تأثير حامض السالسيلك والفنيل الانين في استحثاث الكالس وانتاج قلويدات التروبان من نبات البلادونا *Atropa belladonna* خارج الجسم الحي

محمد شهاب حمد

جامعة بغداد / كلية الزراعة

الخلاصة :

نفذ البحث في مختبر زراعة الانسجة النباتية – كلية الزراعة – جامعة بغداد خلال عامي 2009 - 2010 . تم استحثاث الكالس من خلال زراعة القمة النامية لبادرة البلادونا على الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 1.5 ملغم / لتر من 2,4-D و 0.4 ملغم / لتر من BA . اضيف حامض السالسيلك بالتراكيز (0، 1، 2، 3) ملغم / لتر والفنيل الانين بالتراكيز (10، 20، 30، 40) ملغم / لتر .اعطى الوسط الغذائي MS الخالي من حامض السالسيلك اعلى معدل للوزنين الطري والجاف للكالس بلغ (753.9 ، 65.53) ملغم، على التوالي ، وانخفض معدل الوزنين الطري والجاف للكالس بزيادة تركيز حامض السالسيلك الى (3 ملغم / لتر) فبلغ (268.7 ، 17.25) ملغم، على التوالي . وتشير النتائج ان وسط MS المجهز بتركيز 20 ملغم / لتر من الفنيل الانين اعطى اكبر معدل للوزنين الطري والجاف للكالس بلغ (584.2 ، 48.84) ملغم، على التوالي . وبينت النتائج ان وسط MS المزود بتركيز (0 ، 20) ملغم / لتر من حامض السالسيلك والفنيل الانين اعطى اكبر معدل للوزنين الطري والجاف بلغ (938.2 ، 83.25) ملغم، على التوالي . اعطى الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز {(2، 40) و (1 ، 30) و(1، 20) او (2 ، 30) } ملغم / لتر من حامض السالسيلك والفنيل الانين، على التوالي اعلى قيمة من قلويدات Atropine و Scopolamine و Tropine و7- OH-Hyoscyamine بلغت (108.25 و 380.18 و 392.04 و 390.94) مايكروغرام / غرام وزن جاف من الكالس، على التوالي .

المقدمة

ينتمي نبات البلادونا (ست الحسن) *Atropa belladonna* والتي تعد اوربا وغرب اسيا وشمال افريقيا الموطن الاصلي لها الى العائلة الباذنجانية Solanaceae التي تعد المصدر الرئيسي لقلويدات التروبان Tropane alkaloids واهمها قلويدات Atropine وHyoscyamine وScopolamine و Tropine(Karuppusamy، 2009) . وتعد قلويدات التروبان من نواتج الايض الاولي (الكربوهيدرات ، البروتينات والدهون) ذات الاهمية الكبيرة في نمو وتطور النبات (Sarin، 2005 و Taizeو Zeiger،2006) التي تتكون في العديد من نباتات العائلة الباذنجانية كأجناس *Atropa* و*Scopolia* و*Hyoscyamus* و*Brugmansia* و*Datura* .

تستخدم قلويدات التروبان التي تم التعرف على اكثر من 18 قلويداً منها (Zayed وWink،2004) في تثبيط الجهاز العصبي اللاودي الذي يتحكم في مختلف انشطة الجسم اللاارادية كما انها تزيد ضربات القلب وتوسع حدقة العين ومضاد لتشنج العضلات (شوفاليه ،2010) . واشارت منظمة الصحة الدولية الى ان 80% من سكان العالم يعتمدون على الادوية من مصادر نباتية في العلاج الطبي (Abdel-Hady واخرون ،2008).

استخدمت تقانة زراعة الانسجة النباتية للتغلب على بعض المعوقات التي تواجه طرائق الزراعة التقليدية للنباتات المنتجة لمثل هذه المركبات لاسباب تتعلق في الاستمرارية في الانتاج والحصول على نقاوة عالية ولاسباب تتعلق بالمواسم والمناخ والاعتبارات الاقتصادية ،ان كل هذه العوامل شجعت على انتاج المركبات الثانوية Secondary products تحت ظروف مسيطر عليها في مختبرات زراعة الانسجة النباتية لتجاوز بعض الصعوبات في استخلاص المركبات الصيدلانية الفعالة ولتوفير المصادر النباتية على مدار السنة بكميات كافية بدلاً من الحصول عليها من المادة الخام (Neumann واخرون، 2009 وKaruppusamy ،2009) لهذا يعد استخدام تقانة زراعة الانسجة النباتية في زيادة انتاج النباتات الطبية من المركبات الفعالة صيدلانياً قياساً بالكمية التي تنتجها النباتات الام من الاستخدامات التطبيقية لهذه التقانه (Park واخرون، 2008و Ibrahim واخرون ، 2009) فقد تمكن بعض الباحثين من زيادة كمية المركبات الثانوية التي تستخدم في المجال الطبي كقلويدات التروبان في نبات *Brugmansia candida* (Marconi واخرون ، 2008) و نبات *Scopolia parviflora* (Min واخرون ، 2007) ونبات البلادونا (Leemr ، 2007و Rothe واخرون ،2003) والقلويدات المورفينية في نبات الخشخاش (حمد واخرون ،2010) والتربينات الاحادية في نبات السالفيا (المرسومي ،2010) . كما ذكر بعض الباحثين ان اضافة الاحماض الامينية الى الوسط الغذائي خارج الجسم الحي لاتعمل كمركب بادئ فقط (Precursors) بل كمحفز (Elicitor) ايضاً، فقد وجد (Aziz واخرون

2002، ان قلويد Hyoscyamine وScopolamine في نبات الداتوره يتم بناؤها من الحامضين الامينين phenylalanine وornithin وان اضافتها الى الوسط الغذائي زاد من تركيز Atropine وTropine عند زراعة الخلايا المعلقة لنبات الداتوره (Neumann واخرون ،2009). واشار بعض الباحثين الى ان اضافة Salicylic acid (SA) كمحفزات اجهادية Potential elicitors يحفز التعبير الجيني للبناء الحيوي للانزيمات التي تتحكم في بناء المركبات الثانوية، فقد ادت اضافته الى زيادة تراكم قلويدات Scopolamine وHyoscyamine في مزارع الجذور لجنس *Brugmansia* التابع للعائلة الباذنجانية (Zayed وWink ،2004 تهدف هذه التجربة الى معرفة تأثير حامض السالسيلك والحامض الاميني الفنيل الانين في انتاج قلويدات التروبان من الكالس المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا .

المواد وطرائق العمل :

نفذت التجربة في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم البستنة – كلية الزراعة – جامعة بغداد للفترة من ايلول 2009 ولغاية تشرين الثاني 2010 ،واجريت التحليلات المختبرية المتضمنة تقدير المواد الفعالة في شركة الحقول البيضاء للاستشارات البيئية والهندسية – الحارثية – بغداد .

1- اخذ وزن 150 ملغم من الكالس المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا وزرع على وسط MS (Murashige وSkoog ،1962) المجهز بتركيز 1.5 ملغم / لتر من 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) و 0.4 ملغم / لتر من BA (Benzyl adenine) و 30 غم / لتر سكروز . اضيف حامض السالسيلك بالتراكيز (0 ،1 ،2 ،3) ملغم / لتر والفنيل الانين بالتراكيز (10 ،20،30،40) ملغم / لتر لكل تركيز من تراكيز SA الى الوسط الغذائي . حضنت الزروعات في الظلام على درجة حرارة 25 ±2م وبعد خمسة اسابيع تم حساب الوزنين الطري والجاف للكالس بأستخدام ميزان حساس .

