تأثير السكروز والتايروسين في استحثاث الكالس وانتاج المورفين والكودائين من نبات الخشخاش *Papaver somniferum* خارج الجسم الحي

Influence of sucrose and tyrosine on callus induction and morphine and codeine production on *Papaver somniferum* in vitro

سرّاب عبد الهادي المختار*

ابراهيم عبد الله حمزة

محمد شهاب حمد

كلية الزراعة / جامعة بغداد

* وزارة العلوم والتكنولوجيا

M . S . Hamad

I. A. Hamza

S . A . Al-Muktar*

College of Agriculture/ University of Baghdad

* Ministry of Science and Technology

المستخلص

اجريت الدراسة في مختبرات زراعة الانسجة النباتية - كلية الزراعة - جامعة بغداد ومختبرات مركز الرقابة والبحوث الدوائية في وزارة الصحة خلال عامي 2006-2007 . اعطى الوسط MS المجهز تركيز 30 غم/لتر سكروز اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ (630.0 ، 61.6) ملغم على التوالي . وانخفض معدل الوزن الطري والجاف للكالس بزيادة تركيز السكروز الى (120 ، 90 ، 60) غم/لتر فبلغ (478.2 ، 346.5 ، 217.6) ملغم للوزن الطري و (46.8 ، 34.3 ، 21.0) ملغم للوزن الجاف على التوالي . وتشير النتائج الى ان وسط MS المجهز بتركيز 30 ملغم/لتر تايروسين اعطى اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ (429.7 ، 42 ، 6) ملغم على التوالي . وبيّنت النتائج ان الوسط MS المجهز بتركيز 30 غم/لتر من السكروز و 30 ملغم/لتر تايروسين قد اعطى اعلى معدل للكالس على اساس الوزنين الطري والجاف بلغ (688.0 ، 67.5) ملغم على التوالي . وتفوق الوسط MS المجهز بتركيز 90 غم/لتر سكروز وسجل اعلى قيمة عند التركيز 30 ملغم/لتر من التايروسين لقتويدي المورفين والكودائين فبلغ (2.9 ، 2.8) ملغم/غم وزن طري للكالس على التوالي . بينما كانت اقل القيم للمورفين والكودائين عند معاملة المحاييد بلغ (0.5 ، 0.2) ملغم/غم من الكالس الطري على التوالي .

Abstract

A study was conducted at the tissue culture lab. College of Agriculture/ University of Baghdad and Drug Research Center/ Health Ministry during 2006 - 2007. Results indicated that MS medium supplemented with 30 g/l of sucrose gave the highest values (630.3, 61.6) mg of both fresh and dry weight of callus respectively. However, values of both parameters were reduced with increasing sucrose concentrations up to 60, 90, 120 g/l (478.2, 346.5, 217.6) mg respectively. MS medium supplemented with 30 mg/l of tyrosine gave the highest values of callus fresh and dry weight (429.7, 42.6) mg respectively. MS medium supplemented with 30 g/l of sucrose and 30 mg/L tyrosine gave the highest values (688.0, 67.5) mg of both fresh and dry weight callus. MS medium supplemented with 30 mg/l of tyrosine and 90 g/l of sucrose gave the highest values (2.9, 2.8) mg/g of morphine and codeine from fresh callus weight respectively while the lowest values of morphine and codeine (0.5K 0.2) mg/g from fresh callus weight respectively of control treatment .

المقدمة

يحتل نبات الخشخاش *Papaver somniferum* الذي يعود الى العائلة الخشخاشية Papaveraceae اهمية طبية واقتصادية كبيرة لاحتوائه على قلويدات عديدة [1] وقد شخص اكثر من 40 قلويد في هذا النبات . كان منها 25 قلويد على الاقل موجودة في الافيون opium [2] .

