----- مجلة علوم الرافدين، المجلد 17، العدد 11، خاص بعلوم الحياة، ص80-93، 2006-----

التنقية الجزئية لأنزيم الكلوتاميت ديهايدروجينيز من كالس سيقان نبات الحبة السوداء (*Nigella sativa* L.) بوجود 2,4- D أو PDA

عبد المطلب سيد محمد نهال عزت جمعة

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2006/5/14 ، تاريخ القبول 2006/9/4)

الملخص

شملت الدراسة استحداث ونمو كالس سيقان نبات الحبة السوداء على وسط موراشيج وسكوك (MS) الصلب المضاف إليه 6- 1010 10 مولار من حامض 4،2- ثنائي كلوروفينوكسي حامض الخليك (2,4-D) أو 6- 1010 10 مولار من حامض بنتادايونويك (PDA) ودراسة عزل وقياس فعالية أنزيم كلوتاميت ديهايدروجينيز (GDH) من الكالس المستحدث على الوسط الغذائي فضلاً عن مقارنة فعاليته بوجود المنظم القياسي 2,4-D أو PDA المحضر مختبرياً. 1010 وبلغ الوزن الطري للكالس النامي على وسط MS الصلب المضاف اليه 2,4-D بمقدار5.72 غراماً مقارنة بمقدار 2.81 غراماً بوجود PDA بعد 45 يوماً من الزراعة. وبلغت الكمية الكلية للبروتين من الكالس النامي على الوسط المضاف إليه 2,4-D أو PDA مقدار1.050 و1.116 ملي غرام /غرام وزن طري على التوالي.

ووجد أن الفعالية النوعية لأنزيم GDH ازدادت بعد كل خطوة من خطوات التنقية وبلغ عدد مرات التنقية 23 مرة وكذلك بعد تحديد الظروف المثالية لفعاليته. وتطلب ذلك استخدام المحلول المنظم Tris-HCl بتركيز 100 ملي مولار وبدالة حامضية 8.6 و 30 مايكرومولار من حامض الكلوتاميك ومايكرومولار واحد من نيكوتين اميد ادنين ثنائي النيوكليوتيد (NAD) و20 مايكروغرام من الأنزيم وبدرجة حرارة 35 °م. وبلغت قيمة ثابت ميكيلس – منتن (Km) للكلوتاميت مقدار 27 مايكرومولار باستخدام رسم لاينويفر- بيرك.

وأشارت النتائج إلى أن الفعالية النوعية لأنزيم GDH المستخلص من كالس نبات الحبة السوداء النامي على الوسط الغذائي المضاف إليه 2,4-D أو PDA بلغت مقدار 21.3 و22.3 مايكرومولار / دقيقة/ ملي غرام بروتين على التوالي وبالظروف المثالية. ووجد كذلك أن قيمة الوزن الجزيئي التقريبي باستخدام الترشيح الهلامي مقدار 302000 دالتون.

وأعتماداً على نتائج هذه الدراسة يمكن القول إن مركب PDA يمكن أن يستخدم بدلاًعن 2,4-D في تقانة زراعة الأنسجة النباتية للحبة السوداء وإنه عمل بصورة مشابهة إلى حد ما لعمل الأوكسينات القياسية المصنعة. ويمكن أن يعد على أنه أوكسين محضر مختبرياً ويمكن استخدامه في أنظمة زراعة الأنسجة النباتية للعديد من النباتات.

Partial Purification of Glutamate Dehydrogenase from the Callus of Stems of (*Nigella sativa* L.) in the Presence of 2,4- D or PDA

Abid Mutalib S. Mohammad **Nihal E. Jumma**

Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The study included initiation and growth of callus from stem *Nigella sativa* L. using Murashige and Skoog (MS) medium containing 10-6 1010 molar 2,4 -dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) or pentadienoic acid (PDA). Glutamate dehydrogenase (GDH) was partially isolated from the initiated callus on the nutrient medium containing variable concentrations of potassium and ammonium nitrates. In addition, a comparative study of the enzyme activity was performed in the presence of 2,4-D or PDA.

The results revealed that best medium for initiation and growth of callus was obtained in the presence of 10-6 M of 2,4-D or PDA. The fresh weight of the callus grown on MS medium in the presence of 2,4-D or PDA was 5.72 gm and 2.81 gm respectively after 45 days of culturing. However, the protein content of the callus was 1.050 and 1.116 mg / gm fresh weight grown on media containing 2,4 –D or PDA, respectively.

The results also predicted that the specific activity of GDH was increased by 23 folds after partial purification. The optimum conditions for GDH activity were obtained using: 100 mmole of Tris – HCl buffer, at 35º, pH of 8.6, 1 µmole of NAD, 20 µg of protein as a source for the enzyme and 30 µmole of glutamate as a substrate. Using Linweaver – Burk plot, the value of Michaelis – Menten constant (km) was 27 µmole. The results also revealed that the specific activity of GDH isolated from the callus where 2,4–D or PDA was added is 21.3 and 22.3 µmole / min / mg protein, respectively using the optimum conditions.

The comparative molecular weight of GDH was determined using gel filtration chromatography and found to be in the range of 302000 dalton.