2- الاستخلاص والتقدير الكمي والنوعي للمواد الفعالة

ساعة طحنت قطع الكالس واخذ من المسحوق 48 م ولمدة 70بعد تجفيف الكالس على درجة حرارة 24 ووضعت العينات على جهاز الهزاز لمدة 96% مل من الكحول الاثيلي النقي 7.5غم واضيف له 1 ساعة ثم رشح المحلول بأستخدام ورق ترشيح في بيكرات ووضع في الفرن الكهربائي على درجة مل من الكحول الاثيلي النقي 3 ساعة لتحويله الى مسحوق . اذيب المسحوق في 24م ولمدة 40حرارة 7- وTropine و Scopolamine و Atropine.قدرت المواد الفعالة في المحلول والتي تضمنت من LC AI Chromotography ذو النوع Mass HPLC بأستخدام جهاز OH-Hyoscyamine) . حقن المحلول القياسي والعينة في الجهاز لتحديد زمن الاحتجاز Shimadzu 2010شركة (لكل من المحلول القياسي والعينة وتم حساب تركيز Area وارتفاع حزمة العينة Retention time كل عينة حسب المعادلة التالية:

عدد مرات التخفيفX تركيز المحلول القاسي Xتركيز النموذج = مساحة النموذج
مساحة المحلول القياسي

) .2009واخرون ،Ajungla وحسب طريقة (

3- التحليل الاحصائي

CRD (Completely Randomized نفذت التجربة بأستخدام التصميم العشوائي الكامل (وبتجارب عاملية بعشرة مكررات وقورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي Design .(الساهوكي ووهيب ، 0.05 وعلى مستوى احتمال Least Significant Differences (LSD) 1990.)

النتائج والمناقشة :

1SA. تأثير تراكيز والفنيل الانين والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري للكالس (ملغم)

يشير الجدول (1) الى انخفاض معدل وزن الكالس الطري معنويا" بزيادة تراكيز SA المضافة اذ اعطى الوسط الغذائي MS الخالي من SA اعلى معدل للوزن الطري للكالس بلغ 753.9 ملغم وانخفض الوزن الطري بزيادة تراكيز SA الى (1،2،3) ملغم / لتر فبلغ (591.7 ،444.4،268.7) ملغم على التوالي . ويوضح الجدول نفسه ان الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 20 ملغم / لتر من الفنيل الانين اعطى اعلى معدل وزن طري بلغ 584.2 ملغم واختلف معنويا" عن بقية المعاملات اما فيما يتعلق بالتداخل بين تراكيز SA والحامض الاميني

الفنيل الانين فيظهر من الجدول (1) ان هناك زيادة معنوية في معدل الوزن الطري للكالس في وسط MS المزود بتركيز (0 و20) ملغم / لتر من SA والفنيل الانين على التوالي بلغ 938.2 ملغم والذي اختلف معنويا" عن بقية التداخلات .

جدول (1) تأثير تراكيز SA والفنيل الانين والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري للكالس (ملغم) المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا بعد خمسة اسابيع من الزراعة (الوزن الابتدائي 150 ملغم)

تركيزالفنيل الانين ملغم/ لتر / تراكيز SA ملغم / لتر	10	20	30	40	معدل تأثير SA
0	726.2	938.2	713.7	637.5	753.9
1	550.0	700.0	665.7	451.3	591.7
2	382.5	445.0	445.0	505.0	444.4
3	278.3	253.8	253.3	289.5	268.7
معدل تأثير الفنيل الانين	484.3	584.2	519.4	470.8	
L.S.D. (0.05)	لتراكيز SA= 42.32 لتراكيز الفنيل الانين= 42.32 للتداخل= 84.63				

والفنيل الانين والتداخل بينهما في معدل الوزن الجاف للكالس (ملغم) .2SA-تأثير تراكيز

يوضح الجدول (2) انخفاض معدل وزن الكالس الجاف معنويا" بزيادة تراكيز SA المضافة ، اذ اعطى الوسط الغذائي MS الخالي من SA اعلى معدل للوزن الجاف بلغ 65.53 ملغم وانخفض بزيادة تراكيز SA الى (1، 2، 3) ملغم / لتر فبلغ (49.31، 35.56، 17.25) ملغم على التوالي . ويبين الجدول نفسه ان الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 20 ملغم / لتر من الفنيل الانين اعطى اعلى معدل وزن جاف للكالس بلغ 48.84 ملغم واختلف معنوياً عن بقية المعاملات وفيما يتعلق بالتداخل بين تراكيز SA والفنيل الانين فيظهر من نتائج الجدول (2) ان هناك زيادة في معدل الوزن الجاف للكالس في وسط MS المجهز بتركيز (0و 20) ملغم / لتر من SA والفنيل الانين على التوالي بلغ 83.25 ملغم الذي اختلف معنويا"عن بقية التداخلات . ان انخفاض الوزن الطري والجاف للكالس بزيادة تراكيز SA والفنيل الانين المضافة الى الوسط الغذائي عن المستوى المناسب ربما سبب زيادة في الشد Stress او الجهد الاوزموزي المسلط على الخلايا الذي يسبب انخفاضا" في جاهزية العناصرالغذائية وبالتالي المواد الغذائية الذائبة فيه والذي يؤثر في نمو الكالس وايض بعض المركبات الخلوية . وربما يعود السبب في انخفاض الوزن الطري والجاف للكالس الى حصول بناء كميات اضافية من SA نتيجة لاضافة الحامض الاميني الفنيل الانين الذي يعد البادئ البنائي للـSA الذي زاد من تركيزه في الوسط الغذائي مما اثر سلبا" في نمو خلايا الكالس (Hayat و Ahmed، 2007) و(Zayed وWink، 2004).

جدول (2) تأثير تراكيز SA والفنيل الانين والتداخل بينهما في معدل الوزن الجاف للكالس (ملغم) المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا بعد خمسة اسابيع من الزراعة

تركيزالفنيل الانين ملغم/ لتر / تراكيز SA ملغم / لتر	10	20	30	40	معدل تأثير SA

65.53	53.88	62.00	83.25	63.00	**0**
49.31	36.13	55.50	60.75	44.88	**1**
35.56	41.38	35.13	36.38	29.37	**2**
17.25	18.75	16.62	15.00	18.62	**3**
	37.53	42.31	48.84	38.97	**معدل تأثير الفنيل الانين**
لتراكيز SA= 4.41 لتراكيز الفنيل الانين= 4.41 للتداخل= 8.83					**L.S.D. (0.05)**

والفنيل الانين في محتوى الكالس الجاف من قلويدات التروبان (مايكروغرام 3SA-تأثير التداخل بين تراكيز / غم وزن جاف)

يلاحظ من النتائج المبينة في الجدول (3) والمقدرة بجهاز MassHPLCان هناك زيادة في كمية القلويدات المستخلصة من الكالس الجاف المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا استجابة للتركيزين (1 و2) ملغم / لتر من SA بالتداخل مع تراكيز الفنيل الانين ، حيث يتبين ان الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز (2 و40) ملغم / لتر من SA والفنيل الانين على التوالي اعطى اعلى كميةمن مركب Atropine بلغت (108.25) مايكروغرام / غرام وزن جاف من الكالس (شكل 16) وبلغت الكمية (100.59) مايكروغرام / غرام ززن جاف من الكالس عند التركيز (1 ، 30) ملغم / لتر من SA والفنيل الانين على التوالي (شكل 11) وانخفضت الى (20.63) مايكروغرام / غرام وزن جاف من الكالس عند التركيز (3 و40) ملغم / لتر لكل من SA والفنيل الانين على التوالي ولنفس المركب (شكل 17)