ان استخدام المنتجات الطبيعية للنباتات الطبية في المجال الصيدلاني معروفة منذ القدم بوصفها مصدراً جيداً للمنتجات الطبية ولها فعالية دوائية مؤكدة . وقد اشارت منظمة الصحة الدولية الى ان 80% من سكان العالم يعتمدون على الادوية من مصادر نباتية في العلاج الطبي [2] .

تنتج الخلايا النباتية نوعين من نواتج الايض هي نواتج الايض الاولى التي تشترك مباشرة في نمو وايض النبات كالكاربوهيدرات والليبيدات والبروتينات من خلال عملية التمثيل الضوئي والتنفس ونواتج الايض الثانوي التي هي نواتج وسطية للايض الاولى مثل القلويدات وغيرها . وقد ذكر [3] ان نواتج الايض الثانوي هي مركبات مصنعة حيويًا مشتقة من الايض الاولى ، وغالباً ماتتجمع هذه المركبات في خلايا وانسجة نباتية خاصة في مراحل تطور محددة من زراعة الخلايا والانسجة النباتية مقارنة بمركبات الايض الاولى التي تنتج بالنبات كاملاً او في عضو معين [4] . وقد اكد [5] الى ان المواد المحفزة لتراكم المركبات الثانوية في النباتات وفي المزارع النسيجية تتضمن NaCl و KCl وحامض الابرسيك ABA والسكريات وغيرها اذ انها تزيد من الجهد الازموزي للخلايا النباتية ، اضافة الى الشد stress المتسبب عن انخفاض او ارتفاع درجات الحرارة . كما وجد [6] ان زيادة تركيز السكر المضاف للوسط الغذائي من (3-6)% سبب زيادة في انتاج قلويد المورفين في المزارع الخلوية لنبات الخشخاش . كما لوحظ ان القلويدات المورفينية في انسجة كالس نبات الخشخاش تتراكم في المراحل المتأخرة في طور التسارع Exponential phase وان اغنى اجزاء الخلية بالمادة القلويدية هي الفجوات والساييتوبلازم [7] .

ويعد المورفين morphine واملاحه مواد مسكنة Analgesic و مخدرة Narcotic وهي ايضاً منومة فهو يؤثر في الجهاز العصبي المركزي بالجسم [8] . وبالرغم من ان مفعول الكودائين codeine يشابه مفعول المورفين الا انه اقل سمية واقل خطورة في حالة الادمان عليه مقارنة بالمورفين والتي يتم تخليقها في اغلب المزارع الخلوية لنبات الخشخاش كأن تكون كالس او خلايا معلقة [9] . وقد بين [10] مسار التخليق الحيوي للقلويدات الافيونية من L-Tyrosine كما ان اضافة هذا البادئ الى اوساط مزارع الكالس يؤدي الى زيادة في انتاج هذه القلويدات .

ونظراً لاهمية القلويدات عموماً وقلويدات الافيون opium alkaloid خصوصاً في العلاج الطبي والصيدلاني والتي تتواجد في نباتات العائلة الخشخاشية كنواتج ابيض ثانوي وفي مقدمتها قلويد المورفين ولأجل السيطرة على انتاجه لاغراض صيدلانية وحصره حكومياً وعدم التجارة به هدفت هذه الدراسة الى حث انسجة الكالس على زيادة انتاجها من مواد الايض الثانوي عن طريق تعريضها الى اجهاد معين مع اضافة البادئ التخليقي المناسب والكشف كما ونوعاً عن هذه المركبات باستخدام جهاز كروماتوغرافيا السائل ذي الاداء العالي (HPLC) .

