** Fast HPLC/ PDA analysis of naphthodianthrone and phloroglucinols from *Hypericum perforatum* extract, *Journal of phytochemical analysis*, 14:306– 309.
- Torres, K. C. (1989).** Tissue culture media composition and preparation . In tissue culture techniques for Horticultural crops . (K.C. Torres, ed ):26-51. An Avi Book , New York.
- Trease, G. T and Evans, W. C. (1996).** *Trease and Evans pharmacognosy*. 14<sup>th</sup> Edition. WB Saunders Company Ltd. London, Philadelphia. Toronto, Sydney. Tokyo.
- Trejo T. G.; Jimenez A. A.; Rodriguez M. M.; De Jesus S. A.; Gutierrez L. G.; (2001).** Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. *Plant Cell Tiss.Org* 67: 19–23.
- Turhan, H. (2004).** Callus induction and growth in transgenic potato Genotypes. *African Journal of Biotechnology*. 3(8), pp. 375-378.

- Twardovska, M. O.; Strashniuk, N. M.; Mel'nyk, V. M.; Adonin, V. I.; Kunakh, V. A. (2008).** Chromosomal variability in a tissue culture of rare species of the genus *Gentiana* L. *Cytol Genet* 42:224–228.
- Tyagi, B. R and Dubey, R. (1989).** Karyotype Analysis of Egyptian Henbane, *Hyoscyamus muticus* L. *Cytologia* 54: 313-317, 1989
- Tytga, A and Guido, N. (2007).** Hyoscinebutylbromide: A review of its use in the treatment of abdominal cramping and pain. *Drugs* 67(9):1343–1357 .
- Vakili, B.; Karimi, F.; Sharifi, M.; Behmanesh, M. (2011).** Chromium-induced tropane alkaloid production and H6Hgene expression in *Atropa belladonna* L (Solanaceae) in vitro- propagated plantlets. *Journal of Plant physiology biochemistry*. 52:98-103.
- Venkateswara, R.; Rao, S and Vaidyanathan, C. S. (1986).** Phytochemical constituents of cultured cells of *Eucalyptus tereticornis* SM. *Plant Cell Reports*, 3: 231-233.
- Verpoorte, R.; Vander, R.; Gulik, V. W and Hoopen, T. H. (1991).** In Alkaloids, ed. Brossi, A . Academic, New York), volume40, pp:2–187.
- Viehweger K., (2014).** How plants cope with heavy metals. *Bot Stud* 55: 1–12.
- Vollosovich, A. G.; Martinova, T. U.; Polechk, C. (1985).** nutrient medium FOR *Rawollfia serpentina* tissue culture. (A.C. CCCP No 1167895).
- Voloudakis, A. E.; Kosmas, S. A.; Tsakas, S.; Eliopoulos, E.; Loukas, M.; Kosmidou, K. (2002).** Expression of selected drought-related genes and physiological response of Greek cotton varieties. *Funct Plant Biol* 29:1237–1245.
- Walker, G. M. (1994).** The roles of Magnesium in Biotechnology. *Crit. Rev. biotechnol.* 14:311-354.
- Waller, G. R.; MacVean, C. D and Suzuki, T. (1983).** High production of caffeine and related enzyme activities in callus cultures of *Coffea arabica* L. *Plant Cell Reports*, 2: 109-112
- Waller, G. R and Nowaahi, E. K. (1978).** A book of Alkaloid Biology and Metabolism in plant .New York plenum press
- Wang, T. Pei.; Bergamaschi, A.; Young, H. K.; Therese, S .;Hernandez - Boussard, T.; Lonning, P. E.; Tibshirani, R.; Lise Børresen-Dale, A.; Pollack, J. R. (2006).** Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Journal of Gene, Chromosome & cancer.*. 45(11):1033-1040.
- Wang, P. J and Huang, C. I. (1982).** Production of saikosaponins by callus and redifferentiated organs of *Bupleurum falatum* L. In: Fujiwara A. (ed.) *Plant Tissue Culture*. Maruzen, Tokyo: 71-72.
- Watson, J and Cric, K. (1953).** The Discovery of the Double Helix.

