تأثيرات معاملة بذور الماش *Vigna radiate* بالامينوبترين والترايمثوبريم في فعالية أنزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز ونمو بادراته وكالسسه

نهال عزت جمعة

ساجدة عزيز عبود

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

(أُستلم 2/ 3/ 2014 ؛ قُبل 26/ 5/ 2014)

الملخص

أشارت نتائج معاملة بذور الماش *Vigna radiate* قبل زراعتها بالتراكيز 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} مولار من الامينوبترين والترايمثوبريم الى انخفاض في نسبة انبات البذور، معدلات أطوال الجذور ونمو البادرات والكالس المشتق من قطع سيقان بادرات الماش النامية في وسط موراشيج وسكوك (MS) المزود بـ 2.0 ملغم /لتر من البنزائل أدنين (BA) و 0.5 ملغم/لتر من النفثالين حامض الخليك (NAA). واختلفت حساسية أنزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز (DHFR)، المستخلص من كالس سيقان الماش للأمينوبترين والترايمثوبريم باختلاف نوع وتركيز المثبط المستخدم. سبب الأمينوبترين 53% تثبيطاً لفعالية الإنزيم عند تركيز 10^{-4} مولار، في حين كان التأثير التثبيطي للترايمثوبريم على الفعالية أقل من تأثير الأمينوبترين. أثرت أيضاً إضافة المشابهات الى الأوساط الغذائية النامي عليها الكالس بصورة كبيرة على الوزن الرطب وبعض المكونات الخلوية للكالس. حصل 51% انخفاض في كمية الفوليت الكلية للكالس عند وجود الأمينوبترين بتركيز 10^{-4} مولار أو الترايمثوبريم بتركيز 10^{-3} مولار، في حين سببت إضافة الأمينوبترين (10^{-1} مولار) تثبيط 100% في كمية الفوليت وكمية البروتين والأحماض النووية بنوعها DNA و RNA مع موت خلايا الكالس. أخذ نمط التغيرات في المحتويات الخلوية نمطاً مشابهاً لتلك التغيرات في فعالية أنزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز والوزن الرطب للكالس.

الكلمات الدالة: كالس الماش، الامينوبترين، الترايمثوبريم، الداي هيدروفوليت رديكتيز.

Effects of *Vigna radiate* Seeds Treatment by Aminoprine and Trimethoprim in the Activity of Dihydrofolate Reductase Enzyme and its Seedlings, Calli Growth

Nihal E. Al - Taae

Sajida A. Abood

Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul

ABSTRACT

The results of *Vigna radiate* seeds treatment before planting with aminoprine and trimethoprim at 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} and 10^{-5} molar to decrease in the rate of germination, average length of roots and growth of seedlings and calli derived from *Vigna radiate* seedling segments that grown on Murashige and Skoog (MS) medium supplement with 2.0 mg/l benzyladenine (BA) and 0.5mg/l naphthalene acidic acid (NAA). The sensitivity of DHFR, isolated from *Vigna radiate* callus, to aminoprine or trimethoprim varied depending on the type and concentrations of inhibitor used. Aminoprine caused 53% inhibition of DHFR at 10^{-4} M, however the inhibitory effect of trimethoprim on DHFR was less than that of aminoprine.

Also addition of inhibitors to the media greatly affected the fresh weight and other cell constituents. There was a 51% decrease in the total folate content in the presence of 10^{-4} M

aminoprine or 10^{-3} M trimethoprim. Addition of aminoprine at 10^{-1} M caused a 100% inhibition in the folate, proteins, nucleic acids content and callus death after 30 days of growth.

The pattern of changes in cell constituents of callus grown on media with inhibitors was similar to that of DHFR activity and fresh weight of callus.

Keywords: *Vigna radiate* callus, Aminoptrin, Trimethoprim, Dihydrofolate reductase.

