دراسة فعالية أنزيم اليوريز داخل الجسم الحي وخارجه في كمية البروتين و إنتاج قلويدات التروبين في نوعي الداتوره *Datura metel linn* و*Datura innoxia mill*

د . كريم طالب الحاتمي

كلية العلوم / جامعة الكوفة

ألخلاصه

أجريت التجربة في كلية العلوم – جامعة الكوفة للفترة من 1/2/2010 ولغاية 1/8/2010 لتحديد فعالية أنزيم اليوريز Urease ومحتوى البروتين في بذور وأوراق نوعي الداتوره ***Datura innoxia*** و ***Datura metel*** وفي أنسجة الكالس (Callus) المستحثة من الأوراق باستخدام وسط MS المجهز بمنظم النمو 2,4-D (2,4- Dichlorophenoxy acetic acid) وال BA (Benzyl adenine) تركيز (1) ملغم / لتر لكل منهما لتحفيز نشوء الكالس .

بينت النتائج وجود انخفاض معنويا في فعالية أنزيم اليوريز في الانسجه المستحثة من أوراق نوعي الداتوره مقارنة بفعاليته في الأوراق والبذور التي أعطت ارتفاعا معنويا في فعالية أنزيم اليوريز وسجل كالس أوراق نوع ***D . innoxia*** اقل فعالية لأنزيم اليوريز في معدل هذه ألصفه وبلغ(0.6) وحده /مل مقارنة بالنوع ***D.metel*** وسجل(0.9)وحده /مل . في حين كانت السيادة لبذور نوعي الداتوره في فعالية الأنزيم المدروس وبلغ (0.52و 0.17) وحده /مل على التوالي ، وكما سجلت أوراق وبذور نوع ***D.innoxia*** تفوقا واضحا في فعالية أنزيم اليوريز مقارنة بأوراق وبذور نوع ***D.metel*** النامية في الحقل وأما بخصوص المحتوى ألبروتيني في الأجزاء ألنباتيه المدروسة فقد سجلت بذور وأوراق و كالس نوع ***D.metel*** تفوقا واضحا في معدل هذه ألصفه وبلغ (3.6 ، 2.5 ، 1.7) ملغم /مل على التوالي مقارنة بمحتواه في كالس نوع ***D.innoxia*** والذي بلغ ((3.2، 2.2 ، 1.2) ملغم /مل ، على التوالي . أما بخصوص محتوى الانسجه والأجزاء ألنباتيه المدروسة من المركبات القلويديه فتشير النتائج إلى ارتفاع معنويا في محتوى الانسجه المستحثة من أوراق نوعي الداتوره من المركبات القلويديه مقارنة بمحتواها في الأوراق والبذور النامية في الظروف ألطبيعيه ، وكانت السيادة لأنسجة نوع ***D.innoxia*** من قلويدات التروبين (الهيوسيامين والهيوسين) مقارنة بمحتواها في نوع ***D.metel*** .

ألمقدمه Introduction

اليوريز (Urea amidohydrolase Ec.3.5.1.5) من الأنزيمات ألمعتمده على النيكل ويحفز التحلل المائي لليوريا(.NH2 CO NH2) في النباتات والفطريات وعدد من الأحياء ألمجهريه إلى مركبي الامونيا والكارباميت . وتكون هذه ألعمليه ألمحفزه أنزيميا أسرع بحوالي عشر مرات في التفاعلات غير ألمحفزه (Friedrich وجماعته ،2005 ؛ Mobley وHausihger, 1999) .