المواد وطرائق العمل

1. زراعة الكالس في الوسط الغذائي المجهز بتراكيز مختلفة من السكر والسايروسين

اخذ وزن 150 ملغم من الكالس المستحث من القمة النامية لبادرات الخشخاش وزرع على الوسط MS [11] المجهز بالتركيز 2 ملغم /لتر من 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) و 0.5 ملغم/لتر من الكاينتين Kinetin . واضيف السكر بالتراكيز (30 ، 60 ، 90 ، 120) غم/لتر و التايروسين بالتراكيز (0 ، 10 ، 20 ، 30 و 40) ملغم /لتر الى الوسط الغذائي . حضنت الزروعات في الظلام وعلى درجة حرارة 25±2 م . وبعد خمسة اسابيع اخذ الوزن الطري والجاف للكالس بأستخدام ميزان حساس ثم اجريت عملية الاستخلاص .

2. استخلاص القلويدات من الكالس

اخذ وزن 2.5 غم من الكالس الطري لكل معاملة ثم غسل بالماء المقطر للتخلص من بقايا الوسط الغذائي . ثم عومل وفق المخطط الاتي:

3. التقدير النوعي والكمي للقلويدات المورفينية باستعمال جهاز الكروماتوغرافيا السائل ذي الاداء العالي (HPLC)

- تحضير المحلول القياسي من المورفين

اخذ 10 ملغم من المورفين وكان على شكل (Morphine sulphate injection) وخفف باستعمال 10 مل من الايثانول ليكون التركيز النهائي (Morphine sulphate: Ethanol) 1 mg /1 ml

- تحضير المحلول القياسي للكودائين

أخذ 10 ملغم من الكودائين من نوع codeine phosphate 99.93% وخفف في 10 مل من الايثانول ليكون التركيز النهائي للمحلول القياسي 1 mg / 1 ml (Codeine phosphate : Ethanol). ثم سحب مقدار 1 سم³ لكل من المحاليل القياسية للمورفين والكودائين وحقن في جهاز الـ HPLC لتحديد زمن الاحتجاز وارتفاع حزمة العينة لكلا المحلولين القياسيين وقد قيست القراءات على طول موجي قدره 285 نانوميتر وحسب زمن الاحتجاز وتركيز العينات حسب المعادلة الآتية:

$$\text{التركيز (ملغم)} = \frac{\text{ارتفاع حزمة العينة} \times \text{تركيز المحلول القياسي}}{\text{ارتفاع حزمة المحلول القياسي}}$$

حسب طريقة [13].

4- التحليل الاحصائي

نفذت جميع التجارب باستخدام التصميم العشوائي الكامل CRD وبتجارب عاملية وحللت النتائج باستخدام البرنامج الاحصائي SAS [14] وقورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي LSD وعلى مستوى احتمال 0.05.

النتائج والمناقشة

تأثير تراكيز السكروز والتايروسين في معدل الوزن الطري للكالس (ملغم)

يوضح جدول (1) انخفاض معدل وزن الكالس الطري معنوياً بزيادة تراكيز السكروز المضافة. اذ اعطى الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 30 غم/لتر سكروز اعلى معدل وزن طري للكالس بلغ 630.3 ملغم. وانخفض معدل وزن الكالس الطري بزيادة تراكيز السكروز الى (60 ، 90 ، 120) غم/لتر وبلغ (478.2 ، 346.5 ، 217.6) ملغم على التوالي.

ويشير الجدول نفسه الى ان الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 30 ملغم/لتر من التايروسين اعطى اعلى معدل وزن طري بلغ 429.7 ملغم واختلف معنوياً عن بقية المعاملات. اما فيما يتعلق بالتداخل بين تراكيز السكروز والحامض الاميني التايروسين فيظهر من جدول (1) ان هناك زيادة في معدل الوزن الطري للكالس في وسط MS المجهز بتركيز 30 غم/لتر سكروز و 30 ملغم/لتر من التايروسين بلغ 688 ملغم والذي اختلف معنوياً عن بقية التداخلات. وقد يعزى سبب تفوق الوسط الغذائي المجهز بـ 30 غم/لتر سكروز في وزن الكالس الطري الى ان السكروز هو المصدر الكربوهيدراتي الذي يزود الخلايا بالطاقة اللازمة للنمو والبقاء [15] وعند زيادة تراكيز السكروز المضافة الى الوسط الغذائي عن المستوى المناسب يسبب زيادة في الشد او الجهد الاوزموزي المسلط على الخلايا الذي يسبب انخفاضاً في جاهزية الماء وبالتالي المواد الغذائية الذائبة فيه والذي يؤثر في نمو الكالس وايض بعض المركبات الخلوية [5] وبالتالي فان السكروز المضاف الى الوسط الغذائي يعد مصدراً للطاقة فضلاً عن المحافظة على جهد اوزموزي مناسب في وسط الزراعة [15] ويعد عامل معنوي في ايض خلايا النبات اذ يعمل السكروز في زيادة انتاج مركبات الايض الثانوية. وهذا يتفق مع ماوجده [16] في كالس نبات الخشخاش.