- Wernicke, W.; Lors, H.; Thomas, E. (1979).** Plant regeneration from leaf protoplasts of haploid *Hyoscyamus muticus* L. produced via anther culture. *Journal of plant science letters*. 15(3): 239-249.
- Wei, Y.; Zhang, C. P.; Guo, S.; Lu, K. H.; Liu, X.; Yang, Y.; Liao, Z. H and Wu, N. B. (2018).** Effects of nitrogen form on accumulation of alkaloids and expression of relative genes in *Atropa belladonna*. *China Journal of Chinese Materia Medic*. 43(1):72-78.
- William, L. P. (2005).** Drip irrigation can effectively apply Boron to san Joaquin valley vineyards. *California Agriculture* , 59(3):188-191.
- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A and Tingey, S. V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary [primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22):6531-6535.
- Wolfe, A. D.; Xiang, Q. Y and Kephart, S. R. (1998).** Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Mol Ecol*, Volume 71 pp:1107-1125.
- Wojcik, P.; Wojcik, M. (2006).** Effect of Boron fertilization on Sweet Cherry tree yield and fruit quality. *Journal of plant nutrient* 29(10): 13-20.
- Wurmbach, E.; Yuen, T.; Sealfon, S. C. (2003).** Focused microarray analysis. *Methods* 31. Pp: 306-316.
- Yamada, Y and Endo, T. (1984).** Tropane alkaloids in cultured cells of *Duboisia leichhardtii*. *Plant Cell Reports*, 3:186-188.
- Yamada, Y and Hashimoto, T. (1982).** Production of tropane alkaloids in cultured cells of *Hyoscyamus niger*. *Plant Cell Reports*, 1: 101-103.
- Yang. C.; Chen. M.; Zeng. L.; Zhang. L.; Liu, X.; Lan. X. (2011<sup>a</sup>).** Improvement of tropane alkaloids production in hairy root cultures of *Atropa belladonna* by overexpressing *pmt* and *h6h* genes. *Plant Omics Journal*. 4(1):29-33.
- Yang. X.; Ye, C.; Chen. Z. M.; Tschaplinski, T. J.; Wullschleger, S. D.; Yin, W.; Xia, X.; Tuskan, G, A. (2011<sup>b</sup>).** Genomic aspects of research involving polyploidy plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104:387-397.
- Yahia, A.; Kevers, C.; Gaspers, C.; Chénieux, J. C.; Rideau, M.; Crèche, J. (1998).** Cytokinins and ethylene stimulate indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *catharanthus roseus* by two distinct mechanisms. *Plant Science*.133: 9-15.
- Yetisir, H. and Sari, N. (2003).** Anew method for haploid muskmelon (*Cucumis melo* L.) dihaploidization. *Scientia Horticulturae* 98: 277 – 283.
- Yildiz, M.; Onde, S .; One. M. (2007).** Sucrose effects on phenolic concentration from Sugar beet leaf and petiole explants. *Journal of Sugar Beet Research*. 4(1&2):1-15.

