تقدير بعض القلويدات في النموات الخضرية والجذرية لنبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. المكثرة خارج الجسم الحي بإستخدام تقانة كروماتوغرافيا السائل الفائق الأداء

هبة نواف العكيدي[1] بشار زكي قصاب باشي

قسم البستنة وهندسة الحدائق/كلية الزراعة والغابات/جامعة الموصل

الخلاصـة

تناولت هذه الدراسة تقدير بعض القلويدات لنبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. المكثرة خارج الجسم الحي من خلال نشوء وتضاعف العقد بزراعتها على وسط MS المزود بتراكيز مختلفة من BA (0.0، 0.25، 0.5، 0.75، 1.0) ملغم. لتر$^{-1}$ ومن ثم تجذير النموات الناتجة من التضاعف على وسط MS المزود بتراكيز مختلفة من IBA أو IAA (0,0، 0,5، 1,0، 1,5، 2,0) ملغم/لتر، تم تقدير بعض القلويدات في المجموع الخضري والجذري الناتج من تضاعف العقد والمتمثلة بـ قلويدات Atropine وHyoscyamine Sulfate وScopolamine وTropine بإستخدام تقانة كروماتوغرافيا السائل الفائق الأداء. تشير النتائج الحصول على أعلى معدل لعدد الأفرع 7,00 فرع/جزء نباتي من زراعة العقد على وسط MS المزود بـ 0.75 ملغم/لتر BA وذلك بعد 8 أسابيع من الزراعة. زراعة أطراف الأفرع الناتجة من التضاعف على وسط MS المزود بـ 1,5 ملغم/لتر IBA أدت الى الحصول على نسبة تجذير 100 ٪ وبأعلى معدل لعدد الجذور 51,30 جذر/فرع وذلك بعد 4 أسابيع من الزراعة. إذ تم الحصول على أعلى تركيز لـ Atropine (0,09) ملغم/غم وزن رطب عند زمن الإحتباس (3,564) ومساحة تحت المنحني (22,6) من عينة مستخلص الجذور للمعاملة 1,5 ملغم/لتر IBA، في حين كانت أعلى قيمة إمتصاص لـ Hyoscyamine Sulfate (0,10) ملغم/ غم وزن رطب عند زمن إحتباس (3,508) ومساحة تحت المنحني (24,2) من عينة مستخلص الجذور معاملة 2,0 ملغم/لتر IBA ، وإن هذه المعاملة بدورها أعطت أعلى تركيز لـ Tropine (0,32) ملغم/غم وزن رطب عند زمن الإحتباس (2,914) وكانت مساحتها تحت المنحني (59,0)، أما أعلى تركيز لـ Scopolamine كان (0,07) ملغم/غم وزن رطب من عينة مستخلص الجذور معاملة 0,5 ملغم/لتر IBA عند زمن الإحتباس (2,892) وكانت مساحتها تحت المنحني (17,7).

الكلمات المفتاحية:
ست الحسن، قلويدات

للمراسلة:
بشار زكي قصاب باشي
البريد الالكتروني:
bashybashar@yahoo.com

Determination of Some Alkaloids in Vegetative and Rooting Growth of *Atropa belladonna* L. *In Vitro* by Using High Performance Liquid Chromatography

Hiba N. A. Al-Akaidi and Bashar Z. Kassab Bashi
College of Agriculture and Forestry –Mosul Univ. Iraq

ABSTRACT

Key words:
Belladonna, Alkaloids.

Correspondence:
Bashar Z.K.Bashi
E-mail:
bashybashar@yahoo.com

This study was conducted to determind some alkaloids in *Atropa belladonna* L. plant by multiplication of nodes cultured on MS medium supplemented different concentreations of BA (0.0, 0.25,0.5 , 0.75, 0.1) mg/l, shoots produced *in vitro* cultured on MS medium supplemented with different concentrations of IBA or IAA (0.0, 0.5, 1.0,1.5, 2.0) for rooting, Then determined some alkaloids in multiple nodes or roots such as Atropine, Hyoscyamine Sulfate, Scopolamine, Tropine. Data refers that highest shoots number 7.00 mg/l shoot/explant achieved from cultered nodes on MS medium supplemented with 0.75 mg/l BA after 8 weeks. Shoots cultured on MS medium supplemented with different concentrations of IBA gave highest roots number 51.30 root/explant from cultered shoots on MS medium supplemented with 1.5 mg/l IBA after 4 weeks. Highest concentrations of Atropine (0.09) mg/g at retention time (3.564) with detected area of (22.6) obtained from roots sample at treatment 1.5 mg/l IBA, Where as highest concentrations of Hyoscyamine Sulfate (0.10) mg/g at retention time (3.508) with detected area of (24.8) obtained from roots sample at treatment 2.0 mg/l IBA, And this treatment gave highest concentrations of Tropine (0.32) mg/g at retention time (2.914) with