جدول (1): تأثير تراكيز السكروز والتايروسين في معدل الوزن الطري للكالس (ملغم) المستحث من القمة النامية لبادرة الخشخاش المزروع على وسط MS بعد خمسة اسابيع من الزراعة (الوزن الابتدائي 150 ملغم)

المعدل	تايروسين ملغم/لتر					سكروز
	40	30	20	10	0	غم/لتر
630.3	655.0	688.0	660.5	623.3	525.0	30
478.2	590.0	545.0	490.0	446.3	400.0	60
346.5	325.1	305.0	345.5	362.2	395.1	90
217.6	190.7	181.0	199.2	250.3	267.1	120
19.5			25.5			أ.ف.م 0.05
	420.2	429.7	423.8	420.5	396.8	المعدل
			5.5			أ.ف.م 0.05

تأثير تراكيز السكروز والتايروسين في معدل الوزن الجاف للكالس (ملغم)

يوضح جدول (2) انخفاض معدل وزن الكالس الجاف معنوياً بزيادة تراكيز السكروز المضافة . اذ اعطى الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 30 غم/لتر سكروز اعلى معدل وزن جاف للكالس بلغ 61.6 ملغم . وانخفض معدل وزن الكالس الجاف بزيادة تراكيز السكروز الى (60 ، 90 ، 120) غم/لتر فبلغ (46.8 ، 34.3 ، 21.0) ملغم على التوالي . ويشير الجدول نفسه الى ان الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 30 ملغم/لتر من التايروسين اعطى معدل وزن جاف بلغ 42.6 ملغم . اما فيما يتعلق بالتداخل بين تراكيز السكروز والتايروسين فيوضح الجدول نفسه ان هناك زيادة في معدل الوزن الجاف للكالس في الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 30 غم/لتر سكروز و 30 ملغم/لتر تايروسين . وقد يعزى سبب الانخفاض في معدل الوزن الجاف للكالس في الوسط الغذائي بزيادة تراكيز السكروز المضافة للوسط الى نفس العوامل التي ادت الى انخفاض وزنه الطري في جدول [1] اضافة الى ان المحتوى الساييتوبلازمي للخلايا النباتية المعرضة لظروف الشد يصبح اكثر كثافة واقل حجماً عند نقص الماء في تلك الخلايا [17] وهذا يتفق مع ماتوصل اليه [16] في نبات عين البزون و [18] في نبات الخشخاش .

جدول (2): تأثير تراكيز السكروز والتايروسين في معدل الوزن الجاف للكالس (ملغم) المستحث من القمة النامية لبادرة الخشخاش المزروع على وسط MS بعد خمسة اسابيع من الزراعة

سكروز غم/لتر	0	10	20	30	40	المعدل
30	52.0	60.0	65.6	67.5	63.0	61.6
60	40.0	43.0	46.0	55.0	50.0	46.8
90	39.0	36.5	33.9	30.0	32.5	34.3
120	26.0	23.0	19.5	17.9	19.0	21.0
أ.ف.م 0.05			3.9			2.9
المعدل	39.2	40.6	41.2	42.6	41.1	
أ.ف.م 0.05			1.5			