إن الدور الرئيسي لليوريز هو تمكين النبات من استخدام اليوريا الخارجية فضلا عن المتكون داخليا بصوره طبيعيه كمصدر للنتروجين (Goldrij وPolacco ;1999) وينتج أنزيم اليوريز من قبل الكثير من النباتات ألراقيه والأحياء ألمجهريه وله ادوار مختلفة في النبات من خلال مشاركته في العمليات الفسلجيه خلال مراحل نمو وتطور النبات إضافة إلى دوره المميز في إنتاج النبات من مركبات نتروجينيه حيث انه مسؤول عن تحولات النتروجين (Nitrogen transformation) إضافة إلى أهميته في التقانه الاحيائيه والكيمياء ألسريريه وكيمياء المناعة . وبما جنس الداتوره (Datura) من النباتات الطبية المهمة الذي يحتوي على المركبات القلويديه ذات الاستخدام الطبي الواسع كالهيوسيامين (Hyoscyamine) والذي يسمى تجاريا بالا تروبين والهيوسين (Chakravarty, 1976) (Hyoscine ، ألخالدي ،2005) فقد استخدم الهيوسيامين في علاج مرض الربوAsthma ومنبه للجهاز العصبي المركزي Central nervous system(Dale,1996) أما قلويد أل والهيوسين له تأثير مثبط للجهاز العصبي المركزي ويستخدم لعلاج الآلام ألحاده ألناشئه من اضطراب وظائف الجهاز العصبي والتناسلي (Brown و,Tylor 1996 و Narula وآخرون ،2004) . وتوجهت الدراسات ألحاليه إلى استخدام التقنيات الاحيائيه ألحديثه كزراعة الانسجه ألنباتيه في إنتاج واستخلاص المركبات الثانوية التي ينتجها النبات وبشكل واسع نظرا لما تقدمه هذه ألتقنيه المهمة في زيادة إنتاج وتجميع هذه المركبات في الانسجه النباتية النامية خارج الجسم الحي في أوساط غذائية محدده (Hara وآخرون ،1987 و 1995، Stockigt) ووفرت هذه التقنية أمكانية التلاعب بمكونات الوسط الغذائي للانسجه ألنباتيه المستحثة من أجزاء نباتيه مختلفة مما يساعد على تحفيز هذه الانسجه على مضاعفة إنتاج المركبات الثانوية وزيادة تجميعها في خلايا النبات . ونظرا للاهميه الطبية للمركبات القلويديه توجهت التجربة ألحاليه إلى دراسة فعالية أنزيم اليوريز ودوره

في إنتاج وتراكم قلويدات التروبين ومحتواها من البروتينات في الانسجه ألمستحثه خارج الجسم الحي في نبات الداتوره ومقارنتها بفعالية أنزيم اليوريز في بذور وأوراق نبات الداتوره النامي في الظروف ألطبيعيه ودوره في إنتاج قلويدات التروبين في نبات الداتوره .

المواد وطرائق العمل (Materials and Methods)

إعداد أوراق وبذور نوعي الداتوره للاستخلاص والتنقية

جمعت الأوراق والبذور من نوعي الداتوره النامية في الحقل وجففت في الظل في درجة حرارة ألغرفه ثم طحنت باستخدام الخلاط الكهربائي كلا على حده واخذ (5) غرام من مسحوق البذور ومسحوق الأوراق كلا على حده وأضيف إليه 25 ملليتر من فوسفات البوتاسيوم (دارئ الفوسفات) عند رقم هيدروجيني قدره 7.5 (بنسبة 5:1 وزن /حجم) ثم ترك المزيج لمدة 45 دقيقه في حمام ثلجي مع التحريك المغناطيسي ، ثم رشح المزيج باستخدام طبقات عده من الشاش وفصل بجهاز الطرد المركزي لمدة 45 دقيقه وبسرعة 3000 دوره / دقيقه ثم استعمل الرائق (بوصفه مستخلصا خاما) في تقدير الفعالية الانزيميه وتركيز البروتين وحساب كية قلويدات التروبين لحساب الفعالية ألنوعيه .

المنحنى القياسي للامونيا Standard Curve of Ammonia

A- حضرت تراكيز مختلفة من كلوريد الامونيوم تراوحت من (0.1 – 1) مايكرومول/ملليتر بإجراء التخافيف اللازمه للمحلول الخزين (1 مايكرومول/ مل) المحضر سابقا وباستخدام محلول دارئ HEPES (50 mM ، PH 7.5) بحيث يصبح الحجم النهائي 250 مايكروليتر .

B- حضنت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 37 م لمدة 15 دقيقه ثم أضيف 5 ملليتر من الكاشف الذي يحتوي على الفينول الكاشف A : (Phenol nitroprusside) و 5 ملليتر من الكاشف الذي يحتوي على الهايبوكلورات الصوديوم القاعدي الكاشف B : (Alkaline hypochlorite).

C- مزجت المحتويات جيدا ثم ترك المزيج في الحمام المائي بدرجة حرارة 37 م لمدة 20 دقيقه حيث ظهر اللون الأزرق المتدرج حسب تراكيز الامونيا المضافة .

D- حضر كفيء الكواشف (المحلول القياسي الأساس Blank) من 25 مايكروليتر من محلول دارئ HEPES مضاف إليه 5 ملليتر من الكاشف (A) + 5 ملليتر من الكاشف (B) ثم اتبعت الخطوات أنفة الذكر نفسها . (أجريت التجربة بواقع مكررين للمحلول القياسي والتراكيز المختلفة للامونيا) .

E- تم قياس امتصاصية اللون الناتج من التفاعل عند طول موجي 625 نانوميتر باستعمال جهاز المطياف الضوئي ، ثم رسمت العلاقة ألخطيه بين الامتصاص وتركيز الامونيا للحصول على المنحنى القياسي الذي يستدل منه على فعالية أنزيم اليوريزMobley وآخرون،1987 و Weatherburn ،1967)

تقدير فعالية أنزيم اليوريز في العينات المدروسة

1- اخذ 215 مايكروليتر من المحلول الدارئ HEPES و25 مايكروليتر من محلول اليوريا الخزين (500 mM) ووضعت في أنابيب اختبار وتركت في حمام مائي بدرجة حرارة 37 م لمدة ثلاث دقائق .