جدول (3) تأثير التداخل بين تراكيز SA والفنيل الانين في محتوى الكالس الجاف من قلويدات التروبان (مايكرو غرام /غرام وزن جاف) المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا

تراكيز SA (ملغم / لتر)	تركيزالفنيل الانين (ملغم / لتر)	المركبات الثانوية (مايكروغرام / غرام وزن جاف)			
		Atropine	Scopolamine	Tropine	7-0H-Hyoscyamine
0	10	49.36	107.28	41.59	329.33
	20	48.31	77.55	196.88	357.84
	30	50.06	95.78	200.02	276.14
	40	46.62	95.73	216.80	325.98
1	10	36.56	189.79	239.47	304.96
	20	75.21	101.13	392.04	247.74
	30	100.59	380.18	175.16	225.94
	40	39.32	94.19	207.79	303.88
2	10	68.90	47.55	243.88	250.05
	20	88.66	137.53	383.38	86.98
	30	44.03	83.30	303.05	390.94
	40	108.25	110.28	128.34	57.32

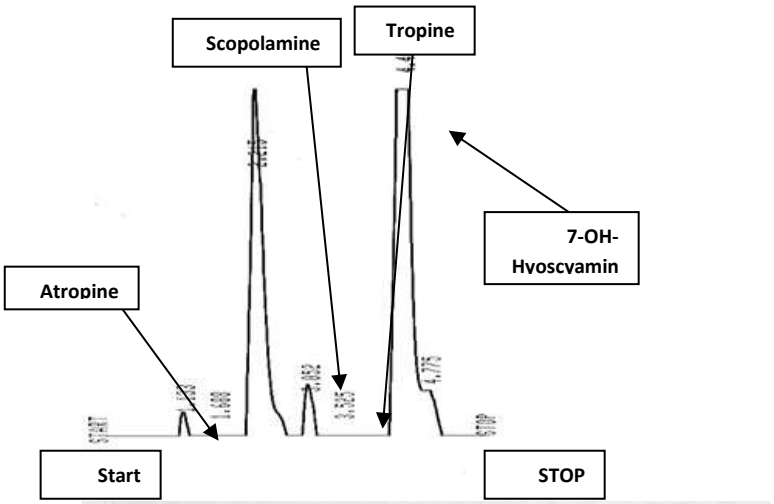
3	10	65.88	112.12	222.12	299.56
	20	27.42	101.15	141.16	99.05
	30	90.14	132.26	236.00	374.54
	40	20.63	278.30	222.15	171.80

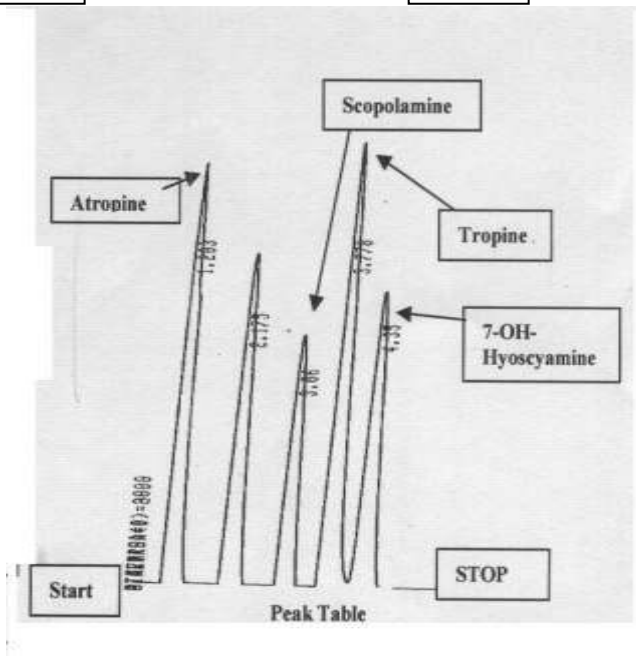
تفوق الوسط الغذائي المجهز بتركيز (1 و 30) ملغم / لتر من SA والفنيل الانين، على التوالي في اعطاء اعلى كمية من مركب Scopolamine بلغت (380.18) مايكروغرام / غرام وزن جاف من الكالس (شكل 11) واقلها (47.55) مايكروغرام / غرام وزن جاف عند التركيز (2 و 10) ملغم / لتر من SA والفنيل الانين على التوالي وكما في (شكل 4) . وكان التركيز (1 و 20) ملغم / لتر من SA والفنيل الانين، على التوالي الاكثر تأثيرا" في تحفيز الكالس على انتاج مركب Trpoineاذ بلغت قيمته (392.04) مايكروغرام / غرام وزن جاف شكل (7) ، في حين ان زيادة التركيز الى 2 ملغم / لترمن SA وعند التركيز 20 ملغم / لتر من الفنيل الانين ادى الى اعطاء (383.38) مايكروغرام / غرام وزن جاف وكما في الشكل (8) وانخفض تركيز مركب Tropineالى (41.59) مايكروغرام / غرام وزن جاف عند التركيز (0 و 10) ملغم / لتر من SA والفنيل الانين، على التوالي كما في الشكل (2) .

ان اضافة التركيزين (2و3) ملغم / لتر من SA مع التركيز 30 ملغم / لتر من الفنيل الانين اعطى اعلى كمية من مركب 7-OH-Hyoscyamine بلغت (390.94 و 374.54) مايكروغرام / غرام وزن جاف من الكالس، على التوالي كما في الشكل (12 و13) وانخفض تركيز هذا المركب الى (86.98) مايكروغرام / غرام وزن جاف للكالس عند اضافة (2 و 20) ملغم / لتر من SA والفنيل الانين، على التوالي وكما في الشكل (8).

يظهر من الجدول (3) والاشكال (2- 17) ان الاستجابة في تكوين كل مركب من مركبات التروبان تختلف بأختلاف التراكيز المضافة من SA والفنيل الانين الى الوسط الغذائي، وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Yamada و Tabada (1997) وLee واخرون (1998) في البلادونا و Iranbakhsh واخرون(2007) في الداتوره من ان الاستجابة في تكوين كل مركب من مركبات التروبان تختلف بأختلاف التراكيز المستعملة من SA، فربما تكون التراكيز المناسبة المضافة من كل من SA والحامض الاميني الى الوسط قد أدت الى حماية الخلايا والاغشية الخلوية من الاكسدة كون ان SA يحفز التعبير الجيني للانزيمات المضادة للاكسدة ويزيد من تجمع مركبات الايض الثانوي (قلويدات التروبان) Zayed و Wink(2004) وKhalili واخرون (2010) ، وان المحفزات Elicitors الحيوية منها biotic وغير الحيوية Abiotic معروفة في تشجيعها لاستحثاث بناء مركبات الايض الثانوي وهذا يتفق مع ماوجده Sakhanokho وKelley(2009) و Pitta- Alvarez واخرون (2000)، وقد تكون اضافة SA مع الفنيل الانين ثبط خطوات الاكسدة لمسار البناء الحيوي لقلويدات التروبان وعند التراكيز المناسبة Hayat و Ahmed (2007) . ولا تتفق هذه النتائج مع ما وجده Ghanem واخرون (2010) من ان اضافة SA ادى الى انخفاض تركيز الكلايكوسيدات في نبات *Digitalis lanata*. وقد يعزى سبب زيادة انتاج قلويدات التروبان عند التراكيز المناسبة من الحامض الاميني المضافة الى الوسط الغذائي الى كونه بادئها البنائي (Khanna واخرون ،2005) وAziz واخرون (2002)، وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Karam واخرون (2003) وحمد واخرون (2010) فعند تغذية الوسط الغذائي ببادئ من الاحماض الامينية يعزز من كون الحامض الاميني لايعمل مركباً بادئاً فحسب بل محفزاً ايضاً مع حصول زيادة في الاحماض الامينية الحرة (Ramawat ،2004) .