Based on the results from the current study it was concluded that PDA could be used instead of 2,4-D in plant tissue culture of *Nigella sativa* L. Its action is similar somehow to the standard auxin. Therefore, PDA could be considered as a synthetic auxin and used in plant tissue culture for several plants.

المقدمة

يعد أنزيم الكلوتاميت ديهايدروجنيز (GDH) (EC.1.4.1.2) من الأنزيمـات المهمـة فـي ايـض الاحماض الامينية لمعظم الكائنات الحية (Smith et al., 1975). أو انه يعد ارتباط بين دورة كربس وبناء الاحماض الامينية، (Sukalovic, 1990). ويعمل الأنزيم بوجود المرافق الأنزيمي (NAD) أو (NADP) في عملية إزالة مجموعة الأمين من الحامض الاميني الكلوتاميـت وتكـوين الحـامض الكيتـوني الفـا كيتوكلوتاريت (Sanwal and Lata, 1961). ودرس الأنزيم في خلايا الابتدائيات وفي خلايـا الجـرذان وكبد الأبقار واللبائن (Arnold and Maier, 1971)، كما تم عزله من مناطق مختلفة لأجـزاء النباتـات المختلفة مثل البذور والجذور والأوراق ومن سويداء الذرة الصفراء (Sukalovic, 1990) ومـن زهـرة عباد الشمس (Errel et al., 1973)، ومن جذور نبات الفستق (Fowler et al., 1974)، كذلك من جـذور نبات الرز (Kanamori et al., 1972) كما تم عزله من فطر العرهون (Baars et al., 1995). ولاتوجد دراسات لفعالية هذا الانزيم على كالس النباتات.

تشير الأبحاث والدراسات المتوفرة إلى آلية عمل منظمات النمو القياسية و بيان دورها فـي نـشاط الخلية الحية من خلال السيطرة على تنظيم البناء الحيوي للـحامض النووي (DNA) وتخليق الأنزيمـات والتفـاعلات الايـضية المختلفـة داخـل الخليـة (الكنـاني، 1987)، (Street, 1977). يعـد مركـب 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) بوصفه أوكسين مصنع يستخدم في العديد من المـزارع النسيجية لمختلف النباتات ويعمل بصورة أساسية على زيادة في ليونة الجدر الخلوية واتساع الخلايا وبذلك تكون قادرة علـى الانقـسام بـصورة أسـرع سـواء فـي اسـتحداث الكـالس والمـزارع الخلويـة (Kamo, 1987; Poli et al.,1989)، وتم تحضير منظم نمو جديد محلياً من نوع الاوكسينات المـصنعة PDA (Pentadienoic acid) وقدم المركب لأول مرة سنة 1997 (Mohammad et al., 1997)، وأثبت دوراً رئيساً في استحداث الكالس لنبات زهرة الشمس ونبات الخس عوضاً عن استخدام الاوكسينات فـي الوسط الغذائي المعد لهذا الغرض (بواص ومحمد، 1999a، 1999 b؛ بواص، 1998).

يهدف البحث على تحديد مميزات أنزيم GDH المستخلص من كالس سيقان نبـات حبـة الـسوداء المستحدث على الوسط الغذائي الحاوي على منظم النمو المصنع (2,4-D) والحاوي علـى مـنظم النمـو (PDA) المحضر مختبرياً لغرض إثبات كفاءته باستخدامه كأوكسين عوضاً عن الأوكـسينات المـصنعة القياسية.

المواد وطرائق العمل

إستحداث الكالس وتنميته:

أستخدمت بذور الحبة السوداء (*Nigella sativa L.*). عقمت البذور قبل زراعتها في الوسط الغذائي وذلك بغمرها بالكحول الاثيلي (96%) لمدة دقيقتين متبوعا بغمرها في محلول القاصر التجاري (Sodium hypochlorite, NaOCl) المخفف بنسبة (2:1، قاصر: ماء) ولمدة (4-5) دقائق (البكر، 2002). وغسلت البذور جيداً بالماء المقطر المعقم لسبع مرات لإزالة اثار المادة المعقمة. وأستخدم وسط (Arnon and Hoagland) لزراعة البذور وتنمية البادرات (Arnon and Hoagland, 1940; 1944). واستخدمت قطع من سوق نبات الحبة السوداء السليمة بعمر (25-30) يوما وبطول 1سم تقريبا زرعت هذه القطع في قنانٍ حاوية 25 سم3 من وسط MS المضاف إليه 2,4-D أو PDA بتركيز 6-10 مولار للأستحداث الكالس وبعدها تم تحديث الوزن الطري له.