2- تم إضافة 10 مايكروليتر من المحلول الحاوي على الأنزيم إلى مكونات التفاعل ليصبح الحجم النهائي 250 مايكروليتر وكان التركيز النهائي لليوريا 50 مللي مولار. حضنت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 37 م لمدة 15 دقيقه (زمن التفاعل الذي من خلاله يتم تحلل اليوريا بوجود اليوريز).

3 -أضيف 5 ملليتر من الكاشف (A) و5 ملليتر من الكاشف (B) إلى الأنابيب مع الرج السريع وتركت في حمام مائي بدرجة حرارة 37 م لمدة 20 دقيقه لكي يظهر اللون الأزرق .

4- تم قياس الامتصاص الضوئي للون الناتج من التفاعل عند الطول ألموجي 625 نانوميتر.

5- تم قياس كمية الامونيا المتحررة بالمايكرومول (mM) اعتمادا على المنحنى القياسي لمحلول الامونيا و قدرت الفعالية الانزيميه (وحده / ملليتر) على وفق ألمعادله ألتاليه : (Moncrief و , 1996 Hausinger).

كمية الامونيا (مايكرومول)

الفعالية الانزيميه (وحده / ملليتر) = ----------

$$2 \times 15 \times 0.01$$

حيث يمثل:-

(0.01) من تعريف وحدة الفعالية للأنزيم (Enzyme unite) هي كمية الأنزيم اللازمة لتحويل واحد مايكرومول من اليوريا إلى آمونيا خلال دقيقه واحده وعند درجه حرارة 37 م .

(15) زمن التفاعل (دقيقه) .

(2) كمية الامونيا (مايكرومول/ملليتر) الناتجة عن تحلل اليوريا (Wong وShobe، 1974)

تقدير البروتين Protein assay

استخدمت طريقة براد فورد في تقدير تركيز البروتين (1974, Bradford)

استحثاث أنسجة الكالس Callus tissue culture

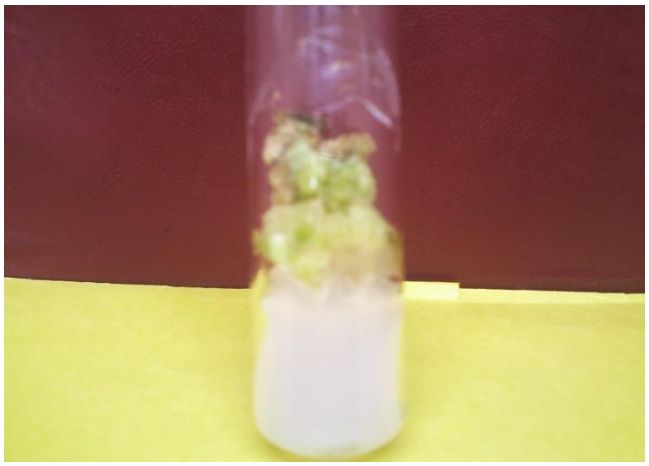
استؤصلت الأوراق من النبات في الصباح الباكر وخلال مدة التزهير لغرض استحثاث أنسجة الكالس منها باستعمال المشارط ألمعقمه ثم جرى غسلها بالماء الجاري ، واعدت للزراعة النسيجيه في الوسط الغذائي الخاص باستحثاث الكالس باستعمال الوسط الغذائي المعروف Murashige و Skoog , 1962 (MS) والمينه مكوناته في الجدول (1) ، إذ وضعت الأوراق في وعاء زجاجي سعة 500 مل وأضيف إليها الكحول الاثيلي بتركيز 70 ٪ مع التحريك المستمر لمدة نصف دقيقه ثم غسلت الأوراق بالماء المقطر ثلاث مرات وبعد ذلك استعملت مادة هايبوكلورات الصوديوم (Sodium hybochloride) NaOCl بتركيز 2٪ لمدة نصف دقيقه مع إضافة مادة Tween 20 كماده ناشره ، ثم غسلت الأوراق بالماء المقطر ثلاث مرات لإزالة أثار ألماده ألمعقمه ، وتم إجراء عملية ألزراعه في ظروف معقمه باستعمال جهاز انسياب الهواء الطبقي (laminar air flow) .