[1] البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الاول

detected area of (59.0), highest concentrations of Scopolamine (0.07) mg/g at retention time (3.892) with detected area of (17.7) obtained from roots sample at treatment 0.5 mg/l IBA.

المقدمة:

يعود نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. والمعروف بإسم Belladonna الى العائلة الباذنجانية Solanaceae التي تضم 90 جنساً و2000 نوع من النباتات، ويعد وسط أوربا وجنوبها الموطن الأصلي للنبات ومنه أنتشر الى وسط أسيا وغربها وصولاً الى الهملايا وإلى المغرب والجزائر جنوباً، ويزرع في أنكلترا، فرنسا، والولايات المتحدة الأمريكية. ونبات البلادونا نبات معروف منذ القدم إذ إن أول تشخيص للنبات كان في عام 1504م (سعد الدين وأخرون، 2005). وتسمية النبات Atropa يعتقد بأنه أشتق من الألهة اليونانية Atropos أما Belladonna فهو مشتق من اللغة الأيطالية وتعني السيدة الجميلة (Spiegl وFritz، 1996). وإن تسميتها بلادونا يشير الى إستخدامها من قبل النساء الإيطاليات لتوسيع حدقات عيونهن مما يجعلهن أكثر جاذبية (الدجوي، 1996). ولست الحسن أسماء عديدة منها الشب الظريف، بلادونا، عشبة الأتروبين واللفاح (العرقاوي، 2009)، ومن أسمائه أيضاً deadly nightshade، dwale ، banewort ، devils cherries و devils herb (Spiegl و Frtiz،1996). نبات البلادونا عشبي شجيري معمر دائم الخضرة له جذور سميكة والأوراق بسيطة معنقة متقابلة الوضع في الجزء العلوي من النبات ومتبادلة الوضع في الجزء السفلي منه بيضاوية أو قلبية الشكل قمتها حادة وحافتها ملساء ولونها أخضر داكن، الأزهار صغيرة فردية أو مزدوجة نادراً، تخرج من أبط الأوراق وشكلها جرسي ولونها أخضر قرمزي خفيف، الثمار كروية صغيرة كرزية الشكل لونها أخضر يتحول الى الأحمر فالأسود عند النضج وتحتوي بداخلها الكثير من البذور ذات لون أصفر رمادي، يبلغ إرتفاع النبات 100 سم وأحياناً يصل الى 150 سم، يتكاثر النبات بالبذور وأفضل موعد لنثر البذور أول الربيع في المناطق المعتدلة وأول الصيف للمناطق الباردة، وتكون صعبة الانبات بسبب صلابة غلاف البذرة ويحدث الانبات خلال عدة اسابيع من الزراعة (العرقاوي، 2009 والمنظمة العربية للتنمية الزراعية، 1988 والشحات،1986). تعد تقانة الزراعة النسيجية إحدى التقانات الحيوية التي لعبت ولازالت تلعب دوراً مهماً في خدمة الأنسان في مجالات عديدة ومنها إكثار أنواع من النباتات لما تمتاز به هذه الطريقة من ميزات لعل من أهمها الحصول على أعداد هائلة من النباتات الخالية من المسببات المرضية والمشابهة للنبات الأم في وقت قصير نسبياً وفي أي وقت من أوقات السنة، فضلاً عن استعمال هذه التقانة في مجالات بحثية وتطبيقية منها تربية وتحسين النبات وإنتاج العقاقير الطبية والأدوية والإكثار السلالي السريع الذي يعد من التطبيقات ذات الأهمية الكبيرة التي تتم بإتباع طرائق مختلفة للتمايز والتكوين الشكلي مثل تكوين البراعم العرضية وتحفيز نمو البراعم الأبطية وإستحداث الأجنة اللاجنسية (الأجنة الجسمية) فضلاً عن دراسة الجوانب الأساسية لنمو وتطور النبات والأيض الثانوي (Gupta وأخرون، 2006 و Kasumi وأخرون، 2004 و Ford، 2000 والكناني، 1987). إن النباتات ومنذ زمن بعيد لها أهمية بالغة ليس بوصفها مصدراً للغذاء فحسب وإنما تعد مصدراً للحصول على مدى واسع من المواد الكيميائية كالمركبات الدوائية، ومبيدات الأعشاب، والمطيبات، والعطور، والألوان (Dixon، 1985). إذ أوضح Rodr وأخرون (1991) إن زراعة عقد نبات *Datura insignis* الناتجة من الزراعة النسيجية والمزروعة على وسط MS المجهز بـ 0,004 ملغم/لتر NAA مع 0,25 ملغم/لتر BA أعطت أعلى معدل للتضاعف 14,81 فرع/جزء نباتي بعد 4 أسابيع من الزراعة. ووجد Deliu وأخرون (2002) إن زراعة عقد نبات *Scopolia carniolica* الناتجة من الزراعة النسيجية والمزروعة على وسط MS المجهز بـ 0,5 ملغم/لتر TDZ مع 0,1 ملغم/لتر NAA أدت الى الحصول على أعلى نسبة إستجابة للزراعة النسيجية 100 ٪ وبمعدل عدد أفرع 3– 5 فرع/جزء نباتي بعد 4 أسابيع من الزراعة. وبين Loc و Kiet (2011) إن زراعة عقد نبات *Solanum hainanense* الناتجة من الزراعة النسيجية والمزروعة على وسط MS المجهز بـ 0,7 ملغم/لتر BA كونت أعلى معدل لطول الأفرع 2,11 سم بعد 4 أسابيع من الزراعة. وذكر Otroshy وأخرون (2011) إن زراعة عقد نبات الفلفل *Capsicum annuum* L. الناتجة من الزراعة النسيجية والمزروعة على وسط MS المجهز بـ 2 ملغم/لتر BA أعطت أعلى معدل لعدد الأفرع 0,26 فرع/جزء نباتي بعد 4 أسابيع من الزراعة. وعادةً تستخدم عدة أنواع من الاوكسينات لغرض تجذير أطراف الأفرع مثل: IAA و