المقدمة

تساهم المساعدات الأنزيمية لحامض الفولك من التتراهيدروفوليت في نقل وحدات حاوية ذرة كربون واحدة مثل المثلين والمثيل والفورمايل، وتشترك في العديد من التفاعلات الحيوية لبناء الأحماض النووية (Basset *et al.*, 2005) والبروتينات في جسم الكائن الحي (عبود وعزت، 2011). إن نقصان أو تثبيط تكوين تلك المساعدات الأنزيمية يؤدي إلى التأثير في هذه الوظائف الحياتية وتثبيطها. يعد الأمينوبترين والترايميثوبريم من مشابهاة الفوليت اللذين يعملان على تثبيط فعالية انزيم الداى هيدروفوليت رديكتيز (DHFR) في خلايا الأحياء المجهرية واللبائن والنباتات وذلك للتشابه الكبير بين تركيبهما الكيميائي وتركيب حامض الفولك (الجلبي، 1991). تناولت العديد من الدراسات تأثير الأمينوبترين والترايميثوبريم على فعالية انزيم DHFR المستخلص من خلايا الأحياء المجهرية واللبائن (Elshaer *et al.*, 2012; Hyaun *et al.*, 2012 ; Vilcheze and Jacob, 2012)، وقلة تلك التي درست تأثيرهما في فعالية الأنزيم المستخلص من الخلايا النباتية، فقد درس تأثير الأمينوبترين على نمو بادرات البازلاء (Suzuki and Iwai, 1970) وتأثير الأمينوبترين والترايميثوبريم في نمو أنواع الكالس المشتق من زهرة الشمس (Mohammed *et al.*, 1989b; عبود وخضير، 2012a) ومن الخس (Mohammed *et al.*, 1991) ومن الحبة السوداء (الدليمي وعبود، 2006b; عبود، 2008).

افترضت الدراسة الحالية، لقلة المعلومات المتوفرة عن أيض حامض الفولك ودوره في نمو نباتات كالس الماش، في دراسة وفهم بعض الجوانب المتعلقة بأيض الفوليت ودوره في توظيف بناء الأحماض النووية والبروتينات وعلاقتها بالانقسام والنمو لخلايا الكالس، بصورة غير مباشرة من خلال استخدام مشابهاة الفوليت كالأمينوبترين والترايميثوبريم المثبطة لعملية بنائها.

المواد وطرائق العمل

اختبارات تأثير مشابهاة الفوليت في انبات البذور

زرعت بذور الماش المعقمة سطحيا بمعاملتها بالكحول الأيثلي بتركيز 96 % لمدة دقيقتين، وغسلها جيدا بالماء المقطر المعقم، ثم نقلها إلى دوارق زجاجية حاوية على الأمينوبترين والترايميثوبريم كل على حدة بتركيز متعددة 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} مولار وبرقم هيدروجيني (6.9) لمدة 24 ساعة وأستعمل الماء المقطر بدلا من المشابهاة كمعاملة مقارنة. حفظت العينات في حاضنة النمو في ظروف الظلام وحرارة 25 ± 2 م°، غسلت البذور بالماء المقطر المعقم عدة مرات، ثم وضعت في أطباق بتري حاوية على أوراق ترشيح رطبت بالماء المقطر (عبود وعزت، 2011)، حفظت العينات في حاضنة النمو في الظلام وبدرجة حرارة (25 ± 2 م°). بعد سبعة أيام من الزراعة حسبت نسبة الأنبات وطول الجذور للبادرات النامية.

اختبارات تأثير مشابهاة الفوليت في نمو الكالس

عقمت بذور الماش (50 بذرة) بغمرها في 250 مليلتر من محلول الكحول الأيثلي بتركيز 96% لمدة دقيقتين، ثم نقلت إلى محلول هايبيكلورايت الصوديوم (القاصر) بنسبة 2:1 (قاصر : ماء) لمدة سبع دقائق وغسلت عدة مرات بالماء المقطر المعقم، نقلت البذور المعقمة إلى دوارق زجاجية حاوية على وسط Arnon (Arnon and Hoagland, 1944) المعقم وحضنت البذور