جدول (1) مكونات وسط MS الغذائي

ت	المادة	التركيز ملغم / لتر
1	أملاح MS	قوة كاملة
2	Thiamine – HCL	0.1
3	Pyridoxine – HCL	0.5
4	Nicotinic acid	0.5
5	Glycine	2.0
6	Inositole	100
7	Sucrose	30000
8	Agar	8000

ثم تم تقطيع الأوراق ألمعقمه إلى أجزاء مساحتها 2 سم 2 تقريبا وزرعت في الوسط الغذائي MS في قناني زجاجيه معقمه بحجم 20 سم 3 مضافا إليه منظم النمو 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid)

وال (BA) بتركيز 1 ملغم / لتر لكل منهما وبواقع جزء نباتي واحد لكل قنينة زجاجيه وبمعدل 12 مكررا لكل تركيز وروعي في التقطيع والزراعة أن تجري ألعمليه في ظروف معقمه باستعمال منضدة انسياب الهواء الطبقي وباستعمال الأواني ألزجاجيه والملاقط والمشارط ألمعقمه جيدا باستعمال جهاز أل Autoclave وحضنت الزروعات في ألحاضنه على درجة حرارة 1±25 م° وشدة أضاءه 1000 لوكس لمدة 16 ساعة ، وبعد مرور 15 يوم من زراعة الأجزاء ألورقيه لنباتات النوعين في وسط (MS) تكون كالس في قواعد الأجزاء ألورقيه بلون بني غامق لاحتوائه على اكبر عدد من الكلوروبلاست (Dale،1996) وبعد مرور 45 يوما اكتمل تكون أنسجة الكالس .



شكل (1) **كالس نبات *D.innoxia* المستحث في وسط MS باستخدام 2,4-D تركيز 2 ملغم / لتر وال BA تركيز (1 ملغم/لتر) لكل منهما .**

تقدير فعالية أنزيم اليوريز ومحتوى البروتين في نسيج الكالس

اخذ 5 غرام من نسيج الكالس الطري وسحق في هاون خزفي مع المحلول المنظم Phosphate buffer تركيز 0.2 m و pH 7 وتم ترشيح المزيج باستعمال قطعتين من الشاش الطبي واخذ الراشح وقدرت فعالة اليوريز باستعمال طريقة الخفاجي ، (2007) ألمحوره . وقدرت كمية البروتينات في أنسجة الكالس حسب طريقة (Bradford ،1974) .

تقدير الكميه الكلية لقلويدات التروبين في أوراق وبذور وأنسجة الكالس لنوعي الداتوره .

اتبعت ألطريقه ألمستخدمه من قبل الحاتمي (2006) في تقدير كمية قلويدات التروبين في أوراق وبذور و أنسجة الكالس ألمستحثه من أوراق النوعين كلا على حده ، إذ أن كمية حامض الكبريتيك ألمستعمله في التقدير تكافئ 0.01444 غرام من القلويدات المحسوبة كهيوسيامين في أوراق وبذور نباتات النوعين في حين تكافئ كمية حامض الكبريتيك ألمستعمله مامقداره 0.0057879 غرام من القلويدات المحسوبة كهيوسيامين في أنسجة الكالس .

التحليل الإحصائي

نفذت التجربة وفق التجارب ألعامليه في تصميم القطاعات العشوائية الكاملة بعاملين :-

نوع النبات على مستوى النبات الطبيعي وأنسجة الكالس المستحثة من الأوراق .

واختبرت المتوسطات وفق اقل فرق معنوي (LSD) وعلى مستوى احتمال 5٪ (الراوي وخلف الله ،1980) .

