وجود أنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز في بادرات وكالاس نبات الحبة السوداء *(Nigella sativa L.)*

حكمت مصطفى الدليمي **ساجدة عزيز عبود**

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2005/9/10 ؛ تاريخ القبول 2006/2/27)

الملخص

هدفت الدراسة إلى التحري عن وجود عملية البناء الحيوي لنيوكليوتيد الثايمين في نبات الحبة السوداء *Nigella sativa* L. بمسار الاسترداد ومسار الدي نوفو . وأشارت النتائج في هذا المضمار إلى عدم وجود مسار الاسترداد لعدم وجود فعالية لأنزيم الثايمدين فوسوفورليز، بينما أكدت النتائج وجود مسار الدي نوفو بدلالة وجود فعالية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز في المستخلص الخلوي للنبات .

تم استحداث الكالاس من قطع سوق بادرات نبات الحبة السوداء على وسط موراشج وسكوك والحاوي على 2,4-D بتركيز 10^{-6} مولار . أوضحت النتائج بان الفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز وكمية الفوليت الكلية المستخلصة من كالاس الحبة السوداء بلغت 24، 13، 8، 4، 3 مرة تقريباً أكثر من تلك المستخلصة من البذور، الجذور، الأزهار، السوق، والأوراق على التوالي.

أشارت النتائج ايضاً إلى وجود زيادة في معدل الوزن الطري والمحتويات الخلوية من البروتينات والأحماض النووية (DNA و RNA) والفوليت المستخلص من الكالاس النامي بأعمار مختلفة . واتخذت الزيادة في الفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز نمطاً مشابهاً لحد ما لأنماط الزيادة في المحتويات الخلوية للكالاس .

Presence of Dihydrofolate Reductase in Seedlings and Callus of *Nigella Sativa* L. Plant.

Hekmat M. Al-Dulaimee **Sajida A. Abood**
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The study aimed to investigate the biosynthesis of thymidine nucleotide by salvage and de novo pathways in the black seed (*Nigella sativa* L.) plant. The results indicated the absence of thymidine phosphorylase activity in the cell extract of black seed plant while dihydrofolate reductase was present. This may indicate that black seed cells depend on de novo pathway for dTMP synthesis.

Callus induction occurred on stem segments of *Nigella sativa* L. seedlings grown on Murashige and Skoog medium, containing 10^{-6}M of 2,4-D .

Specific activity of dihydrofolate reductase and total folate content of black seed callus reached 24,13,8,4 and 3 folds than that found in seeds, roots, flowers, stems and leaves respectively.

Moreover, the results indicated an increase in the fresh weight with an increase in the cellular contents of proteins, nucleic acids (DNA and RNA) and folate extracted from callus of deferent ages. The specific activity of dihydrofolate reductase followed the same pattern of the cell components.

المقدمـــة

عرف نبات الحبة السوداء .*Nigella sativa* L بأهميته الطبية لما يحتويه النبات وخاصة بذوره من المواد العضوية والمعدنية وأهمها البروتين والدهون التي أعطتها القيمـة الغذائيـة العاليـة (Al-Jassir, 1992) . وقد أشارت العديد من الدراسات العلمية إلى أهمية نبات الحبة السوداء في شـفاء العديـد مـن الأمراض (Naghma et al., 2003) . وعلى الرغم من ان العديد من المواد الكيمياويـة قـد شخـصت وحددت كميتها في النبات ومنها الفيتامينات (العاني، 1998) الا انه لا توجد دراسات وبحوث تشير إلـى دور تلك الفيتامينات وايضها وخاصة حامض الفوليك وعلاقته بنمو خلايا أنسجة الكائن الحي .

تستطيع العديد من الكائنات الحية من بناء الثايمدليت (dTMP) ودمجها بـ DNA بمسار الاسترداد بخطوتين اعتماداً على وجود أنزيمي الثايمدين فوسفورليز (Katayanagi et al., 2003) والثايمدين كاينيز (Jinoch et al., 2003) . وتشير بعض الدراسات إلى عدم وجود مسار الاسترداد في بعـض الكائنـات الحية لعدم وجود فعالية لأنزيم الثايمدين فوسفورليز واعتماد تلك الكائنات على مسار الدي نوفو في بنـاء نيكليوتيد الثايمين (Neil et al., 2003) .