استخلاص وتنقية وقياس فعالية أنزيم GDH:

أستخدم كالس السيقان النامي على الوسط الغذائي القياسي الحاوي على 6-10 مولار من 2,4-D أو 6-10 مولار من PDA وبعمر 35 يوماً من النمو. وسحق مقدار 15 غم في هاون خزفي مبرد وبوجود 20 سم3 من محلول الاستخلاص الحاوي على 50 مايكرومول من المحلول المنظم (Tris-HCl) وبوجود (1mM) من مادة اثلين ثنائي الامين رباعي حامض الخليك (EDTA) ومركب (KCl) بتركيز (0.4) مولار وبدالة حامضية بمقدار 7.6 (Higa et al., 1979, Sukalovic, 1990)، وأكمل سحق المستخلص خلايا الكالس باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية بتسليط 20000 ذبذبة/ثانية ولمدة نصف دقيقة ولعدة مرات اعقبه. نبذ المزيج بعد ذلك باستخدام جهاز النبذ المركزي المبرد وبسرعة (3000 X g) ولمدة 30 دقيقة لغرض عزل المواد البروتينية بوصفها مصدراً للأنزيم. وأستخدم الرائق بعد عملية الترسيب لقياس الفعالية وكمية البروتين فضلاً عن تنقيته بطريقة الترشيح الهلامي وعدُ هذا المستخلص الخام للأنزيم. تم قياس فعالية الأنزيم بمقدار الزيادة في الامتصاص الضوئي لمحلول التفاعل عند الطول الموجي 340 نانوميتر اعتمادا على طريقة الباحثين (Higa et al., 1979, Sukalovic, 1990) وأستخدم الاسيتون البارد في عملية عزل وترسيب البروتينات من المستخلص المائي الخام لخلايا الحبة السوداء. أخذ الراسب وجفف بجهاز التجفيف بالتجميد (Lyophilizer) لجعله على شكل مسحوق استخدم الهلام نوع G-200 Sephadex لفصل الأنزيم ثم تقدير الوزن الجزيئي باستخدام طريقة الترشيح الهلامي (Andrews, 1964).

النتائج والمناقشة

تكوين مزارع الكالس وتقدير وزنه الطري:

أظهرت قطع سيقان بادرات الحبة السوداء استجابتها لاستحداث الكالس في وسط MS المضاف إليه 2,4-D بصورة تفوق استحداثه بذلك المضاف إليه PDA. حفز إضافة مركب PDA في الوسط الغـذائي بدرجة قليلة نمو الكالس مقارنة بذلك النامي على وسط MS المضاف إليه (2,4-D) اعتمادا علـى وزنـه الطري. ربما يعزى هذا التباين إلى أن مركب PDA حفز بدرجة قليلة نمو الكالس وخاصة في فترة النمو الأولية (35 يوما). وربما باستمرار النمو أو بوجود منظمات نمو أخرى تؤدي إلى تحفيز جيد للكالس كما هو الحال في زراعة أنسجة نبات الخس (بولص، 1998). هذا من جهة ومن جهة أخـرى فـان كميـة البروتين للكالس النامي على الوسط المضاف إليه PDA أو 2,4-D بلغت مقدار 1.116ملغـم/غـم وزن طري و1.050 ملغم/غم وزن طري على التوالي (الجدول 1). وهذا يؤكد كفـاءة PDA الـذي يعمل بصورة مشابهة إلى حد ما عمل الاوكسين اعتمادا على الوزن الطري ومحتـوى البـروتين, إذ أن الزيادة في الوزن الطري تعود إلى زيادة قابلية امتصاص الماء والمواد الغذائية اعتمـادا علـى الأوزان الجزيئية (Bayliss et al.,1979)، او احتمال أن مركب PDA يعمل بوصفه منشطاً لزيادة تحرير ايونات الهيدروجين وبوجود منظمات نمو أخرى، فضلا عن ليونة الجدران الخلوية التي يترتب عنها زيادة فـي النمو(Wareing and Phillips, 1978).

الجدول 1: معدلات الاوزان الطرية (بالغرام) وكمية البروتين الكلية (ملغم/غم وزن طري) لكالس سيقان نبات الحبة السوداء. كل قيمة تمثل معدل عشر مكررات.

وسط MS المضاف اليه	فترة النمو (يوم)			
	الوزن الطري (غم) (±الخطأ القياسي)		كمية البروتين الكلية ملغم/غم وزن طري (±الخطأ القياسي)	
	30	45	30	45
2,4-D بتركيز 6-10 مولار	3.651 ±0.081	5.72 ±0.031	0.560 ±0.013	1.050 ±0.002
PDA بتركيز 6-10 مولار	1.410 ±0.120	2.81 ±0.113	0.465 ±0.022	1.116 ±0.022

الفعالية النوعية لأنزيم GDH:

حددت فعالية أنزيم GDH في الأجزاء المختلفة لمستخلص كالس نبات الحبة السوداء وأستخدم الرائق من مستخلص الكالس النامي في الوسط الغذائي المضاف إليه2,4-D أوPDA بتركيز 6-10 مولار لقياس فعالية أنزيم GDH لأنها أظهرت أعلى فعالية في هذا الجزء (الجدول 2)، وهذا يعد مؤشراً على وجود الأنزيم الحر في السايتوبلازم وغير مرتبط بالاغشية الخلوية.