ان زيادة التراكيز المضافة من المحفزات الى الوسط الغذائي عن التراكيز المناسبة ربما ادى الى احداث تغيرات في العلاقات المائية للخلايا بسبب زيادة الشد stress المسلط عليها والذي يسبب انخفاضاً في جاهزية الماء وبالتالي انخفاض في كمية المواد الغذائية الذائبة في الوسط الغذائي الذي تنمو فيه الخلايا (Sakerو Rady ،1997). كما تعود قله الاستجابة في تكوين قلويدات التروبان عند زيادة تراكيز SA والحامض الاميني الى زيادة الاجهاد stress الذي اثر سلباً في تلك الخلايا مما سبب في تلفها وبالتالي انخفاض في فعالية الانزيمات المسؤولة عن بناء مركبات الايض الثانوي(Ramawat ،2004).

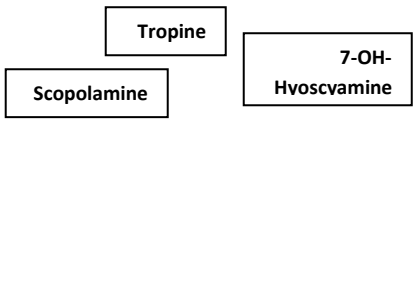




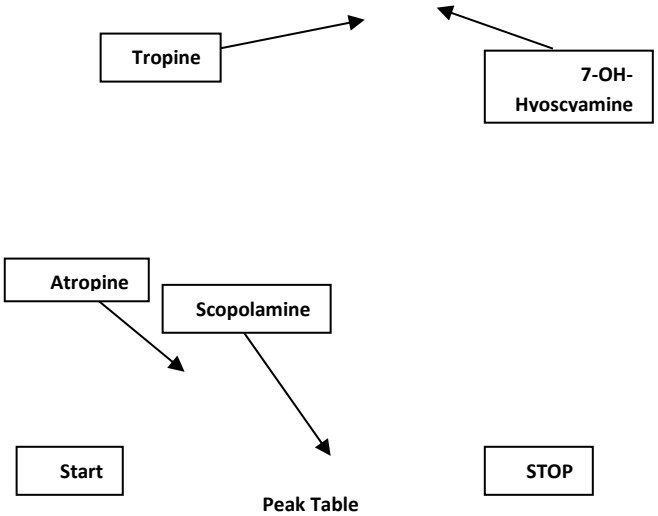
الشكل (1) يمثل المحلول القياسي

الشكل (2) تأثير حامض SA اسد بالتركيز 0 ملغم\التر ×10ملغم\التر من الفنيل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladonna*

Compound	Time	Area	Conc µg/g	Compound	Time	Area	Conc µg/ml
Atropine	1.133	10587	49.36	Atropine	1.203	53616	50
Scopolamine	3.052	14451	107.28	Scopolamine	3.06	33674	50
Tropine	3.525	7974	41.59	Tropine	3.778	47932	50
7-OH-Hyoscyamine	4.408	64478	329.33	7-OH-Hyoscyamine	4.35	230362	50



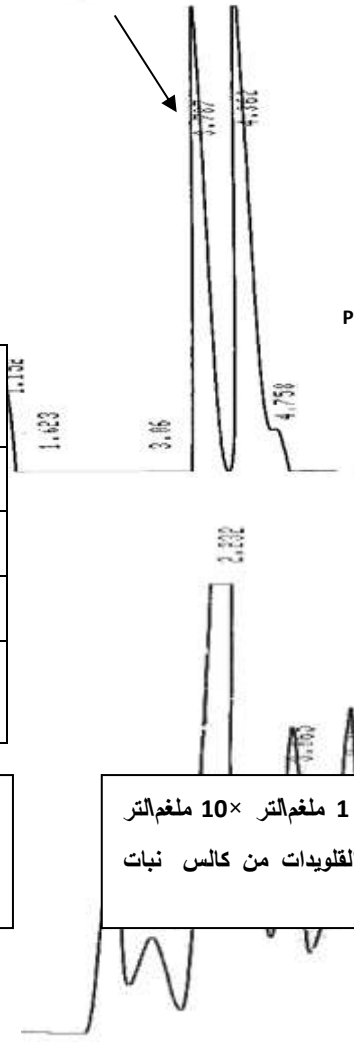
Compound	Time	Area	Conc µg/g
Atropine	1.145	19607	36.56



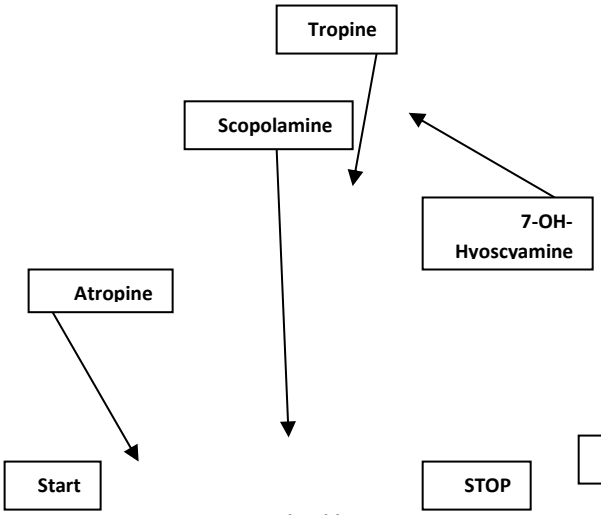
Compound	Time	Area	Conc µg/g
Atropine	1.152	14777	68.90
Scopolamine	3.06	6406	47.55
Tropine	3.787	46760	243.88
7-OH-Hyoscyamine	4.362	50913	260.05

الشكل (4) تأثير حامض SA بالتركيز 2 ملغم\لتر ×10 ملغم\لتر من الفنيل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladona*

Scopolamine	3.065	63912	189.79
Tropine	3.75	114915	239.47
7-OH-Hyoscyamine	4.208	149263	304.96

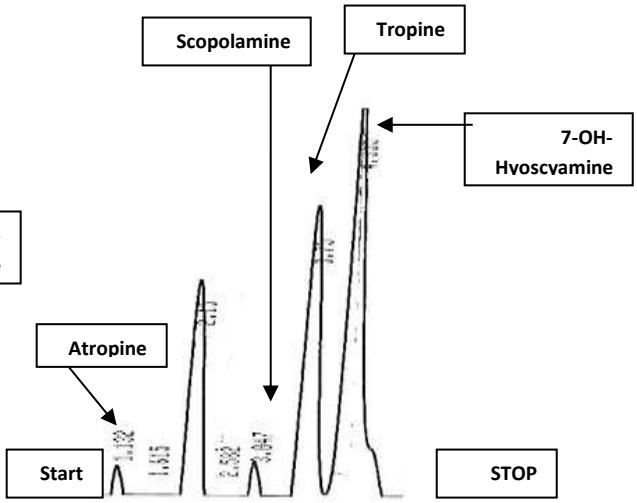


الشكل(3) تأثير حامض SA بالتركيز 1 ملغم\لتر ×10 ملغم\لتر من الفنيل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladona*