يعد أنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز أحد أنزيمات دورة اضافة المثيل لبناء dTMP مـن dUMP بمسار الدي نوفو والتي تتضمن اضافة إلى هذا الانزيم أنزيم الثايمدليت سـنثيز والـسيرين هيدروكـسي ميثايل ترانسفريز . عزل أنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز من خلايا الأحيـاء المجهريـة (Xu et al., 2003) ومن خلايا اللبائن (Elcock et al., 1996) ومن خلايا الابتدائيات (Neil et al., 2003) في حين توجد دراسات محددة جداً لهذا الانزيم في النباتات . فقد درس بصورة مفـصلة فـي بـادرات البـازلاء (Suzuki and Iwai, 1970) ، وفول الصويا (Reddy and Rao, 1976)، وفي الخلايا المعلقـة للجـزر (Albani et al., 1985) وفي خلايا الداتورة (Wu et al., 1993)، وفي خلايا كالس زهرة الشمس (Al-Chalabi et al., 1990) وكالس الخس (عبود، 1997) لذا تهدف الدراسة الحالية إلى تحديد وجود فعاليـة أنزيم الدايهيدروفوليت ردكتيز وكمية الفوليت في كالس نبات الحبة السوداء .

المواد وطرائق العمل

استحداث الكالس

استخدمت بذور الحبة السوداء .*Nigella sativa* L في هذه الدراسة وتم اختبار نسبة الانبات وكانت بمقدار 92% واستخدم وسطArnon , Hogland المعقم لانبات البذور وتنميـة البـادرات (Arnon and Hogland, 1944, 1940) . عقمت البذور سطحياً بمحلول الكحول الاثيلي بتركيز 96% لمدة دقيقتين ثـم بمحلول هايبوكلورايت الصوديوم (القاصر المحلي) المخفف مع الماء المقطر، بعد الانبات استخدمت قطع من سوق نبات الحبة السوداء السليمة وبعمر 25-30 يوماً وبطول 1سم تقريباً، زرعت هذه القطـع علـى وسط موراشيج وسكوك MS (Murashige and Skoog, 1962) الحاوي على سكروز بتركيـز 3.5% و 2,4-D بتركيز 10^{-6} مولار (البكر، 2002) . وحضن الوسط الغذائي الحاوي على القطـع النباتيـة فـي حاضنة نمو بدرجة حرارة (20+0°م) والمجهزة باضاءة 1500 لوكس وبتعاقب يـومي لمـدة 16 سـاعة اضاءة و 8 ساعات ظلام . استخدم الكالس النامي بعمر 35 يوماً في التجارب اللاحقة .

أنزيم الثايمدين فوسفورليز Thymidine phosphorylase

سحق غرام واحد من كالس نبات الحبة السوداء بعمر 35 يوماً مع 5سم^3 من المحلول المنظم Tris-HCL بتركيز 50 ملي مولار وبرقم هيدروجيني 7.8 في هاون خزفي مبرد بدرجة حـرارة 4°م، وأكمـل سحق وتحطيم جدران الخلايا باستخدام جهاز التـرددات فـوق الـصوتية Ultrasonic بتـسليط 20000 ذبذبة/ثانية ولمدة نصف دقيقة(عبود، 1997) . وحددت فعالية أنزيم الثايمدين فوسفورليز حـسب طريقـة Schwartz (Schwartz, 1971) مع بعض التحويرات (Al-Chalabi et al., 1990) التي تعتمد علىقياس

أحد نواتج التفاعل الديوكسي رايبوز 1-فوسفيت باستخدام كاشف الداي فينايـل أمـين (Burton, 1956) . واستخدم الطول الموجي 600 نانوميتر لتحديد الامتصاصية .

أنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز Dihydrofolate reductase

استخدم 1.0 غرام من الأجزاء النباتية المختلفة لنبات الحبة السوداء (البـذور، الجـذور، الـسوق، الأوراق والأزهار) ومن الكالس بعمر معين بوجود 3سم[3] من المحلول المنظم فوسفيت بتركيز 50 ملـي مولار وبرقم هيدروجيني (7.0) سحقت كل من الأجزاء على حده في هاون خزفي مبرّد بدرجة حـرارة 4م°، وأكمل سحق الخلايا وتحطيمها باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية Ultrasonic بتـسليط 20000 ذبذبة/ثانية لمدة نصف دقيقة . عزل الرائق عن الراسب باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرّد بـسرعة 9000 دورة/دقيقة ولمدة ساعة، واستخدم الرائق في قياس فعالية الأنزيم . وقيست فعاليـة أنـزيم الـداي هيدروفوليت ردكتيز بقياس مقدار الانخفاض في الامتصاص الضوئي لمحلول التفاعل عند الطول الموجي 340 نانوميتر حسب طريقة (Osborn and Huenneken, 1958) مع بعض التحويرات (عبود، 1997) . يتكون محلول التفاعل بحجم نهائي 3سم[3] من 40 ملي مولار من محلول البوتاسيوم-فوسفيت المنظم برقم هيدروجيني 6.6 و 0.15 ملي مولار من الداي هيدروفوليت و 0.5 ملي مـولار NADPH و 0.1 ملـي مولار EDTA و 10 ملي مولار 2,Mercaptoethanol و 12 ملي مولار مـن $MgSo_4$ وكميـة مـن مستخلص الأنزيم والتحضين لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 30م°. حددت الفعالية النوعية للأنزيم على أنها كمية الأنزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من NADPH خلال دقيقة واحدة من التفاعل لكل ملغـرام بروتين.