NAA، وأكثرها شيوعا IBA، إذ ذكر Al-Wasel (2000) إن زراعة أطراف أفرع نبات البلادونا *Atropa belladonna* L. الناتجة من الزراعة النسيجية على وسط MS الخالي من الهرمون كانت نسبة تجذيرها 100 ٪. وذكر Deliu وأخرون (2002) إن أطراف أفرع نبات *Scopolia carniolica* الناتجة من الزراعة النسيجية والمزروعة على وسط MS المجهز بـ 0,5 ملغم/لتر BA مع 1,5 ملغم/لتر IBA أعطت أعلى نسبة تجذير 97 ٪. وبين Ashrafuzzaman وأخرون (2009) إن زراعة أطراف أفرع نبات الفلفل *Capsicum annuum* الناتجة من الزراعة النسيجية على وسط MS المجهز بـ 0,1 ملغم/لتر NAA مع 0,05 ملغم/لتر IBA أدت الى الحصول على أعلى معدل لعدد الجذور 12 جذر/فرع. وأوضح Amiri وأخرون (2011) إن أطراف أفرع نبات الداتورة *Datura stramonium* L. الناتجة من الزراعة النسيجية والمزروعة على وسط MS المجهز بـ 0,5 ملغم/لتر IBA أعطت أعلى معدل لعدد الجذور 3–6 جذر/ فرع وبمعدل طول 6– 9,5 سم. وبين Loc و Kiet (2011) إن زراعة أطراف أفرع نبات *Solanum hainanense* الناتجة من الزراعة النسيجية والمزروعة على وسط MS المجهز بـ 0,5 ملغم/لتر IBA كونت أعلى معدل لعدد الجذور 3,29 جذر/فرع.