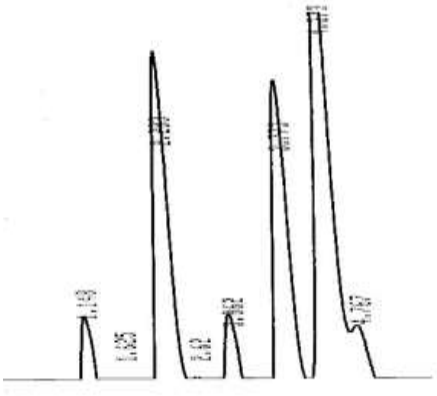
Peak Table

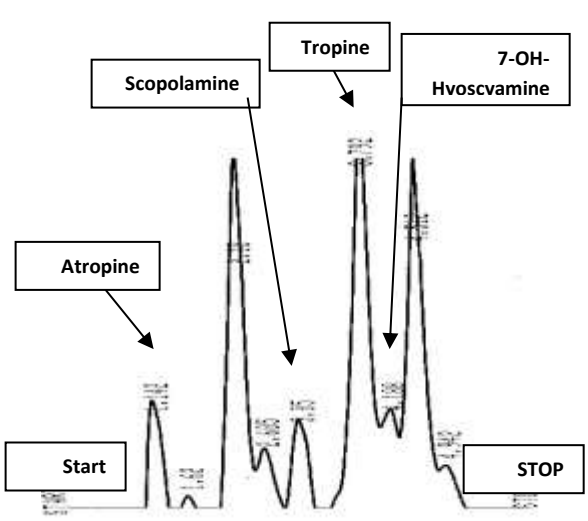
Compound	Time	Area	Conc µg/g
Atropine	1.132	10362	48.31
Scopolamine	3.047	10446	77.55
Tropine	3.75	37748	196.88
7-OH-Hyoscyamine	4.355	70058	357.84



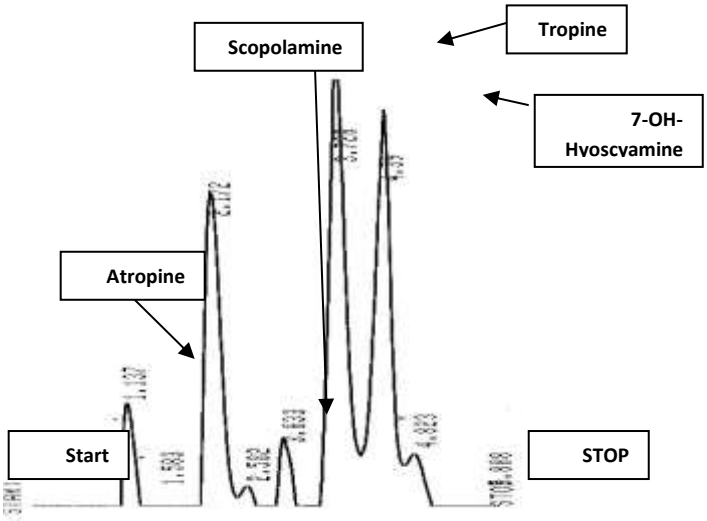
Peak Table

Compound	Time	Area	Conc µg/g
Atropine	1.148	14130	65.88
Scopolamine	3.062	15103	112.12
Tropine	3.773	42588	222.12
7-OH-Hyoscyamine	4.373	58649	299.56





Peak Table



Peak Table

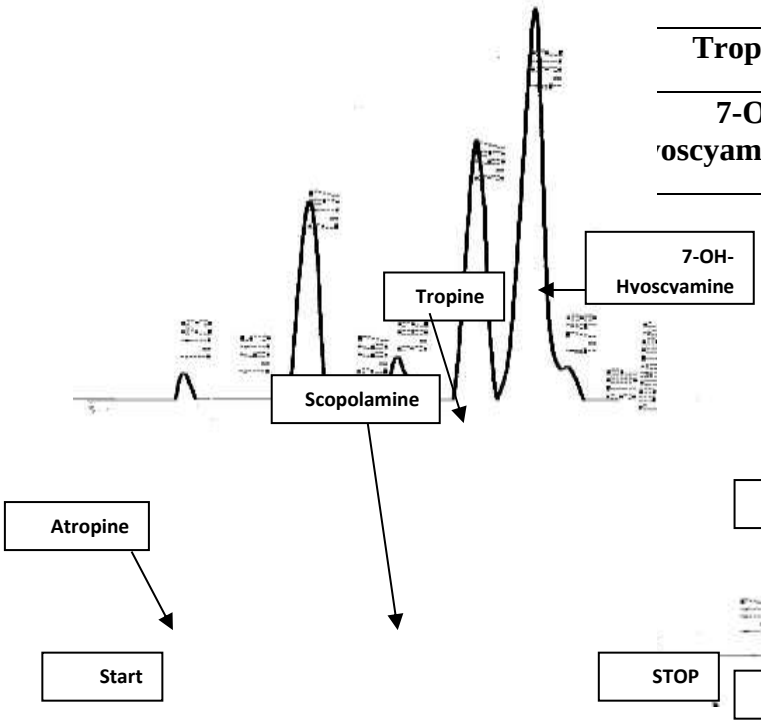
Compound	Time	Area	Conc µg/g
Atropine	1.142	15847	88.66
Scopolamine	3.05	15438	137.53
Tropine	3.792	61255	383.38
7-OH-Hyoscyamine	4.188	14191	86.98

Compound	Time	Area	Conc µg/g
Atropine	1.137	16130	75.21
Scopolamine	3.033	13623	101.13
Tropine	3.728	55993	392.04
7-OH-Hyoscyamine	4.39	48504	247.74

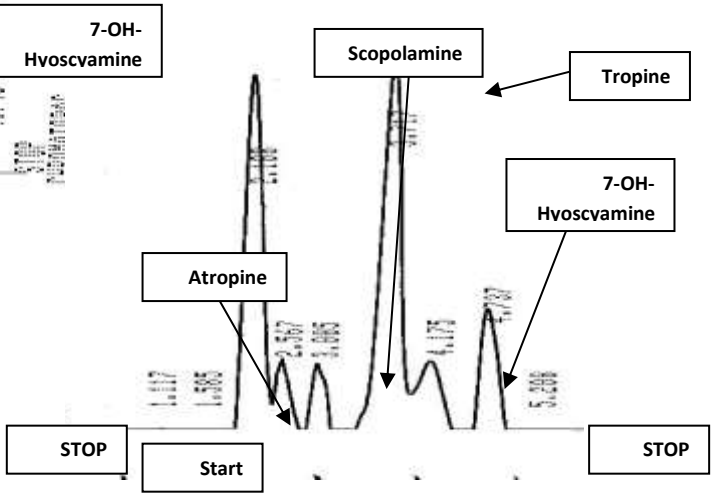
الشكل (7) تأثير حامض SA بالتركيز 1 ملغم\التر ×20ملغم\التر من الفينل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladona*

الشكل (8) تأثير حامض SA بالتركيز 2 ملغم\التر ×20لغم\التر من الفنيل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladonna*

Compound	Time	Area	CONC µg/g
Atropine	1.117	4902	27.42
opolamine	3.005	11354	101.15
Tropine	3.717	38691	141.16
7-OH-oscyamine	4.175	16161	99.05