المزروعة في الظلام في حاضنة النمو وبدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ لحين بزوغ الجذير، نقلت البذور النامية الى حاضنة النمو المجهزة بالضوء بشدة إضاءة 1500 لوكس ويتعاقب يومي لمدة 16 ساعة إضاءة و 8 ساعة ظلام للحصول على البادرات المعقمة. أستخدم وسط استحداث الكالس MS (Murashige and Skoog, 1962) المدعم بإضافة 2.0 ملغم/لتر من BA و 0.5 ملغم/لتر من NAA (عبد الرزاق، 2012) اذ وضعت قطع السيقان المستأصلة من بادرات الماش بعمر 20 يوما وبأطوال اسم على هذا الوسط الغذائي MS، وحفظت العينات في حاضنة النمو في ظروف حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ وإضاءة 16 ساعة/ 8 ساعات ظلام. نقلت قطع الكالس المستحثة بوزن 0.3 غم تقريبا بعد 30 يوما من النمو الى دوارق زجاجية حاوية 15 مل من وسط الاستحداث ذاته ومدعما بإضافة التراكيز من 10^{-1} - 10^{-5} مولار من الأمينوبترين او الترياميثوبريم بصورة منفصلة.

تقدير الاوزان الرطبة للكالس ومحتواه البروتيني

حددت الاوزان الرطبة للكالس النامي في الاوساط الحاوية على الأمينوبترين و الترياميثوبريم وكالس معاملة المقارنة بعد مضي فترة 30 يوما من النمو على تلك الأوساط الغذائية. استخدمت طريقة لاوري (Lowry et al., 1951) في تقدير كمية البروتينات الكلية في الكالس المشتق من سيقان الماش.

تقدير كمية الأحماض النووية الكلية

قدرت كمية الأحماض النووية الكلية باتباع طريقة Cherry (1962). وحددت كمية الحامض النووي المنقوص الأوكسجين (DNA) حسب طريقة Giles و Mayer (1967)، ومن حساب الفرق بين الكمية الكلية للأحماض النووية وكمية DNA حددت كمية الحامض النووي الرايبوزي RNA.

المحتوى الكلي للفلويد

استخدمت الطريقة المايكروبيولوجية (AOAC, 1950) في تقدير كمية الفلويت الكلية لكالس سيقان الماش.

تقدير الفعالية النوعية لإنزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز (DHFR)

سحق 1.0 غم من كالس السيقان بعمر 30 يوما بوجود 3 سم^3 من محلول بوتاسيوم فوسفيت المنظم بتركيز 50 ملي مولار (pH 7) في هاون خزفي مبرد وإكمال سحق الخلايا بواسطة جهاز الترددات فوق الصوتية (Romany PG-1545) بتسليط 20000 ذنبية/ ثانية لمدة نصف دقيقة. اخذ الرائق المتكون بفعل طرده مركزيا (9000 دورة/دقيقة لمدة ساعة)، واستخدامه في قياس فعالية الانزيم.

قيست فعالية أنزيم DHFR من الانخفاض الحاصل في الامتصاص الضوئي لمحلول التفاعل عند الطول الموجي 340 نانوميتر (Osborn and Huennekens, 1958) مع بعض التحويرات (عبود، 1997). يتكون محلول التفاعل بحجم نهائي 3 سم^3 من 40 ملي مولار من محلول البوتاسيوم فوسفيت المنظم برقم هيدروجيني 6.6، 0.15 ملي مولار من الداي هيدروفوليت، 0.5 ملي مولار من NADPH، 0.1 ملي مولار EDTA، 10 ملي مولار (2, Mercaptoethanol)، 12 ملي مولار من MgSO_4 وكمية من مستخلص الأنزيم والتحصين لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 30°C .

النتائج

تأثير مشابهات الفلويت في نمو البادرات

يشير الجدول (1) الى ان المعاملة المسبقة لبذور نبات الماش بتركيز من مشابهات الفلويت المستخدمة قبل زراعتها ادى الى انخفاض في نسبة الإنبات، فقد انخفضت النسبة الى النصف تقريبا بعد معاملة البذور بتركيز 10^{-3} مولار من الأمينوبترين و 10^{-2} مولار من الترياميثوبريم، وحصل ايضا انخفاض واضح في معدل أطوال الجذور بعد مدة نمو 8 أيام مقارنة بمعدل أطوال الجذور للبادرات النامية من بذور معاملة بالماء المقطر فقط (معاملة المقارنة).