المواد وطرق العمل:

وضعت بذور نبات ست الحسن المستحصل عليها من وحدة النباتات الطبية والعطرية التابعة لكلية الزراعة – جامعة بغداد تحت الماء الجاري لمدة 15 دقيقة، ثم غسلت بمسحوق الغسيل العادي لمدة 5 دقائق مع التحريك المستمر، بعدها غسلت بوضعها في مصفاة تحت الماء الجاري لمدة 5 دقائق، ثم نقلت الى منضدة الزراعة وأضيف إليها محلول هيبوكلورات الصوديوم NaOCl بنسبة 25 ٪ حجم : حجم ولمدة 15 دقيقة، (تم تحضيرها من محلول القاصر التجاري المحتوي 5.25٪ هيبوكلورات الصوديوم) بعدها غسلت بماء مقطر ومعقم لثلاث مرات متتالية لمدة 5 دقائق لكل مرة لإزالة التأثير الضار للمادة المعقمة، وبعد الانتهاء من عملية التعقيم نقلت البذور الى أطباق بتري معقمة فيها ورق ترشيح تركت لمدة خمس دقائق لتجف، وبذلك أصبحت البذور معدة للزراعة، وبعدها زرعت في وسط MS خالٍ من منظمات النمو وعند نمو البادرات أخذت العقد Nodes بطول 0.5 سم بهدف التضاعف بعد إزالة الأوراق الموجودة عليها، عدت المرحلة الاولى من الزراعة لمدة 4 أسابيع مرحلة نشوء، وتم فيها زراعة الأجزاء النباتية (العقد) على وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من منظمات النمو وأعيدت زراعة هذه الأجزاء (Reculture) لأربعة أسابيع أخرى على نفس أوساط مرحلة النشوء وعدت مرحلة تضاعف، وسجلت بيانات عن الجزء النباتي وتطوره عند نهاية كل مرحلة وشملت هذه المرحلة دراسة تأثير إضافة BA الى وسط MS بالتراكيز (0.0، 0.25، 0.5، 0.75، 1.0) ملغم. لتر$^{-1}$ في نشوء وتضاعف العقد المأخوذة من بادرات ناتجة من الزراعة النسيجية وأخذت بياناتها بعد 4 و 8 أسابيع من الزراعة، وتم دراسة تأثير تواجد IBA و IAA في وسط MS بالتراكيز (0.0، 0.5، 1.0، 1.5، 2.0) ملغم. لتر$^{-1}$ في تجذير الأفرع الناتجة من التضاعف وأخذت بياناتها بعد 4 أسابيع من الزراعة. استعملت لزراعة الاجزاء النباتية قناني زجاجية سعة 125 مل وضع بها 20 مل من الوسط الغذائي وضبطت الاس الهيدروجيني عند 5.7 وغُطِّيت فوهة القنينة برقائق الألمنيوم، تم تعقيم الوسط الغذائي بجهاز المؤصدة (Autoclave) عند درجة حرارة 121 مْ وتحت ضغط 1.04 كغم / سم^2 لمدة 20 دقيقة، بعد زراعة جميع الاجزاء النباتية للتجارب المختلفة نقلت الزروعات الى غرفة النمو تحت شدة اضاءة 3000 لوكس وبتعاقب يومي 16 ساعة ضوء يتبعها 8 ساعة ظلام مجهزة من أنابيب الفلورسنت البيضاء وبدرجة حرارة 25 ± 1 م°، أُستخدم التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design في تحليل بيانات التجارب وتمت مقارنة المتوسطات حسب اختبار دنكن متعدد الحدود Duncan's multiple range test تحت مستوى احتمال 5٪ (الراوي وخلف الله، 1980). وكل معاملة ضمت عشرة مكررات، وكل مكرر احتوى على جزء نباتي واحد، حضرت العينة القياسية بإذابة 0.01 غم من مادة النقية Atropine وScopolamine وTropine في 5 مل من الميثانول حفظت العينات في الثلاجة عند درجة حرارة 4 م° لحين بدء التشخيص، أما Hyoscyamine Sulfate تم إذابة 0.01 غم من المادة النقية في 5 مل من الأيثانول، أستخدمت هذه العينات بوصفها عينات مقارنة لمستخلصات العينات المختلفة من النمو الخضري والجذري لنبات ست الحسن. وحضرت المستخلصات الكحولية لعينات المجموع الخضري والجذري وفق طريقة Richard (1998) إذ اخذ 5