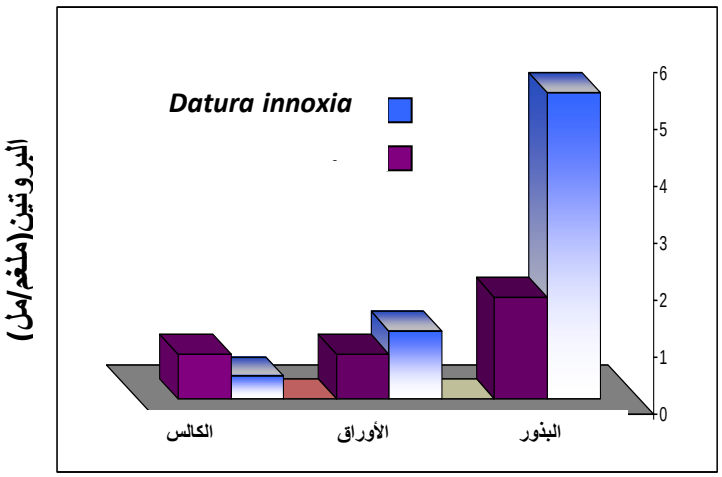
النتائج والمناقشة

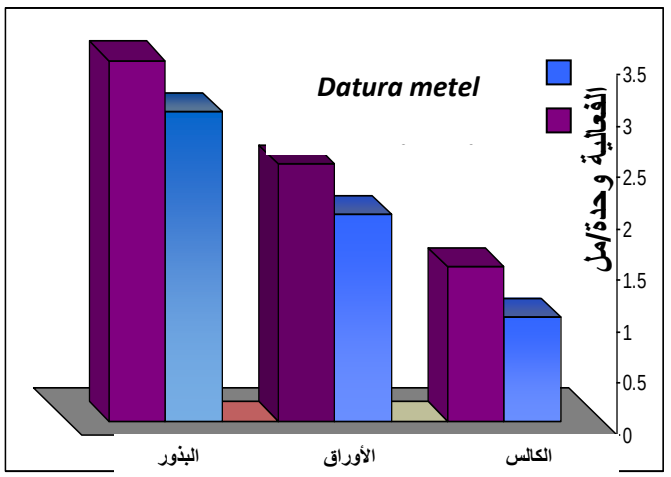
كمية البروتين (ملغم / مل) وفعالية أنزيم اليوريز (وحده/مل) في أنسجة الكالس والبذور والأوراق ألنباتيه

تشير النتائج ألموضحه من خلال الشكل (2) إلى ارتفاع معنوي في كمية البروتين في بذور وأوراق نوعي الداتوره النامية في الظروف ألطبيعيه مقارنة بكميته في أنسجة الكالس ألمستحثه منها وسجل نبات الداتوره

Datura metel تفوقا واضحا في محتواه ألبروتيني في البذور والأوراق وأنسجة الكالس ألمستحثه من الأوراق وبلغ (3.6 ، 2.5 ، 1.7) ملغم/مل مقارنة بنبات ***Datura innoxia*** وبلغ (3.2 ، 2.2 ، 1.2) ملغم/مل مع تفوق بذور نوعي الداتوره في المحتوى ألبروتيني على باقي الأجزاء ألنباتيه .أما بخصوص فعالية أنزيم اليوريز فتبين النتائج ألموضحه في الشكل (3) إلى ارتفاع معنوي في فعالية الأنزيم المدروس في أوراق وبذور نوعي الداتوره مقارنة بفعاليته في أنسجة الكالس المستحثة من أوراقهما وسجلت بذور وأوراق نبات ***Datura innoxia*** (5.6 ، 1.4) وحده/مل على التوالي وتفوقت معنويا على نبات الداتوره ***Datura metel*** الذي سجل (2.2 و1.4) وحده/مل على التوالي . في حين سجل كالس أوراق ***Datura metel*** أكثر فعاليه لأنزيم اليوريز وبلغ (0.9) وحده/مل مقارنة بفعاليته في كالس أوراق***Datura innoxia*** الذي سجل فعاليه لأنزيم اليوريز مقدارها (0.6) وحده/مل .

وتشير الدراسات التي آجراها الباحثين Bensaddek وجماعته(2001) وAfsharqpuar وجماعته (1997) بأنه من خلال انخفاض المحتوى ألبروتيني في أنسجة الكالس قد يعزى إلى انخفاض فعالية أنزيم اليوريز لعدم وجود اليوريا الذي يؤدي إلى انخفاض معدل المركبات النايتروجينيه وانخفاض كمية البروتين فيها . وتتفق هذه النتائج مع النتائج المتحصل عليها من قبل Toivonen وآخرون (2004) إن انخفاض إنتاج قلويدات الاندوليه في الجذور الشعرية نبات عين البزون النامية في أوساط غذائية مجهزه بتراكيز عاليه من KNO3 و Na2HPO4 وقد يعود السبب في ذلك إلى عمل أنزيم اليوريز على استحثاث نقط الإنبات في بذور النباتات ويقوم بنقل النتروجين من مركبات اليوريد مثل الالانتونين وحامض الالانتويك واستخدامه في بناء البروتين في خلايا النبات النشط على حساب بناء المركبات القلويديه الاساسيه فيها





شكل(2) كمية البروتين (ملغم / مل) في أنسجة الكالس والبذور والأوراق لنوعي الداتوره

شكل(3) فعالية أنزيم اليوريز (وحدة / مل) في أنسجة الكالس والبذور والأوراق لنوعي الداتوره