- Youssef, A. A.; Rady, M. R and Chanem, S. A. (1998).** Growth and some primary products in callus cultures of *Nigella sativa* as influenced by various cultural conditions and salt stress. *Fitoterapia*, *LXIX*: 329-336.
- Yun, D. J.; Hashimoto, T.; Yamada, Y. (1992).** Metabolic engineering of medicinal plants: Transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *89*, 11799-11803.
- Zamani, G.; Kovacs, E.; Gouli-Vavdinoudi, D.; Roupakias, G and Barnabas, B. (2000).** Regeneration of fertile doubled haploid plants from colchicine-supplemented media in wheat anther culture. *Plant Breeding*, *119*: 461-465.
- Zarate, R.; Jaber-Vazdekis, N.; Medina, B.; Ravelo, A. G. (2006).** Tailoring tropane alkaloid accumulation in transgenic hairy roots of *Atropa baetica* by over-expressing the gene encoding hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase. *Biotechnol. Lett.*, *28*, 1271-1277.
- Zayed, R.; Winkb, M and El-Shamy, H. (2006).** *In vitro* organogenesis and alkaloid accumulation in *Datura innoxia*. *Z. Naturforsch*, Volume 61c, pp:560-564.
- Zenk M. H.; El-Shagi, H.; Arens, H.; Stockigt, J.; Well, E. W and Deus. B. (1977).** Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and ajmalicine in cell suspension culture of *Catharanthus Roseus* . New York, pp:27-43.
- Zenk M. H., El-Shagi H., And Schulte U., 1975.** Anthraquinone Production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta.Med*, Suppl: 79-101.
- Ziekiewicz, E.; Rafalski, A and labuda, A. (1994).** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, *20*:176-183.
- Zhang, L.; Yang, B.; Lu, B.; Kai, G.; Wang, Z.; Xia, Y.; Ding, R.; Zhang, H.; Sun, X.; Chen, W.; Tang, K. (2007).** Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures over-expressing putrescine N-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. *Planta*, *225*, 887-896.
- Zhang, L.; Kai, G. Y.; Lu, B. B.; Zhang, H. M.; Tang, K. X.; Jiang, J. H.; Chen, W. S. (2005).** Metabolic engineering of tropane alkaloid biosynthesis in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*. *47*: 136-143.
- Zhang, L.; Ding, R.; Chai, Y.; Bonfill, M.; Moyano, E.; Oksman-Caldentey, K. M.; Xu, T.; Pi, Y.; Wang, Z.; Zhang, H.; Kai, G.; Liao, Z.; Sun, X.; Tang, K. (2004).** Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *101*:6786-6791.
- Zhao, K.; Zeng, J.; Zhao, T.; Zhang, H.; Qiu, F.; Yang, C.; Zeng, L.; Liu, X.; Chen, M.; Lan, X and Liao, Z. (2017).** Enhancing Tropane Alkaloid Production Based on the Functional Identification of Tropine-Forming

- Reductase in *Scopolia lurida*, a Tibetan Medicinal Plant. *Journal of Frontiers in Plant Science*, 8:1-11.
- Zhao, J.; Davis, L. C.; Verpoorte, R. (2005).** Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* .23: 283–333.
- Zolala, J.; Farsi1, M.; Gordan, H. R and Mahmoodnia, M. (2007).** Producing a High Scopolamine Hairy Root Clone in *Hyoscyamus muticus* through Transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Agric. Sci. Technol*, 9:327-339.
- Zouine, J.; El-Hadrami, I. (2004).** Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera* L.: Effect of exogenous supply of sucrose on proteins, sugar, phenolics and peroxidases activities during the embryogenic cell suspension culture . *J. Biotechnology* .3(2):114-118.

#### المراجع الروسية:

- Бутенко, Р. Г. (1964).** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука,. 272 с.
- Кунах В. А. (2005).** Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ, “Логос”730 с.
- Гуляев, Г. В. Гужов Ю. Л. (1987).** Селекция и семеноводство полевых культур. М. Агропромиздат.
- Майо О. (1984).** Теоретические оснвы селекции растений. М. Колос.
- Мамаева, С. Е. (1988).** Хромосомный анализ культивируемых клеток. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука,. С. 78 98.
- Шевелкха, В. С. (1998).** Сельскохозяйственная биотехнология. М. Высшая школа.
- Щербаков, В. К. (1982).** Мутации в эволюции и селекции растений. М . Колос.