الجدول 1: نسب انبات بذور الماش *Vigna radiate* المعاملة بتراكيز مختلفة من الامينوبيترين والترايميثوبريم واطوال جذورها بعد ثمانية ايام من النمو

مشابهاة الفوليت	التراكيز (مولار)	نسبة الانبات (%)	معدل أطوال الجذور (سم)
الأمينوبيترين	10^{-5}	80	1.80 ± 0.30
	10^{-4}	75	1.30 ± 0.11
	10^{-3}	50	0.85 ± 0.02
	10^{-2}	40	0.52 ± 0.02
	10^{-1}	0	0
الترايميثوبريم	10^{-5}	90	1.95 ± 0.80
	10^{-4}	80	1.55 ± 0.32
	10^{-3}	70	0.93 ± 0.24
	10^{-2}	50	0.65 ± 0.11
	10^{-1}	30	0.45 ± 0.03
معاملة المقارنة	ماء مقطر	100	2.5 ± 0.61

كل قيمة تمثل معدل عشرة قراءات، $\pm$ يمثل الخطأ القياسي.

تأثير مشابهاة الفوليت في الاوزان الرطبة للكالس

تشير بيانات الجدول (2) الى اختلاف معدل الوزن الرطب باختلاف تركيز مشابهاة الفوليت المضافة الى الأوساط الغذائية ونوعيتها. وأدى التركيز 10^{-1} مولار من الأمينوبيترين والترايميثوبريم الى موت معظم نسيج الكالس وتحوله الى اللون البني مقارنة بالكالس الهش ذي اللون الأخضر النامي على الأوساط الغذائية الخالية من مشابهاة الفوليت (معاملة المقارنة).

الجدول 2: تأثير اضافة تراكيز متعددة من الأمينوبيترين والترايميثوبريم في وسط الاستحداث MS الحاوي على BA (2.0 ملغم/لتر) و NAA (0.5 ملغم/لتر) في معدل الوزن الرطب لكالس سيقان الماش النامي بعد فترة نمو 30

يوما

مشابهاة الفوليت	التركيز (مولار)	معدل الوزن الطري (غرام)	الانخفاض الحاصل في الوزن الطري (%)
الأمينوبيترين	10^{-5}	0.321 ± 3.521	39
	10^{-4}	0.232 ± 2.550	56
	10^{-3}	0.201 ± 0.786	86
	10^{-2}	0.133 ± 0.405	93
	10^{-1}	-	100
الترايميثوبريم	10^{-5}	0.121 ± 3.700	63
	10^{-4}	0.213 ± 3.088	74
	10^{-3}	0.341 ± 1.393	76
	10^{-2}	0.221 ± 0.433	93
	10^{-1}	0.087 ± 0.301	95
معاملة المقارنة (ماء مقطر)		0.221 ± 5.800	0

كل قيمة تمثل معدل عشرة قراءات، $\pm$ يمثل الخطأ القياسي، - موت خلايا الكالس.

تأثير مشابهاة الفوليت في الفعالية النوعية لانزيم DHFR

تشير البيانات الى استمرار تأثير مشابهاة الفوليت المضافة في وسط الاستحداث في انخفاض الفعالية النوعية لانزيم DHFR الى النصف تقريبا عند اضافة 10^{-4} مولار من الأمينوبيترين و 10^{-3} مولار من الترايميثوبريم الى الوسط، لوحظ زيادة

التثبيط مع زيادة تركيز المشابهات المضافة الى تلك الأوساط، في حين سبب اضافة كل من الامينوبترين والترايميثوبريم بتركيز 10^{-1} مولار الى نظام التفاعل الى تثبيط فعالية الانزيم بنسبة 100% (الجدول 3).