تقدير الوزن الطري وكمية البروتين الكلي للكالس

قدّر الوزن الطري للكالس وبأعمار متعددة (0 ، 5 ، 10-50) بالاعتماد على تحديد الفرق في وزن الدوارق الزجاجية الحاوية على الأوساط الغذائية وذلك قبل وبعد الزراعـة . وقـدرت كميـة البـروتين المستخلص من خلايا كالس نبات الحبة السوداء حسب طريقة لاوري (Lowry et al., 1951) .

تقدير كمية الأحماض النووية الكلية

قدرت كمية الأحماض النووية الكلية بنوعيها (RNA و DNA) المستخلص من كالس نبات الحبـة السوداء حسبما ذكر من قبل Cherry (Cherry, 1962) . وحددت كمية الحـامض النـووي الديوكـسي رايبوزي (DNA) حسب طريقة Giles و Mayer (Giles and Mayer, 1965; 1967) . وحددت كميـة الحامض النووي الرايبوزي (RNA) من الفرق بين الكمية الكلية للأحماض النووية وكمية DNA .

تقدير كمية الفوليت الكلية

استخدمت الطريقة المايكروبايولوجية التي اتبعتها AOAC (AOAC, 1950) لتقدير كمية الفوليت الكلية لنبات الحبة السوداء وذلك بقياس مقدار التعكر الحاصل نتيجة نمو بكتريا *Streptococcus faecalis* عند الطول الموجي 540 نانوميتر .

النتائج

أظهرت قطع سوق بادرات الحبة السوداء (*Nigella sativa L.*) استجابة عالية لاستحداث الكالس في الوسط الغذائي MS المعقم (Murashige and Skoog, 1962) ، المضاف إليه 2,4-D بتركيز 10^{-6} مولار . وتميز الكالس النامي على هذا الوسط بقوامه الهش ولونه الأخضر المصفر خاصة بعد عمر 35 يوماً (صورة 1، A). واستخدم الكالس النامي بعمر 35 يوماً في التجارب اللاحقة .

الوزن الطري للكالس

يشير الجدول (1) إلى زيادة معدل الوزن الطري للكالس وبصورة تدريجية مع زيادة فترة النمو من صفر - 50 يوماً . وتبدو الزيادة واضحة في الوزن الطري للكالس بعد عمر 35 يوماً، إذ بلغت هذه الزيادة مقدار 0.218 غم بين عمر 35 و 40 يوماً .

أنزيم الثايمدين فوسفورليز Thymidine phosphorylase

أشارت النتائج إلى عدم وجود فعالية للأنزيم في المستخلص الخلوي الخام والرائق والراسب لكالس نبات الحبة السوداء .

أنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز Dihydrofolate reductase (DHFR)

توضح الصورة (1) بان الفعالية النوعية لأنزيم DHFR قد اختلفت باختلاف المصادر النباتية المستخلص منها لنبات الحبة السوداء (البذور، الجذور، السوق، الأوراق، الأزهار والكالس) . وان الفعالية النوعية للأنزيم المستخلص من خلايا الكالس بعمر 35 يوماً مساوية تقريباً إلى 24 , 13 , 8 , 4 , 3 أضعاف الفعالية للأنزيم المستخلص من بذور نبات الحبة السوداء وجذورها وأزهارها وسوقها وأوراقها على التوالي الجدول (1) .

ويشير الجدول (2) إلى أن الفعالية النوعية لأنزيم DHFR المستخلص من الكالس ازدادت خلال مراحل النمو المختلفة بدرجة كبيرة بعد مدة نمو 35 يوماً، واستمرت الزيادة في الفعالية وبصورة تدريجية إلى مدة نمو 50 يوماً وقدرت الزيادة بخمسة أضعاف وبصورة مشابهة للزيادة في الوزن الطري .