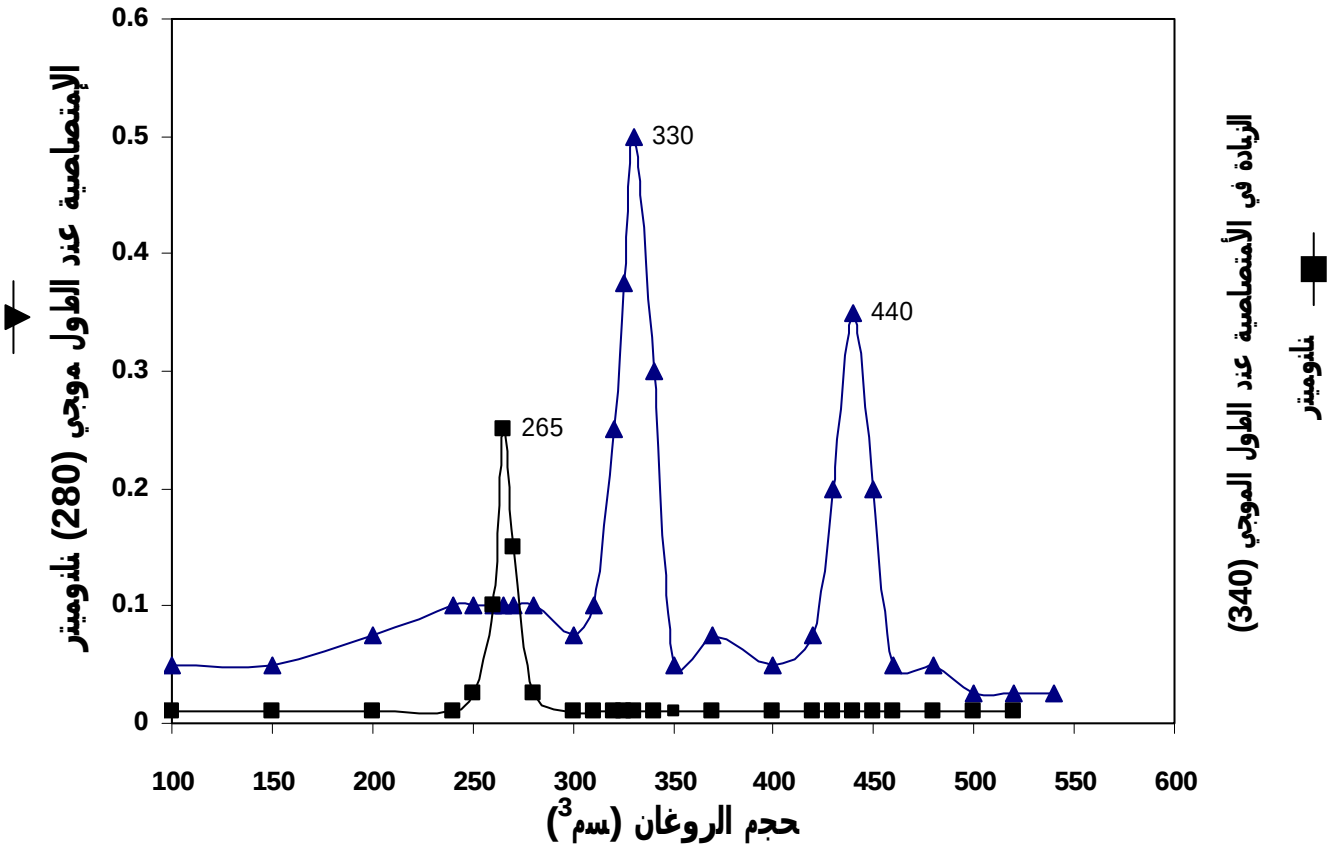
الجدول 2: وجود أنزيم GDH وفعاليته في الأجزاء المختلفة لمستخلص كالس سيقان نبات الحبة السوداء النامي على الوسط القياسي. كل قيمة تمثل (3) قراءات.

أجزاء مستخلص الكالس	الزيادة بالامتصاصية بطول موجي 340 نانوميتر/دقيقة	الفعالية +U/سم3
المجنس	0.20	32.2
الرائق	0.21	33.8
الراسب	0.01	1.6

*حددت فعالية الأنزيم في حجم نهائي (1) سم3 يحتوي على مقدار (50) ملي مولار من المحلول المنظم (Tris-HCl) بدالة حامضية (pH 8.6) و(20) مايكرومول من حامض الكلوتامك و(1) مايكرومول من مركب (NAD). وحضن محلول التفاعل لمدة (5) دقائق وبدرجة (30) درجة مئوية وحفز التفاعل بإضافة مقدار (0.05) سم3 من المستخلص الأنزيمي.

+U: كمية الأنزيم التي تعمل على تكوين مايكرومول واحد من الناتج في الدقيقة الواحدة.

أظهرت النتائج أن روغان راسب الأسيتون لمستخلص كالس نبات الحبة السوداء أعطى حزمتين رئيسيتين بعد إمراره على عمود الفصل ذي الأبعاد (2.5 X 100) سم والحاوي على مادة الهلام (Sephadex G-200). وان قمم هذه الحزم ذات روغان 330 سم3 و440سم3 على التوالي (الشكل1) ووجد أن الحزمتين لا تظهران أية فعالية لأنزيم GDH بقياس الامتصاصية عند الطول الموجي 340 نانوميتر مقارنة بفعالية عالية نسبيا في الأجزاء 50 إلى 55 وبحجم روغان بمقدار 265 سم3 (الشكل 1) لذلك عدت الحزمة البروتينية المفصولة من الأجزاء 50-55 هي مصدر لأنزيم GDH واستخدمت في الدراسات اللاحقة.