Peak Table



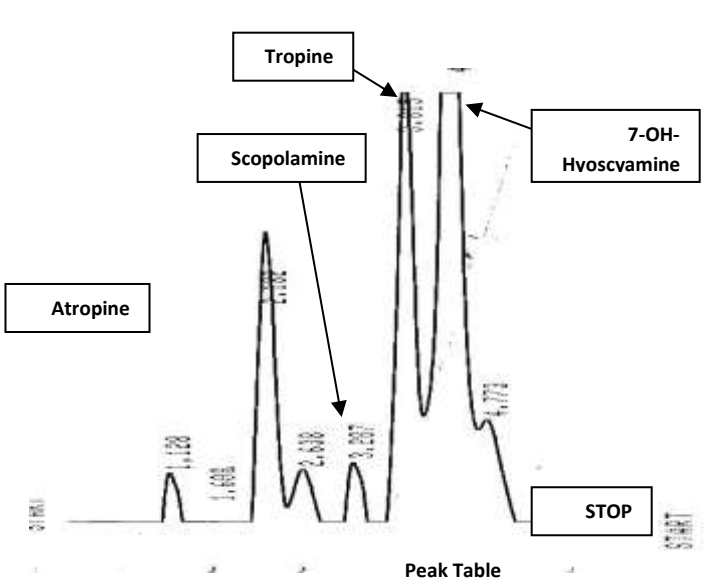
Peak Table

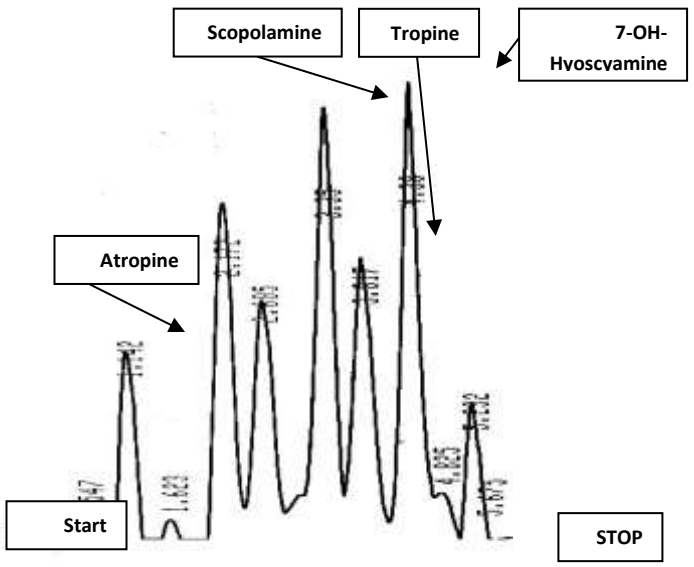
Compound	Time	Area	Conc µg/g
Atropine	1.123	7669	50.06
Scopolamine	3.022	9216	95.78
Tropine	3.697	27393	200.02

7-OH-Hyoscyamine	4.312	38617	276.14

الشكل (9) تأثير حامض SA بالتركيز 3 ملغم/لتر ×20ملغم/لتر من الفنيل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladonna*

الشكل (10) تأثير حامض SA بالتركيز 0 ملغم/لتر ×30 ملغم/لتر من الفنيل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladonna*





Peak Table

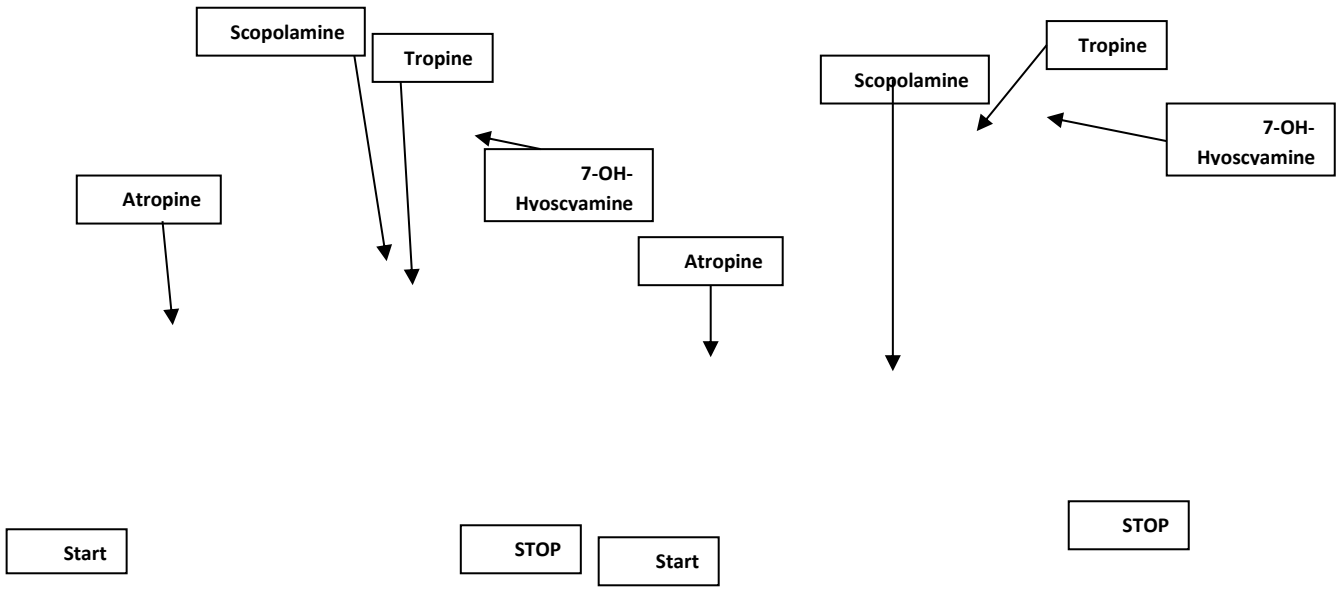
Compound	Time	Area	CONC µg/g
Atropine	1.128	9444	44.03
Scopolamine	3.207	11221	83.30

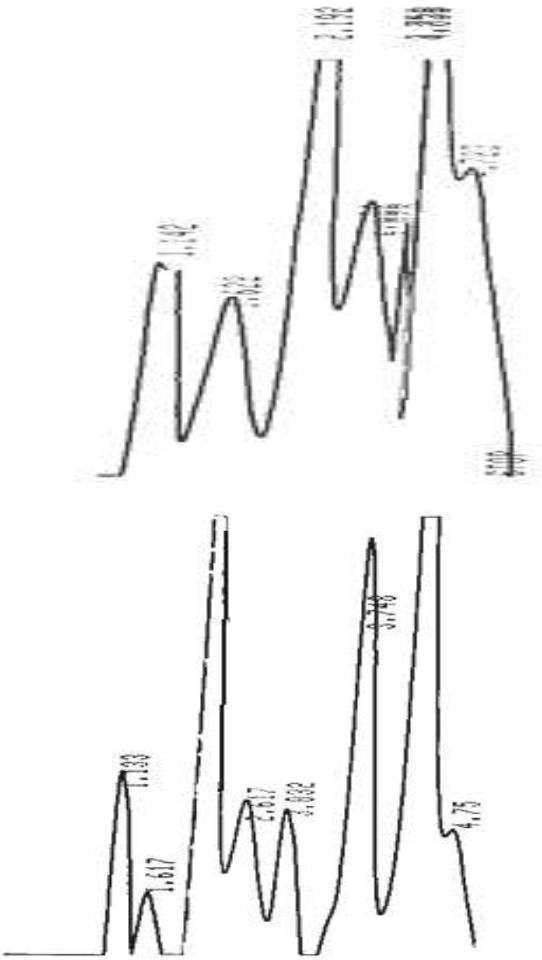
Tropine	**3.815**	**58105**	**303.05**
7-OH-Hyoscyamine	**4.36**	**76540**	**390.94**