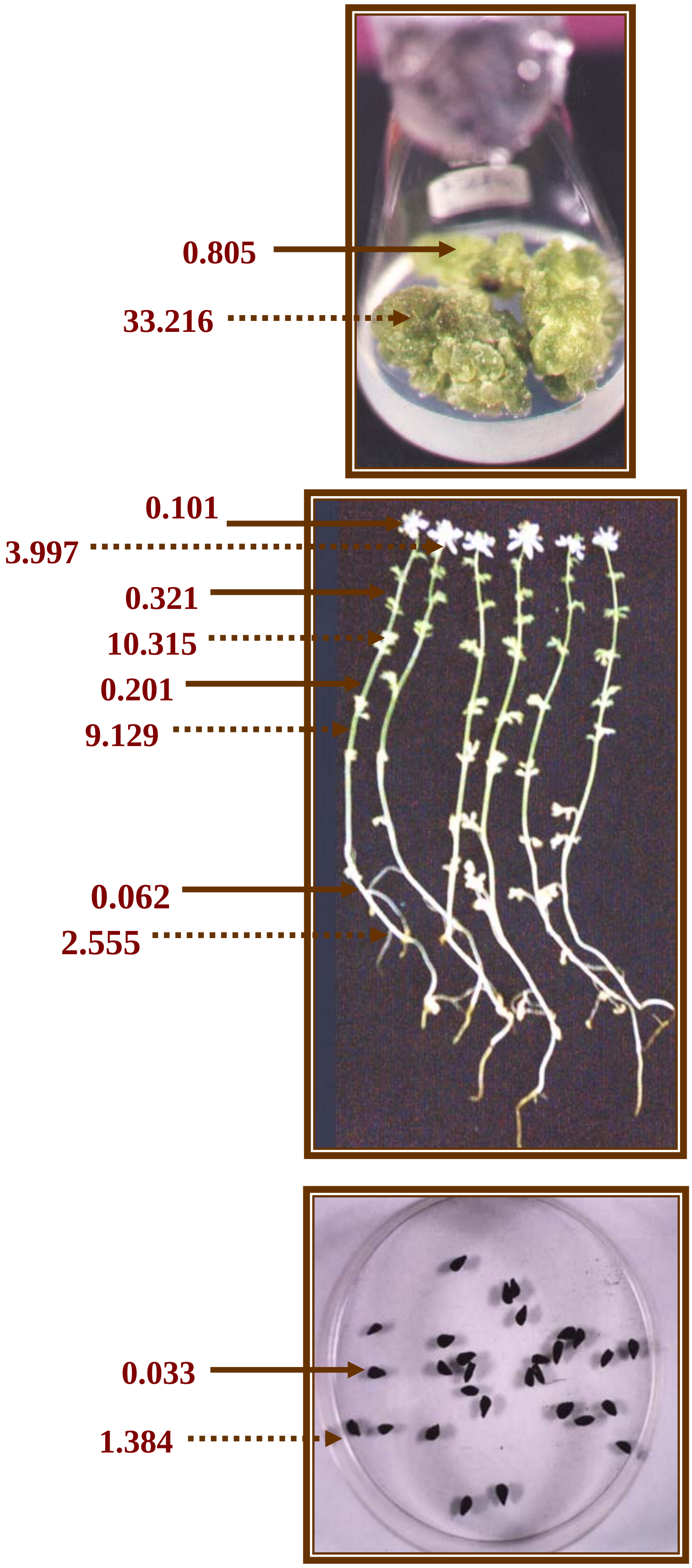
محتوى البروتين الكلي والأحماض النووية الكلية

يوضح الجدول (2) إن كمية البروتين الكلية للكالس ازدادت تباعاً بزيادة مدة النمـو . وان أنمـاط الزيادة في محتوى البروتين للكالس اتخذت أنماطا مشابهة لحد ما لتلك الزيادة في معدل الـوزن الطـري للكالس ولفعالية أنزيم DHFR . يبدو واضحاً أن كمية الحامض النووي الرايبوزي (RNA) للكالس النامي على وسط MS ازدادت على نحو ملحوظ بعد مدة النمو 35 يوماً، مقارنة بمستواه خلال مدة النمو الأولى من 5-35 يوماً أن كمية الحامض النووي الديوكسي رايبوزي (DNA) للكالس ازدادت ايضاً مع تقدم نموه (جدول 2)، واتخذت الزيادة في كمية DNA أنماطاً مشابهة لحد ما لتلك الزيادة في محتوى الخلايـا مـن البروتين و RNA.