الشكل 1 : روغان المحلول البروتيني الناتج من الترشيح الهلامي بامراره في عمود الفصل ذي الأبعاد (100 X 2.5) سم والحاوي على مادة الهلام (Sephadex G-200).

وتشيرالنتائج (الجدول 3) الى أن الفعالية النوعية لأنزيم GDH المستخلص من كالس نبـات الحبـة السوداء ازدادت بمقدار 23 مرة عن تلك القيمة في المـستخلص الخـام بواسـطة الترشـيح الهلامـي (Sephadex G-200).

الجدول 3: مراحل التنقية الجزيئية لأنزيم كلوتاميت ديهايدروجينز المستخلص من كالس سـيقان نبـات الحبة السوداء النامي على الوسط القياسي. كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات.

الأجزاء	تركيز البروتين (ملغم/سم3)	الحجم سم3	T.P ملغم	*الفعالية U+/ سم3	T.A U+	**الفعالية النوعية U+/ملغم.بروتين	نسبة الاستعادة %	عدد مرات التنقية
المجنس الخام	2.2 ±0.031	27	59.4	32.2	869	14.6 ±0.031	100	1
الرائق	1.9 ± 0.020	25	47.5	33.8	845	17.8 ± 0.110	97	1.1
الراسب بالأسيتون	2.9 ± 0.041	10	29	60	600	20.7 ± 0.009	69	1.4
الترشيح الهلامي	0.11 ± 0.051	10	1.1	37	370	336 ± 0.106	43	23

(U+) الوحدة الأنزيمية: كمية الأنزيم التي تعمل على تكوين مايكروموول واحد من النـاتج فـي الدقيقـة الواحدة.

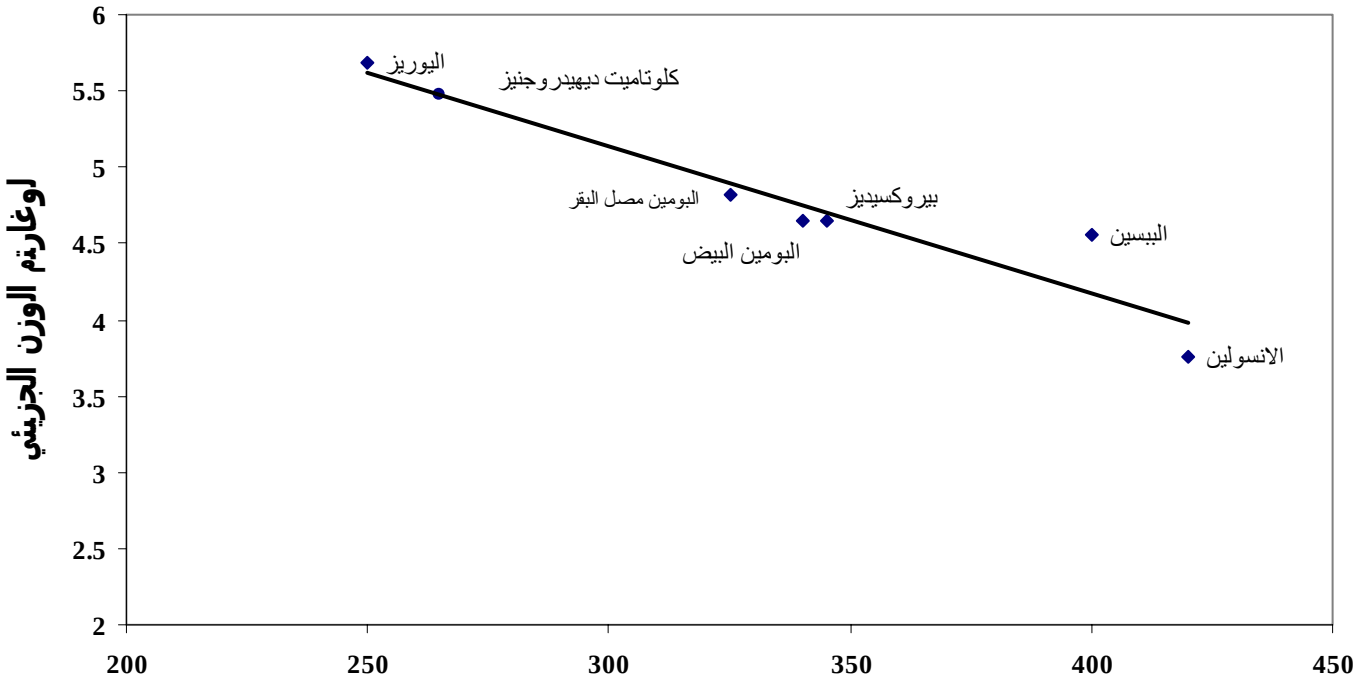
* الفعاليـة: عـدد وحـدات الأنـزيم الموجـودة فـي واحـد سـم3 مـن المحلـول البروتينـي.