غرام وزن رطب لكل عينة من العينات وسحقت بالهاون الخزفي ثم أضيف إليها 30–50 مل ميثانول وتم مجانسة المستخلص بوضعه على جهاز الدوار المغناطيسي ذي الصفيحة الساخنة Hot plate magnetic stirrer لمدة 10 دقائق وعلى درجة حرارة الغرفة، بعدها تم ترشيح العينة ثم ضبط الأس الهيدروجيني على (1,75– 2) بإضافة قطرات من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 باستخدام جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH meter، ثم أضيف له داي إيثايل إيثر 60 – 80 مل ثم وضع المستخلص في قمع الفصل مع الرج اخذت الطبقة السفلى وضبط الأس الهيدروجيني على (12) بإضافة الأمونيا NH_3 ومن ثم أضيف 10–20 مل كلوروفورم ووضع في قمع الفصل مع الرج أخذت الطبقة السفلى والتي هي المستخلص مع الكلوروفورم، ثم تم تبخير العينة بتركها على الهواء لعدة ساعات لحين التقليل من حجم العينة وصولاً الى 3 مل، وبعدها حفظت العينات في الثلاجة لحين بدء عمليات الكشف والتشخيص باستخدام جهاز HPLC إذ أستخدم جهاز من نوع (Merck Hitachi L - 7400) المتوفر في مختبر الأجهزة الدقيقة التابع لكـــلية الزراعة – جامعـــة صـــلاح الـــدين في أربيل، بإستخدام عمـــود الفـــصل من نوع (Crocus C18, 25cm × 4.6 mm) عند طول موجي210 نانوميتر وسرعة جريان 1 مل/دقيقة وقطر جزيئات 5 مايكروميتر وعند درجة حرارة الغرفة وطور متحرك مكون من Methanol : K_2HPO_4 (0.1 مولاري) 1:1 v/v و 7.2 pH وحقن 20 مايكروليتر من العينات المراد قياسها كل عينة على حدا وقورن كل من زمن الإحتباس ومساحة المنحني لمركبات Atropine و Hyoscyamine Sulfate و Scopolamine و Tropine للعينات القياسية مع زمن الإحتباس ومساحة المنحني للمركبات في مستخلصات العينات النباتية المدروسة واحتسبت تراكيز المركبات المفصولة حسب المعادلة الآتية :

$$\text{كمية المركب المفصول (ملغم/غم) وزن رطب} = \frac{\text{المساحة تحت المنحني للعينة x تركيز العينة القياسية}}{\text{المساحة تحت المنحني للعينة القياسية}} \times \frac{\text{حجم عينة المستخلص (مل)}}{\text{الوزن الطري للعينة (غم)}}$$

النتائج والمناقشة:

يبين الجدول (1) أن عقد نبات ست الحسن المزروعة على وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من BA فضلاً عن معاملة المقارنة إستجابت للزراعة النسيجية بنسبة 100٪ وإن الزراعة عند معاملة 0,75 ملغم/لتر BA أدت الى الحصول على أعلى معدل لعدد الأفرع 3,53 فرع/جزء نباتي متفوقة معنوياً عن باقي المعاملات وهذه بدورها أعطت أعلى معدل لطول الأفرع وعدد الأوراق إذ كانت 3,50 سم و6,70 ورقة/جزء نباتي على التوالي هذا لمرحلة النشوء، عند إعادة الزراعة 4 أسابيع أخرى (مرحلة التضاعف) كونت العقد المزروعة عند الوسط المزود بـ 0,75 ملغم/لتر BA أعلى معدل لعدد الأفرع وعدد الأوراق إذ كانت 7,00 فرع/جزء نباتي و 9,00 ورقة/جزء نباتي ومن الزراعة عند المعاملة نفسها تم إستحداث الكالس بنسبة 90 ٪ وبأعلى كمية للكالس المستحدث الشكل (1)، في حين تم الحصول على أعلى معدل لطول الأفرع 6,00 سم ومن الزراعة عند معاملة المقارنة، وتشير النتائج الى تجذير العقد المزروعة عند معاملة المقارنة بنسبة 100 ٪ وبمعدل 11 جذر/ جزء نباتي.

تفسر نتائج الجدول (1) في تضاعف الأجزاء المزروعة على أساس ان BA هو أحد السايتوكاينينات التي تلعب دورا في السيطرة على السيادة القمية وبالتالي زيادة عدد الأفرع ونتيجة لحصول حالة التوازن ما بين الهرمونات الداخلية ومنظمات النمو المضافة تم الحصول على أعلى القيم وان زيادة التركيز تؤدي إلى تقليل القيم لعدد الأفرع لان تأثيره يصبح عكسيا (Smith، 2000) و(Hopkins و Hiiner، 2004)، وإن تكوين الأفرع والأوراق للأجزاء المزروعة عند معاملة المقارنة في مرحلة النشوء يعود إلى المحتوى الداخلي في أنسجة الجزء النباتي من الهرمونات النباتية (Murashige وSkoog، 1962)، وقد تفسر زيادة أطوال وعدد الأوراق للمعاملات المختلفة الى تأثير السايتوكاينينات في إنقسام وإستطالة الخلايا والذي بدوره ينعكس على صفات