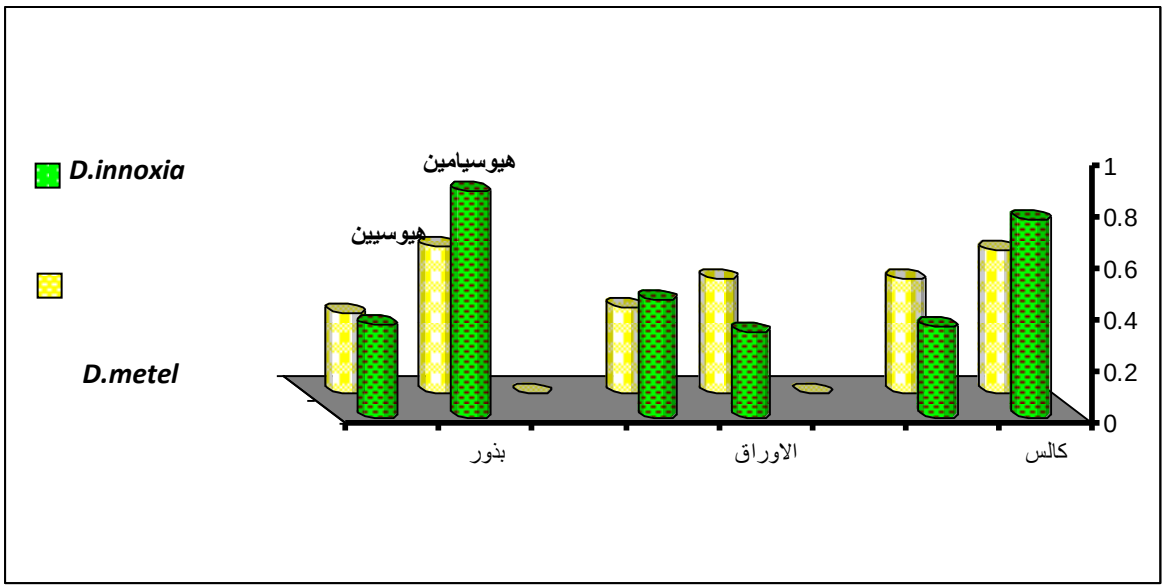
2 - كمية قلويدات التروبين (ملغم / غرام وزن جاف) في أنسجة الكالس والبذور والأوراق ألنباتيه

تشير النتائج ألموضحه في الشكل (4) إلى ارتفاع معنويا في محتوى الانسجه المستحثة من أوراق نوعي الداتوره من المركبات القلويديه مقارنة بمحتواها في الأوراق والبذور النامية في الظروف ألطبيعيه ، وكانت السيادة لأنسجة كالس ***D.innoxia*** من قلويدات التروبين (الهيوسيامين والهيوسين) وبلغت (0.81 و0.41) ملغم/غرام وزن جاف على التوالي مقارنة بمحتواها في أنسجة كالس النوع ***D.metel*** وبلغ (0.64 و 0.58) ملغم/غرام وزن جاف(الهيوسيامين والهيوسين) على التوالي . في حين سجلت وأوراق وبذور نوع ***D.metel*** تفوقا معنويا واضحا في محتواها من قلويدات التروبين وبلغت في الأوراق(0.46 و 0.42) ملغم/غرام وزن جاف كهيوسيامين وهيوسين على التوالي و في البذور(0.76 و 0.45) ملغم/غرام وزن جاف كهيوسيامين وهيوسين على التوالي . أما نبات ***D.innoxia*** فان محتواه من قلويدات التروبين (الهيوسيامين والهيوسين) وبلغت في الأوراق (0,55 و0.42) ملغم/غرام وزن جاف على التوالي وبلغت في البذور (0,86 و0.37)

ملغم/غرام وزن جاف على التوالي . ومن خلال النتائج ألموضحه أعلاه يتبين تفوق النوع ***D.innoxia*** و ***D.metel*** في محتواها من المركبات القلويديه الاساسيه في أنسجة الكالس ألمستحثه من الأوراق مع انخفاضا واضحا بمحتوى البروتين وفعالية أنزيم اليوريز في حين حصل العكس في نتائج البذور والأوراق الذي انخفض محتواها من المركبات القلويديه الاساسيه وارتفعا واضحا بمحتوى البروتين وفعالية أنزيم اليوريز، وهذا يفسر ارتفاع كمية أنزيم اليوريز في بذور نباتات الداتوره الذي يعمل على تحويل اليوريا إلى آمونيا وكاراميت التي من شانها إن تثبط إنتاج المركبات القلويديه في الأجزاء ألنباتيه النامية خارج الجسم الحي . أما انخفاض محتوى أنسجة الكالس من أنزيم اليوريز لعدم وجود اليوريا في وسط نمو الكالس وبذلك لاتزداد نسبة الامونيا والكارماميت في الأنسجة النامية في وسط النمو و يرتفع معدل إنتاج المركبات القلويديه لعدم تأثر عملية التخليق الحيوي لها .ولقد أشار Zenk وآخرون (1977) إلى أن إضافة KNO3 و NH4NO3 إلى وسط نمو النباتات يثبط إنتاج العديد من المركبات ومنها المركبات القلويديه بنسبة 80٪ وبذلك يمكن أن يستنتج بأنه من خلال انخفاض المحتوى ألبروتيني في أنسجة الكالس قد يعزى إلى انخفاض فعالية أنزيم اليوريز لعدم وجود اليوريا الذي يؤدي إلى انخفاض معدل المركبات النايتروجينيه وانخفاض كمية البروتين فيها . وتتفق هذه النتائج مع النتائج المتحصل عليها من قبل Toivonen وآخرون (2004) ارتفاع إنتاج قلويدات الاندوليه في الجذور الشعرية نبات عين البزون النامية في أوساط غذائية مجهزه بتراكيز عاليه من KNO3 و Na2HPO4 .