الجدول 3: تأثير إضافة الأمينوبترين والترايميثوبريم في وسط استحداث الكالس ونظام التفاعل في فعالية انزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز المستخلص من كالس سيقان الماش بعمر 30 يوما (*In vivo*) و (*In vitro*)

الفعالية النوعية لإنزيم DHFR (مايكروغرام/دقيقة/ملغرام بروتين)*					مشابهات الفوليت
التثبيط (%)	<i>In vitro</i>	التثبيط (%)	<i>In vivo</i>	التركيز (مولار)	
41	0.212 ± 30.65	24	0.321 ± 40.21	10^{-5}	الأمينوبترين
63	0.342 ± 19.52	53	0.421 ± 27.12	10^{-4}	
88	0.444 ± 6.31	63	0.221 ± 19.81	10^{-3}	
97	0.322 ± 1.51	93	0.432 ± 4.16	10^{-2}	
100	0	98	0.213 ± 1.00	10^{-1}	
38	0.431 ± 32.35	20	0.323 ± 40.12	10^{-5}	الترايميثوبريم
48	0.215 ± 27.03	39	0.222 ± 32.51	10^{-4}	
78	0.253 ± 11.36	52	0.331 ± 25.55	10^{-3}	
92	± 0.333 4.26	88	0.212 ± 7.21	10^{-2}	
100	0	97	0.233 ± 2.31	10^{-1}	
0	0.565 ± 52.22	0	0.3 26 ± 53.12		معاملة المقارنة (ماء مقطر)

كل قيمة تمثل معدل ثلاثة قراءات ± يمثل الخطأ القياسي.

* الفعالية النوعية للإنزيم: كمية الانزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من NADPH خلال دقيقة واحدة من التفاعل لكل ملغم بروتين.

تأثير مشابهات الفوليت في المحتوى البروتيني الكلي للكالس

ادت التراكيز العالية من الأمينوبترين والترايميثوبريم المضافة في وسط استحداث الكالس انخفاض واضح في كمية البروتين الكلية للكالس بعد 30 يوما من النمو (الجدول 4).

تأثير مشابهات الفوليت في المحتوى الكلي من الأحماض النووية

توضح بيانات الجدول (4) بأن كمية الأحماض DNA و RNA انخفضت بإضافة التراكيز المتباينة من مشابهات الفوليت وخصوصا اضافة التركيز 10^{-1} مولار من الأمينوبترين والترايميثوبريم.

الجدول 4: مستوى البروتينات واحماض RNA, DNA في كالس سيقان الماش بعد 30 يوما من نموه على وسط

الاستحداث MS المدعم بـ BA (2.0 ملغم /لتر) و NAA (0.5 ملغم/لتر) بوجود تراكيز متعددة من مشابهات

الفوليت

مشابهات الفوليت	التركيز (مولار)	المحتوى البروتيني الكلي (ملغرام/غرام وزن طري)	كمية DNA (مايكروغرام/غرام وزن طري)	كمية RNA (مايكروغرام/غرام وزن طري)
الأمينوبترين	10^{-5}	0.032 ± 0.801	0.321 ± 12.01	0.546 ± 108.10
	10^{-4}	0.022 ± 0.722	0.324 ± 11.03	0.453 ± 97.08
	10^{-3}	0.111 ± 0.503	0.222 ± 8.41	0.545 ± 84.15
	10^{-2}	0.035 ± 0.228	0.321 ± 6.21	0.323 ± 59.00
	10^{-1}	-	-	-
الترايميثوبريم	10^{-5}	0.232 ± 1.08	0.111 ± 13.24	0.332 ± 132.24
	10^{-4}	0.077 ± 0.93	0.121 ± 12.20	0.434 ± 128.10
	10^{-3}	0.088 ± 0.83	0.432 ± 11.42	0.457 ± 111.93
	10^{-2}	0.055 ± 0.56	0.333 ± 8.98	0.099 ± 79.93

0.321 $\pm$ 33.56	0.121 $\pm$ 3.35	0.011 $\pm$ 0.32	10 ⁻¹	
0.221 $\pm$ 188.31	0.545 $\pm$ 22.99	0.121 $\pm$ 2.53	معاملة المقارنة (ماء مقطر)	

كل قيمة تمثل معدل ثلاثة قراءات، $\pm$ الخطأ القياسي

تأثير مشابهات الفوليت في المحتوى الكلي للفوليت

تظهر البيانات ان الانخفاض الحاصل في محتوى الفوليت اتخذ نمطا مشابهاً لنمط انخفاض فعالية انزيم DHFR إذ ازدادت نسب التنشيط بإضافة الأمينوبترين والترايميثوبريم مع زيادة تراكيزهما في الأوساط الغذائية النامي عليها الكالس (الجدول 5).