** الفعالية النوعية: كمية الأنزيم التي تعمل على تكوين مايكروموول واحد من الناتج لكل دقيقة لكل ملغرام بروتين.

T.P البروتينات الكلية T.A الفعالية الكلية

تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم GDH:

قدر الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم GDH حسب طريقة الباحث (Andrews, 1964) باستخدام تقنية الترشيح الهلامي. ووجد بان الوزن الجزيئي له مقارباً إلى (302000) دالتون. وهو مقارب لوزنه عنـد عزله من العرهون (Baars et al., 1995)، واقل من وزنه عند عزله من الابتـدائيات مقارنـة بـالوزن الجزيئي في أنواع نباتية أخرى(Stone et al., 1979; Higa et al., 1979).



الشكل 2 : المنحني القياسي لر الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم الكلوتاميت ديهايدروجنيز المفصول بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الأبعاد (100 X2.5) سم والحاوي على مادة الهلام من نوع (Sephadex G-200) .

دراسة بعض العوامل المؤثرة في فعالية أنزيم GDH:

تأثير درجة الحرارة:

اوضحت النتائج (الجدول 4) أن زيادة درجة الحرارة أدت إلى زيادة في فعالية أنزيم (GDH) وبلغت أعلى حد لها عند درجة حرارة (35) درجة مئوية ثم انخفضت تدريجياً بزيادة درجة الحرارة مقارنة بمقدار (25) درجة مئوية لأنزيم (GDH) المستخلص من نبات الفستق (Dougall and Blach, 1976) وكذلك في نبات الذرة الصفراء(Sukalovic, 1990).

تأثير الدالة الحامضية (pH) للمحلول المنظم:

أشارت النتائج (الجدول 4) إلى أن مدى الدالة الحامضية الملائمة لفعالية أنزيم (GDH) في المحلول المنظم (Tris-HCl) وبتركيز (50) ملي مولار هي بمقدار (8.6). وجاءت هذه النتيجة مطابقة لما وجد للأنزيم المستخلص من خلايا الابتدائيات (*Grithidia fasciculate*)، (Higa et al., 1979)، ولكنها تختلف عن ماوجد في نبات الذرة الصفراء وزهرة الشمس (Errel et al., 1973; Sukalovic, 1990).

تأثير تركيز المحلول المنظم:

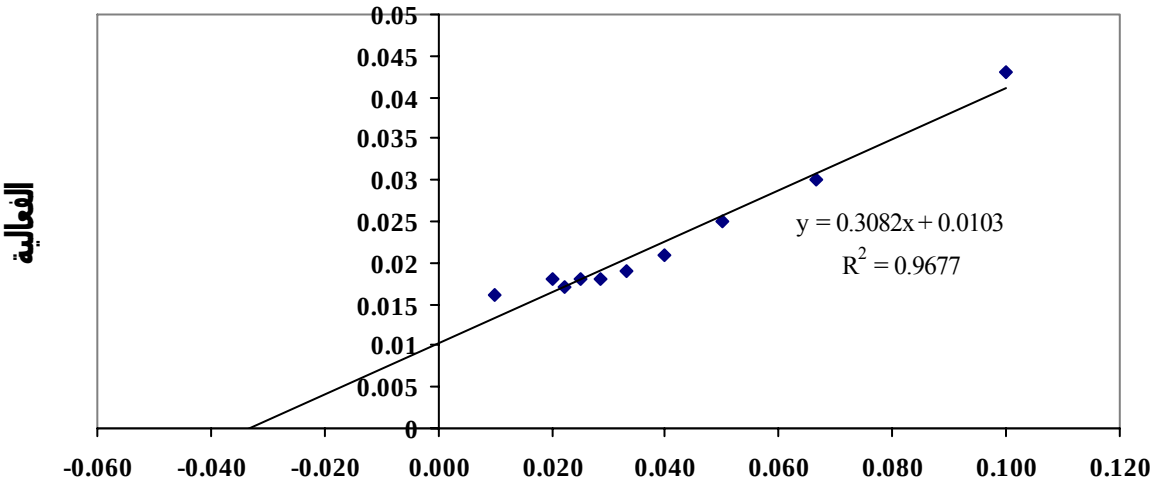
اوضحت النتائج (الجدول 4). إن استخدام تراكيز متعددة من المحلول المـنظم (Tris-HCl) مـن 50-250 ملي مولار أدت الى زيادة الفعالية النوعية لأنزيم GDH بصورة تدريجيـة بزيـادة تركيـز المحلول المنظم وبلغت أعلى فعالية بوجود 100 ملي مولار من المحلول وهذه النتيجة مشابهة لما وجـد في نبات الذرة الصفراء (Sukalovic, 1990).

تأثير تركيز البروتين وتركيزNAD على الفعالية:

أشارت النتائج (الجدول 4) إلى أن فعالية أنزيم (GDH) ازدادت بزيادة تركيز البروتين (الأنـزيم) وبلغت أعلى فعالية بوجود (20) مايكروغرام بروتين وكذلك بالنسبة لتأثير تركيز (NAD) بلغت أعلـى زيادة في الفعالية عند استخدام مقدار مايكرومول واحد وإن زيادة تركيز (NAD) لم تؤثر على الفعاليـة بعد هذا المقدار وذلك لكون الـ (NAD) هو مرافق أنزيمي يدخل بكميات قليلة في التفاعلات الكيميائية المحفزة بالأنزيم.