## Abstract

This research carried out in National Commission for biotechnology's laboratories during 2015-2016, in order to determine the response of Golden henbane's callus (*H. aureus*), and to study its growth dynamics in growth regulators -free media based on the fresh weight of biomass as an indicator of the callus growth strength, in addition to estimate somaclonal variation among callus cultures which may occurred due to difference in medium components compared with mother (Donor) plant, by application inter simple sequence repeats (ISSR) technique using 25 primers, in order to determine the effect of the nutritive medium components, and the change of gene expression both of PMT (EC 2.1.1.53) N- Putrescine Methyl Transferase, H6H (EC 1.14.11.11) Hyoscyamin 6 $\beta$  Hydroxylase, TRI (EC 1.1.1.206) Tropinon reductase I, TRII (EC 1.1.1.236) Tropinon reductase II in the alkaloids synthesis pathway on the alkaloids concentration in the Cellular Lines of *H. aureus*, by estimating the mRNA transcriptional levels of these genes using real-time PCR technique. In addition to counting of chromosome number in the callus cultures during different stages of growth.

The results of morphological study showed that the growth curve of callus cells in all tested media followed the sigmoid trend, where growth speed of cells reached the highest division rate at the exponential phase (day 15 to 35) with superiority of the control medium 5C<sub>01</sub> in biomass weight. The success of callus formation and strength of its growth could be explained by the high content of nutrients and high concentrations of sucrose (50, 60, 100 g .L<sup>-1</sup>), respectively in these media (5C, 6C, 10C), in addition to the occurrence of The Hormone Habituation Phenomenon as a result continuous callus growth in a medium supplemented with growth regulators, where the callus cells can grow in growth regulators-free medium.

The chemical results showed that the superiority of the control 5C<sub>01</sub> significantly in alkaloid content compared with 5C, 6C and 10C cellular lines. Whereas highest concentration of alkaloids was at the end of exponential phase (30 days) (0.49%), (0.36%), (0.29%) and (0.21%) for hyoscyamine in 5C<sub>01</sub>, 5C, 6C and 10C lines, respectively, while the

concentration of scopolamine was very low due to the fact that *Hyoscyamus* is one of the plant species which are poor in scopolamine content. Also 5C and 6C lines surpassed significantly on 10C line in the alkaloids content in the exponential phase and Stationary phase.

The results of molecular study showed that effectiveness of all used primers in giving polymorphism among studied cellular lines. Cluster analysis showed that separation the mother plant (Donor) alone in one cluster while cellular lines were gathered in another cluster with distance of 0.7614, cellular lines were divided into two broad groups (I and II), group I contained cellular line 10C, group II included other cellular lines (5C01, 5C, 6C), and their distance was 0.4416, while both of cellular lines 5C01 and 5C were genetically the closest to each other.

These results revealed that presence of a genetic variation among cellular lines of callus although it was derived from the same source (the control 5C01), that could be attributed mainly to the role of the medium components in creating a change in the genetic structure of plant material, confirming the fact that callus culture is a source of genetic variations, and the ISSR technique can be used as an effective tool in the detection of such differences.

Massurment of gene expression that encoded the enzymes involved in the alkaloids synthesis pathway, stage of exponential phase showed highest value of PMT gene expression wher was (4.563) and (7.728) times greater compared with control 5C<sub>01</sub>. In 5C and 10C lines respectively, While highest value of PMT in 6C line was at 5 days (3.117) times greater compared with control 5C<sub>01</sub>. While highest value of H6H gene expression was at the beginning of lag stage (5 days), where was (2.676), (3.364) and (2.297) times greater compared with control 5C<sub>01</sub>. In 5C, 6C and 10C cellular lines respectively. However, this superiority in genetic expression was not associated with an increase in the alkaloids concentration, This is mainly due to the changing of the reaction pathway at the beginning of tropane alkaloids synthesis pathway from putrescine – tropane to putrescine - spermidine, which negatively affected on the amount of produced tropane alkaloids.

Although of chromosome number's variation in the callular lines compared with the diploid type  $2n = 34$  in the natural plant, the dominant

form of chromosomes number was the diploid type with its aneuploidy, representing 78%, 76%, 60% and 73% in 5C01, 5C , 6C, 10C lines, respectively in the lag phase, with a low rate of triploidy (3x) and tetraploidy (4x), while the polyploidy cells were absent. Diploid type remained superiorite at the exponential phase in all studied cellular lines except the control 5C01, with increasing of triploidy (3x) and tetraploidy (4x) percent, also the same in the stability phase.