Compound	Time	Area	CONC µg/g
Atropine	**1.142**	**17978**	**100.59**
Scopolamine	**3.35**	**42674**	**380.18**
Tropine	**3.817**	**27987**	**175.16**

الشكل (11) تأثير حامض SA بالتركيز 1 ملغم\التر ×30ملغم\التر من الفنيل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladonna*

الشكل (12) تأثير حامض SA بالتركيز 2 ملغم\التر ×30ملغم\التر من الفنيل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladonna*





Peak Table

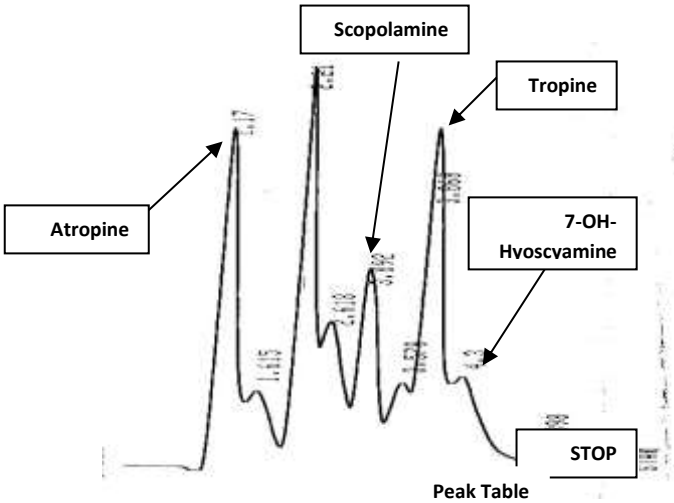
Compound	Time	Area	CONC µg/g
Atropine	1.133	19333	90.14
Scopolamine	3.032	17816	13 2.26
Tropine	3.748	45249	236.00
7-OH-Hyoscyamine	4.358	73329	374.54

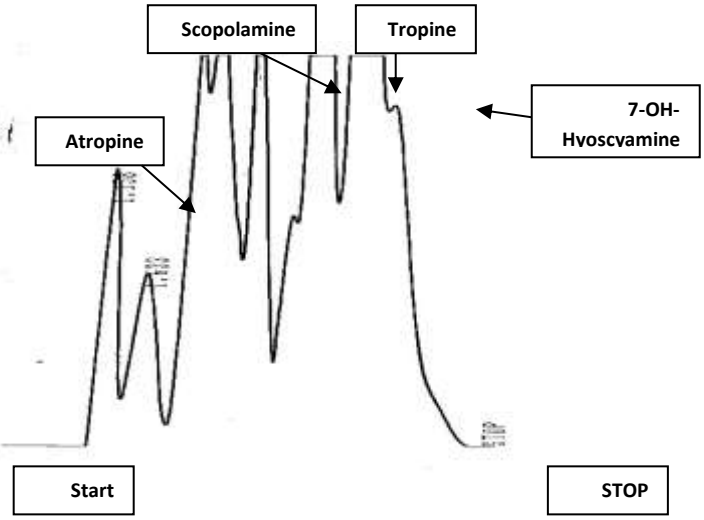
الشكل (13) تأثير حامض SA بالتركيز 3 ملغم/لتر ×30ملغم/لتر من الفنيل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladonna*

Peak Table

Compound	Time	Area	CONC µg/g
Atropine	1.142	9999	46.62
Scopolamine	3.028	12895	95.73
Tropine	3.758	41568	216.80
7-OH-Hyoscyamine	4.333	63821	325.98

الشكل (14) تأثير حامض SA بالتركيز 0 ملغم/لتر ×40 ملغم/لتر من الفنيل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladonna*





Table

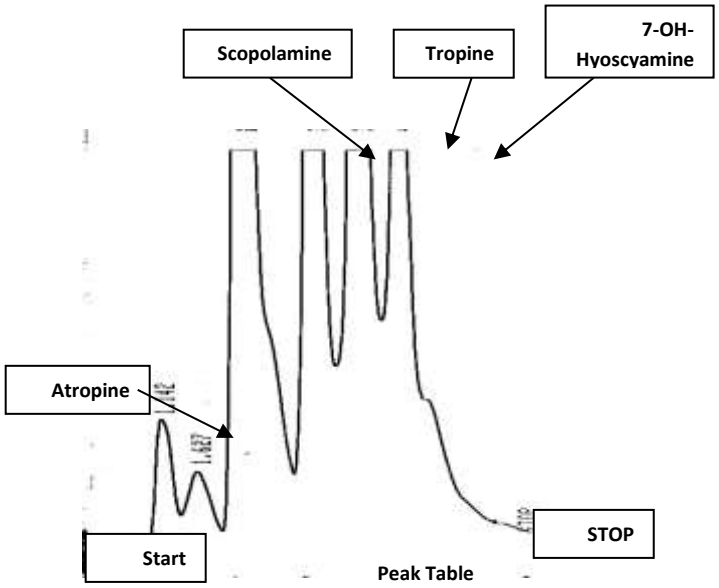
Peak Table

Compound	Time	Area	CONC µg/g
Atropine	1.17	29021	108.25
Scopolamine	3.092	18568	110.28
Tropine	3.868	30758	128.34
7-OH-Hyoscyamine	4.3	14028	57.32

Compound	Time	Area	CONC µg/g
Atropine	1.158	14056	39.32
Scopolamine	3.075	21146	94.19
Tropine	3.865	66401	207.79
7-OH-Hyoscyamine	4.398	99159	303.88

الشكل (16) تأثير حامض SA بالتركيز 2 ملغم\التر ×40ملغم\التر من الفنيل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladonna*

الشكل (15) تأثير حامض SA بالتركيز 1 ملغم\التر ×40ملغم\التر من الفنيل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladonna*



Compound	Time	Area	Conc µg/g
Atropine	1.142	11061	20.63
Scopolamine	3.205	93715	278.30
Tropine	3.82	106483	222.15
7-OH-Hyoscyamine	4.343	84089	171.80

الشكل (17) تأثير حامض SA بالتركيز 3 ملغم\لتر × 40ملغم\لتر من الفنيل الانين على انتاج بعض القلويدات من كالس نبات *Atropa belladonna*

المصادر :-

1. الساهوكي ،مدحت ووهيب ،كريمة احمد .1990 . تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب . وزاره التعليم العالي والبحث العلمي .العراق .

2. المرسومي ،حيدر عماد رشيد .2010 .تاثير مكونات الوسط الغذائي والجزء النباتي المزروع في تكوين الكالس وانتاج بعض المركبات ذات الاستعمالات الطبية في نبات المريمية *Saliva officinalis* رساله ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد .

3. *حمد ، محمد شهاب ، ابراهيم عبد الله حمزة وسراب عبد الهادي المختار .2010. تأثير السكروز والتايروسين في استحثاث الكالس وانتاج المورفين والكودائين من نبات الخشخاش* Papaver somniferum *خارج الجسم الحي ، مجلة مركز بحوث التقنيات الاحيائية. المجلد (4). العدد (2): 45-53.*

4. شوفاليه . 2010. الطب البديل ، التداوي بالاعشاب والنباتات الطبية .ترجمة د.عمر الايوبي ،اشراف د.محمد دبس ، ص66.