وقد يعود السبب في ذلك إلى عمل أنزيم اليوريز على استحثاث نقط الإنبات في بذور النباتات ويقوم بنقل النتروجين من مركبات اليوريد مثل الالانتونين وحامض الالانتويك واستخدامه في بناء البروتين في خلايا النبات النشط على حساب بناء المركبات القلويديه الاساسيه فيها . وفقدان فعالية أنزيم اليوريز تعتمد على تراكم المركبات الفينوليه والتي يمكنها أن تحتل مجاميع SH الأنزيم (Cifuentes وآخرون ، 1981) . وقد أشار (Lea ,1999) بان الو ضيفه الاساسيه لأنزيم اليوريز هو تمثيل اليوريا المتكونة في بداية نمو النبات كنتيجة لتحلل الحامض الاميني الارجنين Arginine إلى اورنثين Orinthine بواسطة أنزيم Arginase الذي يعمل بشكل تناسقي مع اليوريز الذي يحفز تحلل اليوريا إلى آمونيا و CO2 وهذا يفسر تواجد أنزيم اليوريز في الأجزاء ألنباتيه النشطة كالأوراق ألنباتيه وبذلك تقل عملية التخليق الحيوي للمركبات القلويديه في النباتات النامية في الحقل مقرنة بكميتها في أنسجة الكالس المستحثة منها .

ومن خلال نتائج هذه التجربة توضحت الاهميه لزراعة الانسجه ألنباتيه في مجال إنتاج ومضاعفة تجميع مركبات الايض الثانوي في الانسجه والخلايا النامية خارج الجسم الحي عن طريق دراسة نشاط الأنزيمات التي تساهم بشكل أساسي في عملية التخليق الحيوي لهذه المركبات و يستنتج من هذه التجربة نجاح تقنية زراعة الانسجه ألنباتيه في مجال إنتاج وتراكم مركبات الايض الثانوي واحتفاظ الانسجه المزروعة خارج الجسم الحي بفعاليتها الانزيميه وزيادة عملية التخليق الحيوي للمركبات الاساسيه فيها مع انخفاض نشاط أنزيم اليوريز في أنسجة الكالس وزيادة تمثيل المركبات النتروجينيه في الأوساط الغذائية إلى الأحماض الامينيه ألمنشئه للمركبات القلويديه الاساسيه في نباتات الداتوره .



شكل (4) كمية قلويدات التروبين ملغم/ غم وزن جاف في الأجزاء النباتية المدروسة

المصادر

الحاتمي ،كريم طالب (2006) . دراسة مقارنه لإنتاج قلويدات التروبين داخل وخارج الجسم الحي في نوعي الداتوره .linn ***Datura metel*** و.mill ***Datura innoxia*** ، أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم – جامعة بابل .

الراوي ، علي وجاكره فارتي (1988) . النباتات الطبية في العراق . وزارة ألزراعه والري – الهيئة ألعامه للبحوث ألزراعيه والموارد المائية ، ص 2- 8 .

الدجوي ، علي (1996). موسوعة النباتات الطبية والعطرية ، مكتبة مدبولي ، ألقاهره .

ألخالدي ، مؤيد صبري شوكت (2005) . إنتاج بعض القلويدات من نوعي نبات الداتوره ***Datura stramonium*** و ***Datura innoxia*** باستعمال تقنية زراعة الانسجه **الجزء النباتي** أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة ألنباتيه ، بغداد .

الخفاجي، محمد عبد الله جبر (2007) . تنقية وتوصيف أنزيم اليوريز الحر المستخلص من بذور نبات الحنظل كمصدر جديد . مجلة جامعة كربلاء . 5 (3) : 1- 14 .

الراوي ، خاشع محمود وعبد العزيز خلف الله (1980) . تصميم وتحليل التجارب ألزراعيه ، دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل . العراق .

خلاصي ، حسام الدين (2004) . نشره علميه ، كلية ألزراعه – جامعة حلب ، ص 12 .

●**Afsharypuar,S.; Mostajerna,A.; Shaneh-Ssz ,A.(1997**). Effect of Urea Fertilizer on the Weight of Different parts of Datura Stramonium and their Alkaloidal contents at Different Developmental Stages ; pharmacy and pharmaceutical Sciences , Isfhan University , I.R. Iran.