النمو فضلاً عن تأثيره على بناء الأحماض النووية (وصفي، 1995)، وقد يشير ظهور الكالس في بعض المعاملات الى ان استحداث الكالس على القطعة النباتية يعتمد على الهرمونات الداخلية، في حين ان قسما من القطع النباتية لاتستجيب لاستحداث الكالس ما لم يضاف الى الوسط بعض من منظمات النمو وذلك يعود أساسا الى المستوى الداخلي لهرمونات النمو فيها ومنظمات النمو التي تنظم استحداث الكالس (محمد وعمر، 1990). وهذا يتماشى مع Otroshy وأخرون (2011).

الجدول (1): تأثير BA في نشوء وتضاعف عقد نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. الناتجة من الزراعة النسيجية على وسط MS.

	مرحلة النشوء (بعد 4 أسابيع)			مرحلة التضاعف (بعد 8 أسابيع)						
BA (ملغم/لتر)	عدد الأفرع	طول الأفرع(سم)	عدد الاوراق	عدد الأفرع	طول الأفرع(سم)	عدد الاوراق	استحداث الكالس (٪)	حجم الكالس	التجذير (٪)	عدد الجذور
صفر	1,00 هـ	3,50 أ	5,00 د	1,20 هـ	6,00 أ	7,10 هـ	0,0 ج	–	100	11,00
0.25	1,90 د	2,75 ج	5,30 ج	3,10 د	4,00 ج	8,21 ب	40 ب	++	0,0	0,0
0.5	2,56 ب	2,90 ب	6,00 ب	4,00 ج	3,30 د	8,00 ج	80 أ	++	0,0	0,0
0.75	3,53 أ	3,50 أ	6,70 أ	7,00 أ	5,00 ب	9,00 أ	90 أ	+++	0,0	0,0
1.0	2,50 ج	2,50 د	6,00 ب	5,00 ب	4,00 ج	7,50 د	60 أ ب	+	0,0	0,0

*الأرقام ذات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد المدى تحت مستوى احتمال5٪.

الشكل (1): تأثير BA في تضاعف عقد نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. الناتجة من الزراعة النسيجية بعد 8 أسابيع من الزراعة على وسط MS.

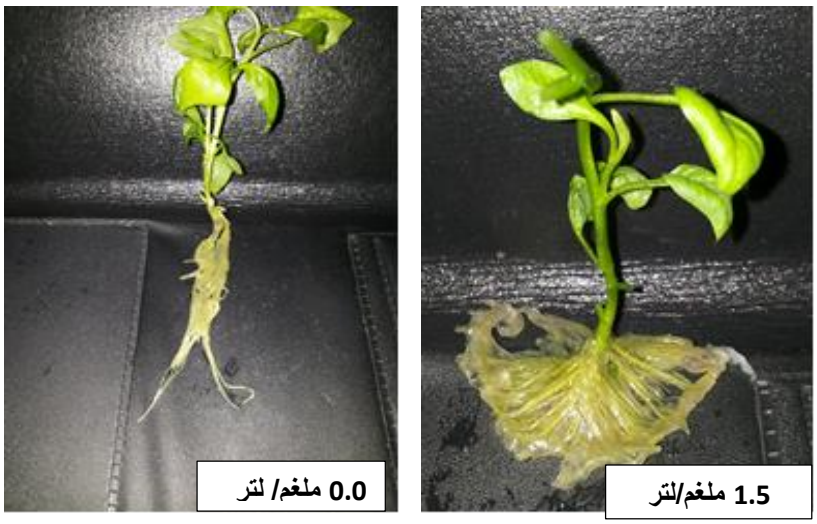
يبين الجدول (2) إن جميع معاملات IBA ومن ضمنها معاملة المقارنة كونت جذور وبنسبة 100 ٪ عدا معاملة 2,0 ملغم/لتر IBA التي كونت الجذور بنسبة 80 ٪، في حين أعطت الأجزاء النباتية المزروعة عند التركيز 1,5 ملغم/لتر IBA أفضل معدل لعدد الجذور 51,30 جذر/فرع الشكل (2) والتي بدورها تفوقت معنوياً على باقي معدلات المعاملات، كما يبين الجدول الحصول على أعلى معدل لطول الجذور 12,00 سم من الزراعة عند معاملة المقارنة والتي بدورها تفوقت معنوياً على معدلات باقي المعاملات، وتفسر هذه النتائج على أساس أن IBA هو أحد الأوكسينات التي تلعب دوراً هاماً في تنشيط إنقسام الخلايا فضلاً عن دوره في تحفيز تكوين الجذور في مناطق القطع، وإن إضافة منظمات النمو يؤدي الى زيادة معدلات عدد الجذور وأطوالها وصولاً الى التركيز