الجدول 5: محتوى الفوليت الكلي لكالس سيقان الماش بعد 30 يوماً من النمو على وسط MS المدعم بـ BA (2.0 ملغم /لتر) و NAA (0.5 ملغم/لتر) وتراكيز متعددة من مشابهات الفوليت

النسبة المئوية للتخفاض(100%)	كمية الفوليت الكلية مايكروغرام /غرام وزن طري	التراكيز(مولار)	مشابهات الفوليت
40	0.078 ± 1.222	10 ⁻⁵	الأمينوبترين
51	0.333 ± 0.995	10 ⁻⁴	
74	0.0 02 ± 0.532	10 ⁻³	
98	0.055 ± 0.225	10 ⁻²	
100	-	10 ⁻¹	
35	0.421 ± 1.312	10 ⁻⁵	الترايميثوبريم
45	0.300 ± 1.111	10 ⁻⁴	
51	0.121 ± 0.732	10 ⁻³	
78	0.065 ± 0.443	10 ⁻²	
90	0.0 31 ± 0.200	10 ⁻¹	
0	0.400 ± 2.031	معاملة المقارنة(ماء مقطر)	

كل قيمة تمتلك معدل ثلاثة قراءات، $\pm$ يمثل الخطأ القياسي.

المناقشة

ان عدم حصول انبات البذور عند التراكيز العالية من الأمينوبترين والترايميثوبريم ، قد يعزى الى المستويات المرتفعة من حامض الفولك والانزيمين Dihydropteroate synthetase في البذور الكاملة (Jabrin *et al.*, 2003) و (Dihydrofolate reductase) (Suzuki and Iwai, 1970)، اذ ان تشرب البذور بالماء يحفز الانزيمات لبناء مركبات الفوليت الضرورية لإنبات البذور ونمو البادرات، ويساهم في ارتباط الترايميثوبريم او الأمينوبترين بإنزيم DHFR بدلا من الداى هيدروفوليت الذي يعمل على تثبيط فعالية الأنزيم، ويعد هذا النوع من التثبيط تثبيطا تنافسيا Competitive Inhibition مسببا منع تكوين التتراهيدروفوليت وبالتالي منـع تكـوين مركـبات الفوليت الضرورية للاندسـام والنمـو (Hyaun *et al.*, 2012). ومن المحتمل ان يفسر الانخفاض في المحتويات الخلوية للكالس الى تثبيط الداى هيدروفوليت وبالتالي تثبيط تكوين التتراهيدروفوليت الذي تشارك مشتقاته في بناء حلقة البيورين بإضافة ذرة الكربون رقم 2 و 8 اليها (الجلبي، 1991) وفي بناء نيوكلوتيد الثايمين (الطائي واخرون، 2013؛ Al-Tae *et al.*, 2013) وادى هذا التأثير التثبيطي الى الانخفاض في كمية DNA وبالتالي انخفاض في كمية RNA التي تعتمد اساسا على كمية DNA الموجود في الخلية (عبود وخضير، 2012a). ان تشابه انماط الانخفاض في البروتينات مع انماط كمية DNA و RNA لخلايا الكالس على الأوساط الغذائية الحاوية على الأمينوبترين والترايميثوبريم وان اقتران الانخفاض في البروتينات والأحماض النووية ادى الى انخفاض الوزن الرطب للكالس. ان سبب تثبيط الأمينوبترين والترايميثوبريم لفعالية انزيم DHFR في كالس سيقان الماش عند أضافتهما الى