● **Brown ,G.H. and Tylor (1996) .** Muscarinic Receptor Agonisis and Antagonisms: In Hardman ,J.G. Limbird , LE(eds) Goodman and Gilmans : The Pharmacological Basis of Therapeutically , Jth Edition , New York : MC Growhill Inc ;pp . 141-160 .

●**Bradford , M.M.(1996) .** A rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilization the principle of protein –dye binding . Bio chem ., 72:248-254.

●**Bensaddek' L' , Gillet , F. , Saucedo, J . and Fliniaux**, **M-A . (2001)** . The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of ***Atropa belladonna*** hairy roots **. *J. Bio, 85, : 35-40***

● **Dale , J.; W.F., Campbell .(1981)**. Response of tomato plant to stress temperature : increase in abscisic acid concentration . Plant Physiol . 67:29.

●**Friedrich, A.W.; Kock ,R.;Bielaszewka, M.;Zhang, Karch,H. and Mathys,W.(2005).** Distribution of the urease gene cluster among and urease activities of entevothemorrhagic ***Escherichia coli*** **O127** isolated from humans. Journal of clinical microbiology , 43(2):546-550.

●**Goldraij, H.L.T. and Polacco,J.C.(1999).** Arginase is inoperative in complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean . plant physiology , 132:1801-1810.

● **Hara, Y.; Morimoto , T. and Fujta, Y.(1987) .** Production of shikonin devastative by cell suspension culture . Plant rep. 6:8-11.

● **Narula , A.; Kumar, S.; Pande, D.; Rajam, M.;Srivastava , P.(2004).** Agrobacterium – mediated transfer of Arginine decarboxylase and Orinthine decarboxylase gene to Datura innoxia enhances shoot regeneration and Hyoscyamine biosynthesis . J. Plant Biochemistry and Biotechnology , 13:127-130.

● **Mobley ,H.L.T. and Hausinger , R.P.(1989).** Microbial urease significance , regulation and molecular characterization microbial . Rev, 53(1):85-108.

● **Mobley ,H.L.T.; J0nes , B.D. and Penner , J.L.(1987).** Urease activity of protein penneri.J, microbial ,25(2):2302-2303.

● **Moncrief , M.B.C. and Hausinger , R.P.(1996).** Purification and activation properties of Uref-UreD-Ureaser apportion completes. J. Bacterial ., 178(18):5417-5421.

● **Lea,P.(1999) .** Primary nitrogen metabolism . In P.M. Dey and J.B. Harborne (eds) Plant Biochemistry . Academic press , London , Harcout, Brace and Company , Publishers, PP;273-306 .

● **Weatherburn,M.W.(1967).** Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia . Analytical Biochemistry, 34(8)71-947.

● **Wong , B.L. and Shobe , C.R.(1974).** Single-step purification of urease by affinity chromatography .Can.J.Microbil , 20: 623-630 .

● **Zenk,M.H,El-Shagi,H., Arens.H,Stockigt.J,Wellr,E.W. and Deus,B.(1977).** Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and ajmalicine in cell suspenstion culture of ***Catharanthus roseus*** . New York , pp. 27-43.

● **Toivonen, L., Ojala, M. and Kauppinen, V. (1991)** Studies on the optimization of growth and indole alkaloid production by hairy root cultures of ***Catharanthus roseus.***Biotechnology and Bioengineering, 37: 673–680. do: 10.1002/bit.260370709

Study of Urease Enzyme Activity *in vivo* and *in vitro* on Tropan Alkaloids production in *Datura metel* linn and *Datura innoxia* mill

Abstract

An experiment was conducted to determine the activity of Urease enzyme *in vivo* and ***in vitro*** in Leaves , Seeds of ***Datura metel*** linn and ***Datura innoxia*** mill and in leaves callus induced from leaves by using MS medium supplemented with 2,4-D and BA at concentrations of 1 mg/L each and to compare activity of Urease between callus, leaves and seeds in mother plant. Result revealed that there were an decrease the activity **of** Urease enzyme in callus induced from leaves compare with the activity of these enzymes in leaves and seeds in parent plant .Result also showed the

superiority of ***Datura innoxia*** on ***Datura metel*** in leaves and seeds Urease enzyme activity **. T**he data illustrated that the superiority of ***Datura metel*** leaves callus on leaves callus of ***Datura innoxia*** Urease enzyme activity .Also, the alkaloids content were decrease with an increase in enzyme activity in leaves and seeds of tow type of ***Datura*** , and **t**he data showed that increase of alkaloids content in callus induced from leaves and illustrated that the superiority of ***Datura innoxia*** on ***Datura metel*** in alkaloids content .