تأثير تراكيز السكروز والتايروسين في محتوى الكالس الطري من المورفين والكودائين (ملغم/غم)

يلاحظ من النتائج المبينة في جدول (3) والمقدرة بجهاز HPLC ان هناك زيادة في كمية قلويدي المورفين والكودائين المستخلصة من الكالس الطري للقمة النامية لبادرة الخشخاش استجابة لزيادة تراكيز السكروز والتايروسين المضافة الى الوسط الغذائي . حيث يتبين من الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 30 غم/لتر سكروز ان هناك استجابة في انتاج القلويدات بزيادة تراكيز التايروسين المضافة للوسط ووجود مستوى ثابت من السكروز . حيث بلغت اقل قيمة عند معاملة المحايد (0.5 ، 0.2) ملغم/غم من المورفين والكودائين على التوالي شكل (1) . واعلى قيمة في الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 30 ملغم/لتر من التايروسين بلغ (1.5 ، 1.2) ملغم/غم من المورفين والكودائين على التوالي شكل (2) . ثم انخفضت الاستجابة بزيادة تركيز التايروسين الى 40 ملغم/لتر اذ اعطى (1.4 ، 1.1) ملغم/غم من المورفين والكودائين على التوالي شكل (3) كما بينت نتائج الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 60 غم/لتر سكروز ان هناك استجابة اعلى من الوسط السابق في انتاج قلويدي المورفين والكودائين بزيادة تركيز التايروسين المضافة للوسط اذ بلغت اقل قيمة عند معاملة المحايد (1.0 ، 0.7) ملغم/غم مورفين وكودائين على التوالي كما في شكل (4) ، واعلى قيمة عند التراكيز 30 ملغم/لتر

جدول (3): تأثير تراكيز السكروز والتايروسين في محتوى الكالس الطري من المورفين والكودائين (ملغم/غم) بعد خمسة اسابيع من الزراعة

سكروز غم/لتر	نوع القلويد	0	10	20	30	40
30	مورفين	0.5	0.9	1.3	1.5	1.4
	كودائين	0.2	0.6	1.0	1.2	1.1
	مورفين	1.0	1.6	1.9	2.1	2.0
60	كودائين	0.7	1.0	1.4	1.7	1.6
	مورفين	1.3	2.4	2.5	2.9	2.7
	كودائين	1.2	1.8	2.2	2.8	2.4
90	مورفين	1.1	1.6	1.9	2.3	2.2
	كودائين	0.8	1.2	1.5	1.9	1.7
120	كودائين

شكل (2): كمية المورفين والكودائين (ملغم/غم) في وسط مجهز بـ 30 غم/لتر سكروز و 30 ملغم/لتر تايروسين

شكل (1): كمية المورفين والكودائين (ملغم/غم) في وسط مجهز بـ 30 غم/لتر سكروز و 0 ملغم/لتر تايروسين

شكل (4): كمية المورفين والكودائين (ملغم/غم) في وسط مجهز بـ 60 غم/لتر سكروز و 0 ملغم/لتر تايروسين

شكل (3): كمية المورفين والكودائين (ملغم/غم) في وسط مجهز بـ 30 غم/لتر سكروز و 40 ملغم/لتر تايروسين

تايروسين اذ بلغ (2.1 ، 1.7) ملغم/غم مورفين وكودائين على التوالي كما في الشكل (5) . ثم قلت الاستجابة بزيادة تركيز التايروسين الى 40 ملغم/لتر تايروسين اذ بلغ (2.0 ، 1.6) ملغم/غم مورفين وكودائين على التوالي كما موضح في الشكل (6) . وقد تفوق الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 90 غم/لتر سكروز فأعطى أعلى استجابة في كمية القلويدات بزيادة تراكيز التايروسين المضافة الى الوسط ووجود مستوى ثابت من السكر . حيث بلغت اقل قيمة (1.3 ، 1.2) ملغم/غم مورفين وكودائين على عند معاملة المحاييد كما في الشكل (7) وأعلى قيمه عند التركيز 30 ملغم/لتر من التايروسين اذ بلغ (2.9 ، 2.8) ملغم/غم مورفين وكودائين على التوالي كما في شكل (8) .