محتوى الفوليت الكلي

توضح الصورة (1) بأن كمية الفوليت الكلية قد اختلفت باختلاف الأجزاء النباتية المستخلص منها . وان كمية الفوليت المستخلصة من خلايا الكالس بعمر 35 يوماً مـساوية تقريبـاً 24 , 13 , 8 , 4 , 3 . أضعاف كميتها المستخلصة من بذور نبات الحبة السوداء وجذورها وأزهارها وسوقها وأوراقهـا علـى التوالي . وجاءت هذه النتيجة مطابقة لفعالية الأنزيم النوعية المستخلص من خلايا الكالس وتلك الأجـزاء النباتية المختلفة لنبات الحبة السوداء (الجدول 1) .

أظهرت النتائج أيضا ان كمية الفوليت الكلية المستخلصة من كالس نبات الحبة السوداء قـد ازدادت مع زيادة فترة النمو، وبلغت كمية الفوليت مقدار 1.289 مايكروغرام/غرام من الوزن الطري المستخلص من الكالس بعمر 50 يوماً، مقارنة بتلك الكمية 0.201 مايكروغرام/غرام المستخلص مـن قطـع سـوق بادرات الحبة السوداء قبل زراعتها على الوسط الغذائي . اتخذت الزيادة في كمية الفوليت للكالس النـامي بأعمار مختلفة أنماطاً مشابهة لحد ما لتلك الزيادة في الوزن الطري ومحتوى البروتين الكلـي ومحتـوى الأحماض النووية بنوعيها (RNA و DNA) والفعالية النوعيـة لأنـزيم الـداي هيـدروفوليت ردكتيـز (الجدول 2) .



A- كالس نبات الحبة الـسوداء بعمر 35 يوماً .

B- بادرات نبـات الحبـة السوداء بعمر 30 يوماً

C- بـذور نبـات الحبـة السوداء .

← كمية الفوليت الكلية

◂.... الفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدرو فوليـت

الصورة 1 : محتوى الفوليت الكلي والفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز المستخلص من خلايا الكالس بعمر 35 يوماً والأجزاء النباتية المختلفة لنبات الحبة السوداء . كـل قيمـة تمثل معدل ثلاث قراءات .

الجدول 1 : محتوى الفوليت الكلي والفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز المستخلص من خلايا الكالس بعمر 35 يوماً والأجزاء النباتية المختلفة لنبات الحبة السوداء . كل قيمة تمثل معدل ثلاث قراءات .

الأجزاء النباتية المختلفة	الفعالية النوعية لأنزيم DHFR مايكروغرام / دقيقة / ملغم.بروتين	كمية الفوليت مايكروغرام/غم وزن طري	عدد مرات الزيادة للفعالية النوعية للأنزيم وكمية الفوليت للكالس على الأجزاء الأخرى
الكالس	33.216	0.805	-
الأوراق	10.315	0.321	3
السيقان	9.129	0.201	4
الأزهار	3.997	0.101	8
الجذور	2.555	0.062	13
البذور	1.384	0.033	24

المناقشة

ان نبات الحبة السوداء يعد مثالاً نموذجياً لانتاج مزارع الكالس (البكر، 2002) ومزارع المعلقات الخلوية (النعيمي، 2004) . وان القابلية العالية لقطع سوق بادرات الحبة السوداء لاستحداث الكالس ونموه، قد سهّل اجراء بعض الدراسات البايوكيميائية المتعلقة ببناء نيكليوتيد الثايمين أحد أهم نيوكليوتيدات بناء DNA .

أشارت نتائج هذه الدراسة إلى أن وسط MS المدعم بـ 2,4-D بتركيز 10^{-6} مولار من الأوساط المشجعة لاستحداث ونمو الكالس من قطع سوق بادرات الحبة السوداء، وبدا الكالس النامي على هذا الوسط هشاً ذا لون أخضر برّاق، وتميزت خلاياه بالانقسام والنمو السريع خاصة بعد 35 يوماً من الزراعة ، وهذا يدل على أن 2,4-D المضاف إلى الوسط الغذائي قد توافق مع المستويات الداخلية للأوكسينات والسايتوكاينينات، وجاءت هذه النتيجة مطابقة لما وجد في الدراسة السابقة لنبات الحبة السوداء التي قدمها البكر(البكر، 2002) .

الجدول 2 : معدل الوزن الطري ، الفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز والمحتويات الخلوية المستخلصة من كالس نبات الحبة السوداء النامي على وسط MS المدعم بـ 2, 4-D بتركيز 10^{-6} مولار وبأعمار مختلفة .