الأوساط الغذائية بتركيز 10^{-1} مولار لكل منهما، كان مماثلاً لتنشيطهما لأنزيم DHFR المستخلص من خلايا كالس الخس (عبود، 1997) وكالس نبات الحبة السوداء (الدليمي وعبود، 2006b) وكالس نبات زهرة الشمس (عبود وخضير، 2012b). ان تراكيز الترياميثوبريم والأمينوبترين المسببة 100% تثبيط لفعالية انزيم DHFR في حالة اضافتهما الى نظام التفاعل *In vitro* تقل اكثر من 1000 مرة تقريبا عن التراكيز المسببة تثبيطاً لفعالية الانزيم عند اضافتهما الى الوسط الغذائي *In vivo*، وربما يعزى هذا الى انخفاض قابلية امتصاص خلايا الكالس لهذه المشابهات من الوسط الغذائي او الى تحطيم قسم منها داخل الخلايا او وجود نوع من المقاومة لتلك المشابهات داخل الخلايا وان انخفاض فعالية انزيم DHFR خارج النظام (*In vitro*) ودخل النظام (*In vivo*) بوجود الترياميثوبريم والأمينوبترين يؤكد بان هذه المشابهات متخصصة في تثبيط انزيم DHFR (Crosti, 1981). وبذلك يمكن القول بان هذه الدراسة اضافت نباتاً جديداً (الماش) في تقانة زراعة الانسجة النباتية وضحت فيها تأثيرات مشابهات الفوليت عليه، وكما معروف ملائمة انظمة الزراعة النسيجية بديلاً عن النبات الكامل في تفسير بعض الجوانب المتعلقة بأبيض حامض الفولك بصورة غير مباشرة بسبب سرعة انقسام خلاياها ونمو انسجتها مثل انسجة الكالس تمتلك قابلية عالية على بناء واستخدام مركبات الفولك (Jabrin et al., 2003)، وان أي تثبيط لبناء هذه المركبات يؤدي بالتالي الى انخفاض في نمو الخلايا او موتها (Ekman, 1982).

المصادر العربية

- الجلبي، قصي عبد القادر (1991). "الاحماض النووية"، دار الكتب للطباعة والنشر، مطبعة جامعة الموصل، العراق.
- الدليمي، حكمت مصطفى؛ عبود، ساجدة عزيز (2006b). تأثير مشابهات الفوليت على فعالية انزيم الدايبيدروفوليت رديكتيز ونمو بادرات نبات الحبة السوداء *Nigella sativa* L. مجلة علوم الرافدين، 17(2)، 1-13.
- الطائي، نهال عزت؛ ساجدة عزيز عبود؛ مزاحم قاسم الملاح (2013). الصدمة الحرارية تحفز محتوى الأحماض النووية والبروتينات والفعالية النوعية لأنزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين في كالس سيقان السمسم *Sesamum indicum* L. مجلة مركز بحوث التقنيات الإحيائية، 7(2)، 47-56.
- عبد الرزاق، رشا فوزي (2012). انتاج نباتات من كالس سيقان بادرات الماش *Vigna radiate*. مجلة التربية والعلم، 25(1)، 85-77.
- عبود، ساجدة عزيز (1997). دور حامض الفولك في بناء البريمدينات والبيورينات في كالس نبات الخس *Lactuca sativa* L. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل.
- عبود، ساجدة عزيز (2008). تأثير تعريض كالس سيقان نبات الحبة السوداء (*Nigella sativa* L.) لأشعة كما على فعالية انزيم الدايبيدروفوليت رديكتيز وكمية الفوليت المستخلصة منه. مجلة التربية والعلم، 21(4)، 34-44.
- عبود، ساجدة عزيز عبود؛ خضير، فراس حميد (2012a). تأثير الأشعة فوق البنفسجية في نمو وتمايز كالوس نبات زهرة الشمس (*Helianthus annuus* L.). مجلة مؤنة للبحوث والدراسات، 27 (1) 9-21.
- عبود، ساجدة عزيز عبود؛ خضير، فراس حميد (2012b). قياس الفعالية النوعية لأنزيم الدايبيدروفوليت رديكتيز وتقدير كمية الفوليت الكلية المستخلصة من كالس سيقان زهرة الشمس *Helianthus annuus* L. المعرض للأشعة فوق البنفسجية. مجلة علوم الرافدين، 23 (3)، 1-11.
- عبود، ساجدة عزيز؛ عزت، نهال (2011). تأثير مركب السلفاسيتاميد في نمو واستحداث كالس سيقان نبات الحبة السوداء (*Nigella sativa* L.). مجلة ابحاث كلية التربية الاساسية، 11(1)، 467-6.