شكل (6): كمية المورفين والكودائين (ملغم/غم) في وسط مجهز بـ 60 غم/لتر سكروز و 40 ملغم/لتر تايروسين

شكل (5): كمية المورفين والكودائين (ملغم/غم) في وسط مجهز بـ 60 غم/لتر سكروز و 30 ملغم/لتر تايروسين

شكل (8): كمية المورفين والكودائين (ملغم/غم) في وسط مجهز بـ 90 غم/لتر سكروز و 30 ملغم/لتر تايروسين

شكل (5): كمية المورفين والكودائين (ملغم/غم) في وسط مجهز بـ 90 غم/لتر سكروز و 0 ملغم/لتر تايروسين

ثم قلت الاستجابة بزيادة تركيز التايروسين الى 40 ملغم/لتر اذ بلغ (2.7 ، 2.4) ملغم/غم مورفين وكودائين على التوالي شكل (9) ثم قلت الاستجابة لانتاج القلويدات في الوسط الغذائي المجهز بتركيز 120 غم/لتر سكروز وتركيز مختلفة من التايروسين ، اذ بلغ (1.1 ، 0.8) ملغم/غم مورفين وكودائين على التوالي في معاملة المحايد كما في شكل (10) . وبلغت اعلى قيمة في الوسط الغذائي نفسه عند التركيز 30 ملغم/لتر من التايروسين اذ بلغ (2.3 ، 1.9) ملغم/غم مورفين وكودائين على التوالي كما في شكل (11) ، وبعدها قلت الاستجابة بزيادة تركيز التايروسين الى 40 ملغم/لتر اذ بلغ (2.2 ، 1.7) ملغم/غم مورفين وكودائين على التوالي كما موضح شكل (12) .

شكل (10): كمية المورفين والكودائين (ملغم/غم) في وسط مجهز بـ 120 غم/لتر سكروز و 0 ملغم/لتر تايروسين

شكل (9): كمية المورفين والكودائين (ملغم/غم) في وسط مجهز بـ 90 غم/لتر سكروز و 40 ملغم/لتر تايروسين

شكل (12): كمية المورفين والكودائين (ملغم/غم) في وسط مجهز بـ 120 غم/لتر سكروز و 40 ملغم/لتر تايروسين

شكل (11): كمية المورفين والكودائين (ملغم/غم) في وسط مجهز بـ 120 غم/لتر سكروز و 30 ملغم/لتر تايروسين

وقد يعود السبب في زيادة انتاج القلويدات بزيادة تراكيز التايروسين المضافة الى كونه البادئ التخليقي للعديد من قلويدات ال-phenanthrene [19]. كما ذكر [20] ان زيادة تراكيز الاحماض الامينية المضافة يؤدي الى زيادة المركبات النتروجينية الذائبة في داخل الخلايا مما يؤدي الى زيادة جهدها الاوزموزي الامر الذي يدفعها لسحب الماء من الخلايا المجاورة فتتملى وتضغط على جدار الخلية الذي ربما يؤدي الى اتلاف الخلايا والذي له تأثير سلبي في محتواها من المركبات الثانوية او قد يعود السبب الى ان زيادة الاجهاد قد يسبب انخفاض قابلية الخلايا في امتصاص العناصر الغذائية التي تحتاجها بكفاءة لانتاج مركبات الايض الاولى وبالتالي قلة انتاج الايض الثانوي الذي يعد ناتج نهائي للايض الاولى [3]. ويلاحظ ان هناك زيادة تدريجية في كمية قلويدي المورفين والكودائين في مستخلص كالس نبات الخشخاش بزيادة تراكيز السكر المضافة للوسط حيث ان تعريض نسيج الكالس الى ظروف الشد Stress يؤدي الى تحفيز خلاياه لانتاج مركبات الايض الثانوي وبكميات اكبر من النبات الام وهذا ما اكده [5]. وتتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه [4، 21] في المزارع النسيجية للكالس.