العمر (يوم)	الوزن الطري (غرام)	الفعالية النوعية لأنزيم DHFR (مايكروغرام/دقيقة/ ملغرم . بروتين)*	كمية البروتين (ملغرام/غرام وزن طري)	كمية DNA (مايكروغرام/ غرام وزن طري)	كمية RNA (مايكروغرام/ غرام وزن طري)	كمية الفوليت (مايكروغرام/ غرام وزن طري)
قطعة نباتية	0.030 ∓ 0.012	9.18 ∓ 0.021	0.035 ∓ 0.011	5.004 ∓ 0.121	49.039 ∓ 0.211	0.201 ∓ 0.081
5	0.035 ∓ 0.015	11.994 ∓ 0.011	0.092 ∓ 0.012	5.521 ∓ 0.081	52.449 ∓ 0.321	0.282 ∓ 0.091
10	0.040 ∓ 0.013	13.040 ∓ 0.021	0.113 ∓ 0.031	6.902 ∓ 0.091	69.020 ∓ 0.111	0.399 ∓ 0.011
15	0.050 ∓ 0.021	14.991 ∓ 0.021	0.251 ∓ 0.012	7.561 ∓ 0.088	72.105 ∓ 0.091	0.421 ∓ 0.031
20	0.066 ∓ 0.018	19.412 ∓ 0.011	0.302 ∓ 0.002	8.041 ∓ 0.120	75.585 ∓ 0.212	0.554 ∓ 0.022
25	0.089 ∓ 0.031	22.450 ∓ 0.012	0.524 ∓ 0.031	8.584 ∓ 0.111	81.548 ∓ 0.311	0.722 ∓ 0.031
30	0.118 ∓ 0.041	28.994 ∓ 0.011	0.699 ∓ 0.022	9.881 ∓ 0.092	90.810 ∓ 0.214	0.788 ∓ 0.021
35	0.132 ∓ 0.013	33.212 ∓ 0.013	0.822 ∓ 0.011	10.991 ∓ 0.082	101.450 ∓ 0.331	0.806 ∓ 0.033
40	0.350 ∓ 0.031	45.211 ∓ 0.011	1.532 ∓ 0.081	13.191 ∓ 0.121	193.513 ∓ 0.232	0.991 ∓ 0.040
45	0.440 ∓ 0.044	48.495 ∓ 0.011	1.791 ∓ 0.021	13.909 ∓ 0.321	197.217 ∓ 0.411	1.032 ∓ 0.121
50	0.581 ∓ 0.121	49.216 ∓ 0.012	1.990 ∓ 0.021	14.049 ∓ 0.411	199.575 ∓ 0.121	1.289 ∓ 0.211

- كل قيمة تمثل معدل ثلاث قراءات ما عدا قيمة الوزن الطري تمثل معدل عشرة قراءات .
- (*) الفعالية النوعية للأنزيم : كمية الأنزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من مادة NADPH خلال دقيقة واحدة من التفاعل لكل ملغرام بروتين وحسبت استناداً إلى Extension Coefficient للدايهيدروفوليت (6.2×10^{3} $M^{-1}.cm^{-1}$) .
- (∓) يمثل الخطأ القياسي .

أشارت النتائج في هذا المضمار إلى عدم وجود فعالية لأنزيم الثايمدين فوسفورليز في مستخلص خلايا نبات الحبة السوداء ، وهذا يشير إلى احتمال عدم وجود مسار الاسترداد (Salvage pathway) واعتماد نبات الحبة السوداء على مسار الدي نوفو (De novo) في بناء نيوكليوتيد الثايمين من خلال وجود فعالية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز، وكما وجد في نبات زهرة الشمس والخس (عبود، 1986 ; 1997) وبعض أنواع بكتريا E. coli (Fangman, 1969) وكذلك في بعض أنواع من الابتدائيات (Al-Chalabi and Gutteridge, 1977) .

اختلفت الفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز وكمية الفوليت الكلية باختلاف الأجزاء النباتية المستخلص منها لنبات الحبة السوداء، وأعطت الأوراق أعلى فعالية للأنزيم وأكثر كمية من الفوليت الكلي مقارنة بالبذور والجذور والسوق والأزهار، وتعود الفعالية العالية للأنزيم في الأوراق إلى حاجة الخلايا إلى مستوى عالي من التتراهيدروفوليت الذي يشترك بمسار خاص في دورة التنفس الضوئي والبناء الضوئي التي تتم في النباتات الخضراء (Douce et al., 2001; Oliver, 1994) . ازدادت الفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز وكمية الفوليت الكلية المستخلصة من أنسجة الكالس مقارنة بتلك الفعالية والكمية المستخلصة من أنسجة الأجزاء النباتية المختلفة لنبات الحبة السوداء، وبذلك يمكن القول بأن كمية الفوليت الكلية تباينت حسب حالة الخلايا، فالخلايا التي تكون في حالة انقسام ونمو يكون مستوى الفوليت الكلي فيها عالياً، وهذا يتطلب فعالية عالية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز لبناء هذا المركب، أي أن عملية بناء الفوليت بمستوى معين يرتبط بأيض الخلية والحاجة الكبيرة لبناء نيوكليوتيدات DNA (Jabrin, 2003) .