5. Abdel-Hady,.M.S;E.M.Okasha;S.S.A.Soliman and M.Talaat. 2008 . Effect of Gamma Radition and Gibberellic acid in germination and alkaloid production in *Atropa belladonna* L.Austarlian Journal of Basic and Applied Sciences ,2(3):401-405.

6. Ajungla .L ; P.P Patil ; R .B. Barmukh and T. D . Nikam . 2009. Influence of biotic and abiotic elicitors on Accumulation of hyoscyamine and scopolamine in Root culture of *Datura metel* L. , Indian Journal of Biotechnology, 8: 317 -322.

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

8. Ghanem ,S .A; A.M.Aboul –Enein ; A. EL-Sawy ;M.R.Rady ;Mono ,M.Ibrahem .2010. In vitro propagation and cardiac Glycosides content of *Digitalis lanata* .Vol .2.No.6.

9. Hayat ,S. and A ,Ahmed .2007. Salicylic acid – A plant Hormone .Springer .ISBN, 1402051832.

10. Ibrahim , A .I . ; A.E. K . Mostafa , A. M. Amira and A. E. Asmaa .2009. Alkaloids Production and Organogenesis from callus of *Hyoscyamus muticus* L . *In vitro* . Journal of Applied Sciences Research, 5 (1): 82-92.Cairo,Egypt.

11. Iranbakhsh A.R. ; M . A . Oshagi and M . Ebedi . 2007 .Growth and production optimization of tropane Alkaloids in *Datura stramonium* cell suspension culture . Pakistan journal of Biological Sciences 10 (8) : 1236- 1242.

12. Karam , N. S. ; F .M . Jawad ; N. A. Arikat and R.A.Shibli. 2003. Growth and rosmarinic acid accumlatation In callus , cell suspension and root culture of wid *Salvia fruticosa* . plant cell, tissue and organ Culure , 73 :1-121 .

13. Karuppusamy ,S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *In vitro* tissue , organ and cell cultures .Journal of Medicinal plants Research, 3(13): 1222-1239.

14. Khalili ,M.; T.Hasanloo; S-K .Kazemi .2010. Effect of salicylic acid on Antioxidant Activity in milk Thistle Hairy Root Cultures .Journal of Medicinal Plants Vol. 9.No.35.

15. Khanna, R. ,A.K.Mathur and N.K.Mehrotra .2005.Selection of 3-fluorotyrosine tolerant callus line in two cultivars of opium poppy .Vol 88,NO.1.

16. Lee ,K. T;T.Yamakawa ; T,Kodama and Shimomura .1998. Effect of chemicals on alkaloids production by belladonna transformed roots .Phytochemistry ,49,2343- 2347.
17. Lee mr. 2007 . ((Solanaceae IV : *Atropa belladonna* ,Deadly night shade)) (PDF) .J. R .Coll Physicians Edinb. 37 (1) : 77 – 84.
18. Marconi ,P.L. ;L.M. Selten ; E.N.Cslcena ; M.A.Alvarez ; S.I. Pitta-Alvarez .2008.Changes in growth and tropane alkaloids production of hairy roots of *Brugmansia candida* J.Integrative Bio. Sci., 3: 38- 44.
19. Min , J.Y., Jung H.Y., Kang S.M., Kim Y.D., Kang Y.M., Park D.J., Cho M.S. 2007. Production of tropane alkaloids by small- scale bubble column bioreactor cultures of Scopolia parviflora adventitious roots Bioresour . Technol ., 98: 1748- 1753.
20. Murashige ,T.and F. Skoog . 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture .Physiol. Plant ., 15: 437- 497
21. Neumann, K.H.; A. Kumar and J. Imani .2009. Plant Cell and Tissue Culture. A tool in Biotechnology, Basic and Application , Springer .p: 181-225.
22. Park,S. U.; M .R .Uddian; H. Xu; Y. K. Kim and S.Y.Lee .2008.Biotecnoligical applications for rosmarinic acid production in plant .Afr. J. Bio., 7(25):4954 -4965.
23. Pitta –Alvarez , S. I ., T.C. Spollansky, A. M . Giulietti.2000. The Influence of different biotic and abiotic elicitors on production and profile of tropane alkaloids In hairy root cultures of *Brugmansia candida* Enzyme microb . Technol . 26:252-258.
24. Ramawat , K.G. 2004. Plant Biotechnology , Printed in India,pp :50-62.
25. Rothe ,G., Hachiya , A., Yamada Y., Hashimoto T. and Drager B .2003. Alkaloids in plants and roots culture of *Atropa belladonna* over expressing putrescine N-methyltransferase. J. Exp.Bot., 54: 2065-2070.
26. Saker ,M.M. and M.R.Rady ,.1997. Elicitation of tropane alkaloids in suspension culture of Hyoscyamus ,Datura and *Atropa belladonna* by osmotic stress .fitoterapia ,68: 338-342.
27. Sakhanokho ,H.F. and R.Y. Kelley .2009. Influence of Salicylic acid on *in vitro* propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* .African Journal of Biotechnology Vol.8(8) .PP.1474- 1481.
28. Sarin, R., .2005 . Useful metabolites from plant tissue cultures Biotechnology, 4 (2) : 79-93. , University of Rajasthan , Jaipur , India.
29. Taiz ,L and E.Zeiger . 2006. Plant Physiology . Sinauer Associates , Inc. Publishers. Sunderland .
30. Yamada ,Y. and M. Tabada. 1997. Plant biotechnology of tropane alkaloids .Plant Biotecnology .,14,1-10.
31. Zayed, R. and M .Wink . 2004 .Introduction of Tropane Alkaloids Formation In transformed root culture of *Brugmansia Suaveolens* (Solanaceae) . 59 P: 863-867

Influence of salicylic acid and phenylalanine on callus induction and tropane alkaloids production on *Atropa belladonna In vitro*

M.S.Hamad

College of Agriculture,

University of Baghdad.

Abstract

An experiment was conducted in the tissue culture lab . College of Agriculture – University of Baghdad during 2009 - 2010 .Callus induction was achieved by culturing shoot tip of *Atropa belladonna* seedling on MS medium supplemented with 1.5 mg / l of 2,4-D and 0.4 mg / l of BA .Salicylic acid (SA) concentrations that added to MS medium were (0 , 1 , 2 , 3) mg / l and phenylalanine concentrations that added to MS medium were (10 , 20 , 30 , 40) mg / l . MS medium without SA gave the highest values (753.9 , 65.53) mg of both fresh and dry weights of callus, respectively .However values of both parameters were reduced with increasing SA concentration up to 3 mg/l (268.7 ,17.25) mg, respectively .Results indicated that MS medium supplemented with 20 mg/ l of phenylalanine gave the highest values of callus fresh and dry weights (584.2 , 48.84) mg, respectively .MS medium supplemented with (0 , 20) mg / l of SA and phenylalanine gave the highest values (938.2 ,83.25)mg of both fresh and dry weights of callus respectively.MS medium supplemented with {(2,40) ,(1,30) ,(1,20),(2,30)}mg /l of SA and phenylalanine, respectively gave the highest values (108.25 ,380.18,392.04 ,390.94) µg /g dry weight from callus of Atropine , Scopolamine , Tropine ,7-OH-Hyoscyamine, respectively.