تأثير تركيز المادة الأساس:

إن التركيز الأمثل للمادة الأساس لعمـل أنـزيم GDH هـو (30) مـايكرومولار ومـن رسـم لاينويفربرك (الجدول 4) وجـد أن قيمـة الـسرعة القـصوى Vmax لأنـزيم GDH تـساوي (90) مايكرومولار وقيمة ثابت ميكليس – منتن Km تساوي (27) مايكرومولار، وهذه القيمة مقاربة لمـا وجد في العرهون (Baars et al., 1995) ولكنها تختلف عن تلك القيم التي وجدت في نباتات أخـرى إذ تراوحت قيمة الـ (Km) بين (1-14) مايكرومولار(Stone et al., 1979) وإنها اقل بكثير عن ما وجد في نبات الذرة الصفراء (Sukalovic, 1990). وان قيمة (Km) في البكتريا منخفضة نوعاً مـا (1.5) مايكرومولار مقارنة بتلك المعزولة من النباتات.(Kremeckova et al., 1992).



الشكل 3: رسم لاينويفر- برك لتوضيح ثابت ميكليس- منتن والـسرعة القـصوى للمـادة الأسـاس (Glutamic acid) لأنزيم (GDH) المعزول من كالس نبات حبة السوداء.

أن القيم المدرجة في الجدول (4) تمثل الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم GDH المستخلص مـن كالس سيقان نبات الحبة السوداء النامي على الوسط القياسي.

الجدول 4 : الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم GDH المستخلص من كالس سيقان نبات الحبة السوداء.

تركيز مادة الأساس	تركيز البروتين	تركيز NAD	تركيز المحلول المنظم	الدالة لحامضية (pH)	درجة الحرارة درجة مئوية
30 مايكروموولار	20 مايكروغرام	1 مايكروموولار	100 ملي مولار	8.6	35

ووجد بان الفعالية النوعية لأنزيم (GDH) المستخلص من كالس نبات الحبة السوداء النـامي علـى الوسط الغذائي المضاف إليه (2,4-D) ازدادت بمقدار (20%) في الظروف المثالية وان فعاليته للكـالس النامي على الوسط المضاف إليه (PDA) ازدادت بمقدار (20%) في الظروف المثالية، (الجدول 5).

الجدول 5: الفعالية النوعية لأنزيم كلوتاميت ديهايدروجينز المستخلص من كالس نبات الحبة السوداء على وسط MS المدعم بـإضافة 2,4-D كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات.

نوع الوسط الغذائي	*الفعالية النوعية في الظروف الاعتيادية	*الفعالية النوعية في الظروف المثالية	الزيادة %
MS مضاف إليه 10-6 مولا ر-2,4 D	17.8 ±0.011	21.3 ±0.012	20
MS مضاف إليه 10-6 مولا رPDA	18.6 ±0.031	22.3 ±0.021	20

* الفعالية النوعية: كمية الأنزيم التي تعمل على تكوين مايكرومول واحد من الناتج لكل دقيقة لكـل ملغرام بروتين

وبناءا على ما تقدم من نتائج هذه الدراسة يبدو واضحا إن إضافة مركب PDA المحضر مختبريـا إلى الوسط الغذائي لاستحداث ونمو كالس سيقان نبات حبة السوداء قد تنفي الحاجة عن اسـتخدام بعـض منظمات النمو القياسية والمصنعة المستخدمة عموما في زراعة الأنسجة النباتية. انفردت بها هذه الدراسة في تتبع مسار بناء الأحماض الامينية الرئيسة والأساسية ذات الأهمية في بناء البروتينات ومقارنـة تلـك الفعالية بوجود مركب PDA مع تلك الفعالية بوجود منظم النمو 2,4-D. يعد من الأهمية بمكان في هـذه الدراسة والدراسات المشابهة مستقبلا الوصول إلى منظم نمو أو منظمات نمو جديدة تعمل بصورة مشابهة لمنظمات النمو القياسية.

المصادر العربية

البكر، رحاب عبد الجبار، حامد عبد الله، 2002. دور بعض منظمات النمو القياسية والمصنعة حديثا في استحداث ونمو وتمايز الكالس من نبات الحبة السوداء *Nigella sativa* L. ومـستوى المركبـات الفعالة فيه. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

بواص، مناهل فوزي، 1998. حامض بنتادايئويك PDA كمنظم نمو جديد محضر مختبريـا فـي نمـو وتمايز كالس نبات الخس *Lactuca sativa* L. رسالة ماجستير، كلية العلـوم، جامعـة الموصـل، العراق.

بواص، مناهل فوزي ومحمد، عبـد المطلـب سـيد، 1999a. تـأثير حـامض بنتادايئويـك (PDA, Pentadienoic acid) كمنظم نمو جديد على نبات كالس نبات الخس. الجـزء الأول، الاسـتحداث والنمو، مجلة علوم الرافدين، المجلد 10، العدد 2، ص1-12.

بولص، مناهل فوزي ومحمد ، عبد المطلب سعيد، 1999b. تأثير حامض بنتادابنويك (PDA, Pentadienoic acid) كمنظم نمو جديد على نبات كالس نبات الخس. الجزء الثاني، التغيرات في الوزن الطري ومحتوى البروتين، مجلة علوم الرافدين، المجلد 10، العدد 2، ص13-25.