المصادر الأجنبية

- Al-Tae, N.E.; Abood, A.S.; Al-Mallah, M.K. (2013). Ultrasonic waves stimulate the activity of thymine nucleotide biosynthesis enzymes, Nucleic Acids and Proteins Content of *Sesamum indicum* L. Stem Calli. *Dirasat, Pure Sciences*, **39**(1), 91-97.
- Arnon, D.I.; Hoagland, D.R. (1944). The investigation of plant nutrition by artificial culture methods. *Boil. Rev.*, **9**, 55 – 67.
- Association of Official Agricultural Chemists (1950). "Official Methods of Analysis of the Associations of Official Agricultural Chemists". 7th ed. Washington D.C. 784.
- Basset, G.J.C.; Quinlivan, E.P.; Gregory, J.F.; Hanson, A.D. (2005). Folate synthesis and metabolism in plants and properties for biofortification. *Crop Sci. Soci. America*, **45**, 449-453.
- Cherry, J.H. (1962). Nucleic acid determination in storage tissue of higher plants. *Plant Physiol.* **37**, 670 – 678.
- Crosti, P. (1981). Effect of folate analogues on the activity of dihydrofolate reductase and on the growth of plant organisms. *J. Exp. Bot.*, **32**, 717-723.
- Ekman, B.T. (1982). Studies on dihydrofolate reductase and trimethoprim resistance in *E. coli* :Acta Universitatis Upsaliensis, Abstract of Uppsala Dissertation from Faculty of Pharmacy. 1-41.
- Elshaer, A.; Hanson, P.; Worthington, T.; Lambert, P.; Mohammed, A.R. (2012). Preparation and characterization of amino acids –based Trimethoprim salts. *Pharmaceutics*, **4**, 179-196.
- Giles, K.W.; Mayer, A. (1967). Determination of DNA concentration with diphenylamine reagent. *Method of Enzymol.* Academic Press (New York), **12**, 163.
- Hyaun, S.C.; Obican, S.C.; Scialli, A.R. (2012). Teratogen Update: Methotrexate. *Brith Defects Research* , **94**, 187-207.
- Jabrin, S.; Ravanel, S.; Gambonnet, B.; Douce, R.; Rebeille, F. (2003). One – carbon metabolism in plants, regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiol.*, **131**, 1431-1439.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Faw, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with Folin – phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 – 275.
- Mohammad, A.M.S.; Abood, S.A.; Al-Salih, H.S. (1991). Effect of folate analogous on protein, RNA and DNA contents of lettuce. *Iraqi J. Biol. Sci.*, **11**, 5-25.
- Mohammed, A.M.S.; Al-Chalabi, K.A.; Abood, S.A. (1989b). Effect of folate analogues on the activity of dihydrofolate reductase and callus growth of Sunflower. *J. Exp. Bot.*, **40**, 70-76.
- Murashige, I.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473– 497.
- Osborn, M.J.; Huennekens, F.M. (1958). Enzymatic reduction of dihydrofolate reductase. *J. Biol. Chem.*, **233**, 969-964.
- Suzuki, N.; Iwai, K. (1970). The occurrence and properties of dihydrofolate reductase in pea seedling. *Plant and Cell Physiol.*, **11**, 199-208.
- Vilcheze, C.; Jacob, J. (2012). The combination of sulfmethoxazole, Trimethoprim and isonizid or rifampin is bactericidal and prevents the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, **56**, 5142-5148.