الأمثل وإن زيادة التركيز تؤدي الى تأثيرات عكسية (Hartmann وأخرون، 2002)، وقد يعود السبب الى الحصول على نسبة تجذير 100٪ في الأجزاء المزروعة عند معاملة المقارنة الى أن هذه الأجزاء كانت تحتوي على الأوكسين لكونها أخذت من زروعات بعمر شهرين التي بدورها إعتمدت على تصنيع الغذاء بنفسها ومن ثم زيادة معدل تصنيع الهرمونات الداخلية ومن ضمنها الأوكسين (Hopkins وHiiner، 2004).وهذا يتوافق مع كل من Amiri وأخرون (2011) وLoc و Kiet (2011).

الجدول (2): تأثير IBA في تجذير أفرع نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. الناتجة من الزراعة النسيجية على وسط MS الصلب من الزراعة بعد 4 أسابيع.

IBA (ملغم/لتر)	التجذير (٪)	عدد الجذور	طول الجذور (سم)
0,0	100 أ	13,00 هـ	12,00 أ
0,5	100 أ	32,10 ج	5,40 ب
1,0	100 أ	43,20 ب	2,70 هـ
1,5	100 أ	51,30 أ	4,50 د
2,0	80 ب	30,00 د	5,00 ج

*الأرقام ذات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى احتمال 5 ٪ .



الشكل (2): تأثير IBA في تجذير أفرع نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. الناتجة من الزراعة النسيجية من زراعتها على وسط MS الصلب بعد 4 أسابيع من الزراعة.

يبين الجدول (3) إن جميع معاملات IAA ومن ضمنها معاملة المقارنة كونت جذور وبنسبة 100 ٪ عدا معاملة 0,5 و 1,0 ملغم/لتر IAA التي كونت الجذور بنسبة 90 ٪، في حين أعطت الأجزاء النباتية المزروعة عند التركيز 2,0 ملغم/لتر IAA أفضل معدل لعدد الجذور 21,20 جذر/فرع والتي بدورها تفوقت معنوياً على باقي معدلات المعاملات، كما يبين الجدول الحصول على أعلى معدل لطول الجذور 12,00 سم من الزراعة عند معاملة المقارنة والتي بدورها تفوقت معنوياً على معدلات باقي المعاملات. ومن مراجعة نتائج الجدولين (2 و 3) نلاحظ اختلاف استجابة الأجزاء النباتية لمنظمات النمو المختلفة (IBA وIAA) وتراكيزها معتمداً على محتواها من الهرمونات الداخلية أو إلى نشاط فعالية الاوكسينات المضافة (Hartmann وآخرون ، 2002) وعموماً

نجد ان IBA كان أفضل من IAA من حيث النسبة المئوية للتجذير وعدد الجذور قد يعود السبب في ذلك إلى أن IAA سهل التحلل سواءً بالأنزيمات أو الأكسدة بالإضاءة مقارنة مع IBA الذي يتحلل ببطء نسبياً بواسطة الأنزيمات التي تحطم الاوكسينات وهي صفة مرغوبة لبقاء الاوكسينات فترة أطول في الأنسجة (وصفي، 1995).

الجدول (3): تأثير IAA في تجذير أفرع نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. الناتجة من الزراعة النسيجية على وسط MS الصلب بعد 4 أسابيع من الزراعة.