الكناني، فيصل رشيد ناصر، 1987. زراعة الخلايا والانسجة النباتية. مطبعة جامعة الموصل، العراق.

وصفي، عماد الدين، 1998. عماد فسيولوجيا النبات، المكتبة الاكاديمية، القاهرة، مصر.

المصادر الأجنبية

Andrews, P., 1964. The Gel Filtration Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weight over a Wide Rang. J. Biol. Chem., Vol. 96, pp.595-600.

Arnold, H. and Maier, K.P., 1971. Crystallization and Some Properties of Glutamate Dehydrogenase from Rat Liver, Biochem. Biophys. Acta, Vol. 251, pp.133-140.

Arnon, D.L. and Hoagland, D.R., 1940. Corp Production in Artificial Culture Solution and in Soil with Special Reference to Factors Influencing Yield and Absorption of Inorganic Nutrients, Soil Sci., Vol. 50, pp.463-473.

Arnon, D.L. and Hoagland, D.R., 1944. The Investigation of Plant Nutrition by Artificial Culture Methods, Biol. Rev., Vol. 19, pp.55-67.

Baars, J.J.D., Camp., H.J.M. and Hoek, A.H.M., 1995. Purification and Characterization of NADP-Dependent Glutamate Dehydrogenase from Commercial Mushroom *Agaricus bisporus*, SO :Curr-microbiol., New York, Springer International, Vol. 30, No. 4, pp.211-217.

Bayliss, M.W., Susan, D. and Dunn, M., 1979. Factors Affecting Callus Formation from Embryos of Barely (*Hordium vulgare*) Plant, Sci. Lett., Vol. 14, pp.311-316.

Dougall, D.K. and Bloch, J., 1976. A Survey of the Presence of Glutamate Synthase in Plant Cell Suspension Cultures Acad. press.

Errel, A., More, H. and Barash, I., 1973. The Isoenzymic Nature and Kinetic Properties of Glutamate Dehydrogenase from Sunflowers Seedlings, Plant and Cell Physiol.,Vol. 14, pp.39-50.

Fowler, M.W., Jessup, W. and Sarkissian, G.S., 1974. Glutamate Synthetase Type Activity in Higher Plants, FEBS Lett, Vol. 46, pp.340-342.

Higa, A.I., Cazzulo, B.M.F. and Cazzulo, J.J., 1979. Some Properties of the NAD-Specific Glutamate Dehydrogenase form *Crithidia fasciculate*, J. Gen. Microb., Vol. 113, pp.429-432.

Kamo, K.K., 1987. Suspension Cultures from Embryogenic Callus, Plant. Sci., Vol. 45, pp.111-119.

Kanamori, T., Konishi S. and Takahashi, E., 1972. Induction Formation of Glutamate Dehydrogenase in Rice Plant Root by the Addition of Ammonia to the Media, Physiol. Plant., Vol. 49, pp.127-138.

Kremeckova, H., Svrcula, B. and Mikes, V., 1992. Purification and Some Properties of Glutamine Synthetase from *Paracoccus denifrificans*, J. Gen. Microb., Vol. 138, pp.1587-1591.

Lineberger, R.D., 2001. The Many Dimension of Plant Tissue Culture, Hort. Sci. Tx. Vol. 77, pp.1-4.

Mohammad, A.M.S., A1-Saleh, H.S. and Ayoub, M.T., 1997. Role of Some Synthetic Pentadienoic Related to Abscisic Acid as a New Regulator on Sunflower Callus, Raf. J. Sci., Vol. 8, pp.8-17.

Pierik, R.L.M., 1987. In Vitro Culture of Higher Plants, Martinus. Nijhoff Pub., Canada.

Poli, F., Bonora, A., Vannina, G.L., Bruni, A. and Morris, M.P., l989. Callus Formation, Cells Suspension Culture and Plant Regeneration in *Ranunculs serbicus* Vis.J. Plant Physiol., Vol. 13 5, pp.637-639.

Sanwal, B.D. and Lata, M., 1961. Glutamate Dehydrogenase in Single Gene Mutants of *Neurospora* Deficient in Amination, Nature (Lond.), Vol. 190, pp.286-287.

Smith, E.L., Austen, B.M., Blumenthal, K.M. and Nyc, J.F., 1975. Glutamate Dehydrogenase in the Enzymes, Vol.11, pp.293-367. Edited by P.D. Boyer, New York and London: Academic Press.

Stone, S.R., Cope, L. and Kennedy, I.R., 1979. Glutamate Dehydrogenase from Lupin Nodules: Purification and Properties, Phyt., Vol. 18, pp.1273-1278.

Street, H.E., 1977. Plant Tissue and Cell Culture, Black Well Scientific Publication, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne. pp.243-254.

Sukalovic, V.H.T., 1990. Properties of Glutamate Dehydrogenase from Developing Maize Endosperm, Physiol. Plant., Vol. 80, pp.238-242.

Wareing, P.F. and Phillips, I.D.J., 1978. The Control of Growth and Differentiation of Plant, 2nd ed., Pergamon Press., Oxford.