وأظهرت النتائج ايضاً بأن الفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز ازدادت على نحو تدريجي مع تقدم عمر الكالس حتى عمر 35 يوماً، أعقبتها زيادة كبيرة في الفعالية النوعية للأنزيم بين عمر 35 و 40 يوماً، وهذه الزيادة ربما تعود إلى نشاط خلايا الكالس في هذه المرحلة من النمو، واستمرت الزيادة في الفعالية بصورة طفيفة خلال فترة النمو اللاحقة، وهذه النتيجة جاءت مشابهة لحد ما لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز المستخلص من كالس نبات الخس (عبود، 1997)، ولكنها تختلف عما وجد في كالس نبات زهرة الشمس، حيث قلّت الفعالية للأنزيم بعد فترة نمو 15 يوما (Mohammed et al., 1989) . اتخذ نمط الزيادة في كمية الفوليت الكلية نمطاً مشابهاً لحد ما لنمط الزيادة في الفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز خلال مراحل النمو المختلفة . إضافة إلى ذلك أوضحت النتائج بأن الزيادة في المحتويات الخلوية للكالس من DNA و RNA والبروتين اتخذت أنماطاً مشابهة لحد ما لنمط الزيادة في الفعالية النوعية للأنزيم وكمية الفوليت الكلية خلال مراحل نمو الكالس المختلفة، وهذا يؤكد دور مركبات الفوليت في بناء الأحماض النووية والبروتينات من خلال مشاركتها في بناء نيوكليوتيدات البيورين والثايمدين وبعض الأحماض الأمينية (Jabrin, 2003) . ومن

دون شك فان الزيادة الكبيرة في العمليات البنائية المهمة مثل عملية بناء البروتين والأحماض النووية والانقسامات المتكررة للخلايا، تؤدي إلى زيادة الوزن الطري للكالس (محمد وعمر، 1990) .

المصادر العربية

البكر، رحاب عبد الجبار حامد عبد ا ، 2002 . دور بعض منظمات النمو القياسية والمصنعة حديثاً في استحداث ونمو وتمايز الكالس من نبات الحبة السوداء *Nigella sativa* L. ومستوى المركبات الفعالة فيها . رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق .

العاني، أوس هلال، 1998 . دراسة مكونات الحبة السوداء المحلية *Nigella sativa* L. وتأثير مستخلصاتها على بعض الأحياء المجهرية . رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية .

عبود، ساجدة عزيز، 1986 . وجود وخواص ومثبطات أنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز في كالس نبات زهرة الشمس . رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

عبود، ساجدة عزيز، 1997 . دور حامض الفوليك في بناء البريميدينات والبيورينات في كالس نبات الخس (*Lactuca sativa* L.) . أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق .

محمد، عبد المطلب سيد وعمر، مبشر صالح، 1990 . المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والأنسجة والأعضاء للنبات . مطبعة جامعة الموصل، العراق .

النعيمي، مها محمد طه حسن، 2004 . تأثير تداخل بعض منظمات النمو والسلفانيل أمايد في استحداث ونمو الكالس والمزارع الخلوية لنبات الحبة السوداء (*Nigella sativa* L.) . رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

المصادر الاجنبية

Albani, D., Parisi, B., Carbonera, D. and Cella, R., 1985. Dihydrofolate reductase from *Daucus carota* cell suspension culture, purification, molecular and kinetic characterization. Plant. Mol. Biol. 5: pp.363-372.

Al-Chalabi, K. and Gutteridge, W.E., 1977. Catabolism of deoxythymidylate in some Trypanosomatids. Parasitol. 74: pp.299-312.

Al-Chalabi, K., Mohammad, A.M.S. and Abood, S.A., 1990. Purification and properties of dihydrofolate reductase from sunflower callus. J. Coll. Educ. 2: pp.239-391.

Al-Jassir, M.S., 1992. chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sative* L.) seeds growing in Saudi Arabia. Food. Chem., 45: pp.239-242.