المصادر

1. Paul, L. and J.R. Schiff. (2002). Opium and its Alkaloids, School of Pharmacy, Pittsburgh, pp. 1561.
2. Hartmann, t. (2004). Plant – derived secondary metabolites as dehesive chemicals herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta* 219: 1-4.
3. Taiz, L. and E. Zeiger. (2006). Plant physiology. 4th Ed.
4. Lila, M. (2005). Secondary production from *in vitro* culture. Chapter 24. Secondary production from *in vitro*, CRC. Press, LLC
5. Zhao, J.; Q. Hu; Q. Guo and W. H. Zhu. (2001)b. effects of Stress Factors, and synthetic precursor on indole alkaloids production in callus cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol.* 55.: 693-698.
6. Kassem, A. and A. Jacquin. (2001). Somatic embryogenesis, rhizogenesis, and morphinan alkaloids production in two species of opium poppy. *Jornal of Biomedicine and Biothechnology* [2]: 70-78.
7. Huang, F.C. and T.M. Kutchan. (2000). Distribution of morphinan benzophenathrine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 555-564.
8. Al-Cantra, J.B.; A. David; R.V. Franceschi and P.J. Facchini. (2005). Sanquinarine Biosynthesis is Associated with the Endoplasmic Reticulum in Cultured opium poppy Cells. *American Society of Plant Physiology* 138: 73-83.
9. Tripathi, L. and J.N. Tripathi. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical. Pharmaceutical Research*, Vol. 2, No. 2, pp. 243-253.
10. Furaya, T.; A. Ikuta and K. Syono. (1999). Alkaloids from callus tissue of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 11: 3041-3044.
11. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacoo tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 437-497.
12. Dhar, H.K. and B.K. Bath. (1982). Ontogenic Variability in Alkaloids Synthesis and other Morphological Characteristic in Five Genotypes of Belladonna. *Natural Products*. 45: 525-531.
13. Vincent, P.G. and B.F. Engelke. (1979). High pressure liquid chromatography determination of five major alkaloids in *Papaver somniferum*. *Assoc. of Analchem.* 62: 310-314.

14. SAS, 2002. STAT User Guide for Personal Computer SAS. Institute Inc, Cary, N.C. USA.
15. George, E.F.; M.A. Hall G. JanDeklerk. (2008). Plant propagation by tissue culture. 3rd edition. Volume 1.
16. Nessler, C.L. 2007. Somatic embryogenesis in the (*Opium poppy*) *Papaver somniferum* , Phytochemistry Reviews, 6:1, 79.
17. Orcutt, D.M. and E. T. Nilsen. (2000). The physiology of plants under stress.
18. ساعور ، كوكب يعقوب وصباح مهدي وعلي صادق محمد . (2000) . الكشف والتقية والتقدير الكمي لمركب الفانكستر في خلايا كالس نبات عين البزون *Catharanthus roseus* . مجلة ابحاث التقانة الحياتية . 53-52 :[1]2 .
19. Khanna, R.; A.K. Mathur and N.K. Mehrotra. (2005). Selection of 3-fluorotyrosine tolerant callus lines in two cultivar of *Papaver somniferum*. Vol. 88. No. 1.
20. Coruzzi, G.M. and R.L. Last. (2000). Amino acid Biochemistry and Molecular Biology of Plant. American Society of Plant Physiology pp 358-410.
21. Ramawat, k.G. (2004). Plant biotechnology. S. Chand and Company LTD, Ram Nagar, New Delhi.