Arnon, D.I. and Hoagland, D.R., 1940. Crop production in artificial culture solutions and in soil with special reference to factor influencing yields and absorption of organic nutrients. Soil. Sci. 50: 436 p.

Arnon, D.I. and Hoagland, D.R., 1944. The investegation of plant nutrition by artificial culture methods. Biol. Rev. 19: pp.55-67.

Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), 1950. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 7th ed., Washington, D.C. 784 p.

Burton, K., 1956. A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribose nucleic acid. Biochem. J. 62: pp.315-323.

Cherry, J.H., 1962. Nucleic acid determination in storage tissue of higher plants. Plant Physiol., 37: pp.670-678.

Douce, R., Bourgnignon, J., Neuburger, M. and Rebeille, F., 2001. The glycine decarboxylase system afascinating complex. Trends Plant Sci. 6: pp.167-176.

Elcock, A.H., Potter, M.J., Mathews, D.A., Knighton, D.R. and McCammon, J.A., 1996. Electrostatic channeling in the functional enzyme dihydrofolate reductase-thymidylate synthase J. Mol. Biol. 262: pp.370-400.

Fangman, W.L., 1969. Specificity and efficiency of thymidine incoporation in *E. coli* lacking thymidine phosphorylase. J. Bacteriol . 99: pp.681-687.

Giles, K.W. and Mayer, A., 1965. An improved diphenylamin reagent for estimation of DNA concentration. Nature. 20:93 p.

Giles, K.W. and Mayer, A., 1967. Determination of DNA concentration with diphenylamine reagent. Methods in Enzymology. 12:163 p.

Jabrin, S., Ravanel, S., Gambonnet, B., Douce, R. and Rebeille, F., 2003. One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. Plant. Physiol. 131: pp.1431-1439.

Jinoch, P., Zak, R., Janouskova, O., Kunke, D., Rittich, S., Duskova, M., Sobotkova, E., Marinor, I., Andelova, M., Smahel, M. and Vonka, V., 2003. Immunization with live HPV-16-transformed mouse cells expressing, the herpes simplex thymidine kinase and either GM-CSF or IL-2. Int. J. Oncol., 23: pp.775-783.

Katayanagi, S., Aoki, T., Takagi, Y., Ito, K., Suda, H., Tsuchida, A. and Koyanaji, Y., 2003. Measurement of serum thymidine phosphorylase immunosorbent assay in gastric cancer. Oncol. Rep. 10: pp.115-119.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: pp.265-275.

Mohammad, A.M.S., Al-Calabi, K.A. and Abood, S.A., 1989. The occurrence and properties of dihydrofolate reductase isolated from sunflower callus. J.Exp. Bot. 40: pp.693-699.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: pp.473-497.

Naghma, K., Sonia, S. and Sarwat, S., 2003. *Nigella sativa* (black cumin) ameliorates potassium bromate-induced early events of carcinogenesis: diminution of oxidative stress. Hum. Exp. Toxicol. 22: pp.193-203.

Neil, P.O., Rulinen, B.R., Donald, R.S. and Anderson, A., 2003. The crystal structure of dihydrofolate reductase-thymidylate synthase from *Cryptosporidium hominis.* J. Euk. Micro. 50: pp.556-565.

Oliver, D.J., 1994. The glycine decarboxylase complex from plant mitochondria. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 45: pp.323-337.

Osborne, M.J. and Huennekens, F.M., 1958. Enzymatic reduction of dihydrofolic acid J.Biol. Chem. 233: pp.969-974.

Reddy, A. and Rao, N.A., 1976. Dihydrofolate reductase from soybean seedlings characterization of the enzyme purified by affinity chromatography. Archs. Biochem. Biophys. 174: pp.675-683.

Schwartz, M., 1971. Thymidine phosphorylase from *E. coli*. Properties and kinetics. Eur. J. Biochem. 21: pp.191-198.

Suzuki, N. and Iwai, K., 1970. The occurrence and properties of dihydrofolate reductase in pea seedling. Plant Cell Physiol. 11: pp.199-208.

Wu, K., Atkinson, I.J., Cossina, E.A. and King, J., 1993. Methotrexate resistance in *Datura innoxia*. Uptake and metabolism of methotrexate in wild-type and resistant cell lines. Plant Physiol. 101: pp.477-483.

Xu, Y., Georges, F., Gerday, G. and Glansdorff, N., 2003. Moritella cold-active dihydrofolate reductase: Are there natural limits to optimization of catalytic efficiency at low temperature. J. Bacteriol. 185: pp.5519-5526.