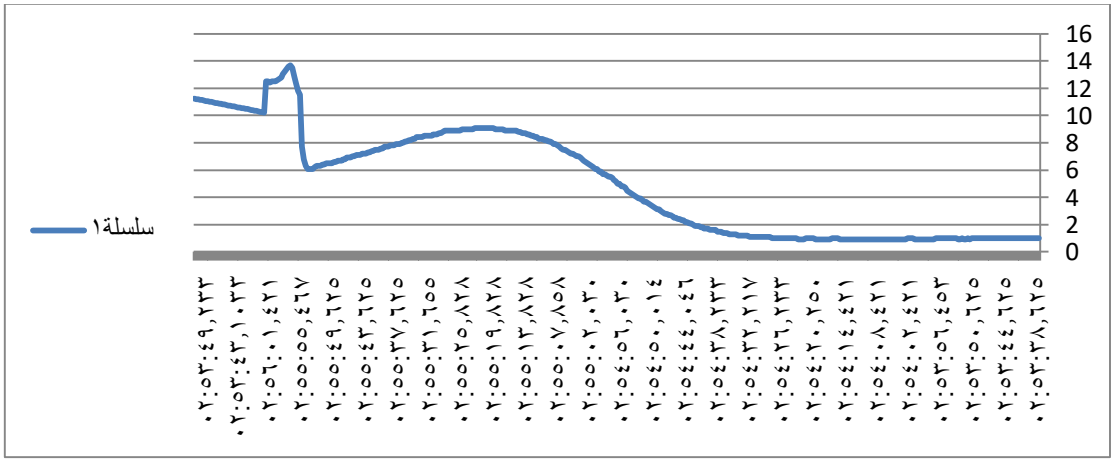
IAA (ملغم/لتر)	التجذير (٪)	عدد الجذور	طول الجذور (سم)
0,0	100 أ	13,00 هـ	12,00 أ
0,5	90 أ	15,30 د	7,00 ب
1,0	90 أ	17,00 ج	4,60 ج
1,5	100 أ	18,30 ب	3,00 هـ
2,0	100 أ	21,20 أ	3,70 د

*الأرقام ذات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى احتمال 5 ٪ .

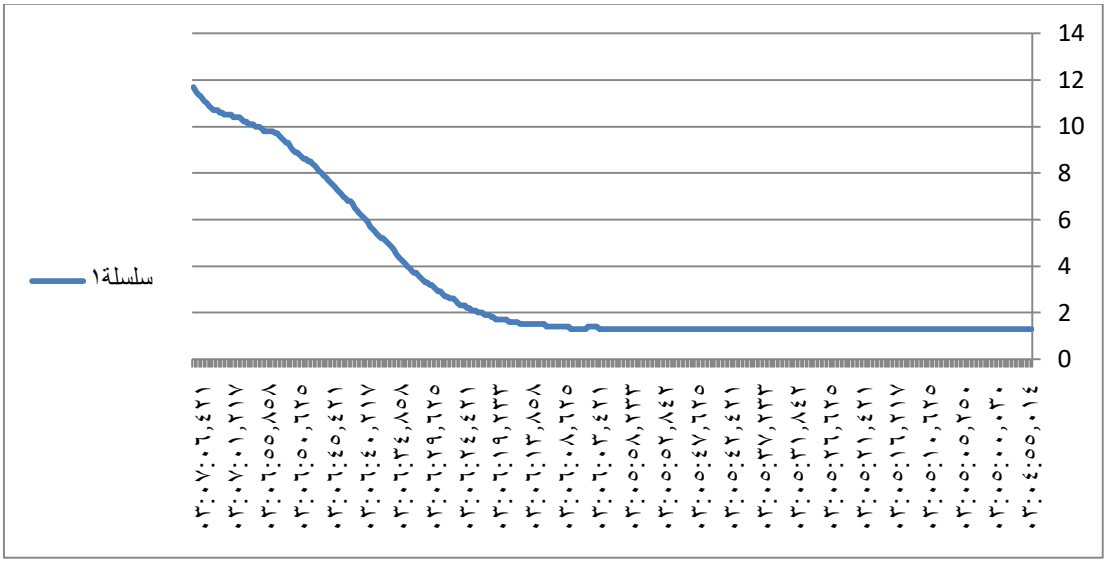
يبين الجدول (4) والأشكال (3، 4، 5، 6) زمن الأحتباس بالدقيقة والمساحة تحت المنحني للعينات القياسية إذ كان زمن الأحتباس والمساحة تحت المنحني (3,626 _ 3,494 _ 2,892 _ 2,910) و (273,2– 278,8– 270,8– 217,7) للمركبات Atropine، Hyoscyamine Sulfate، Scopolamine، Tropine على التوالي.

الجدول (4): زمن الأحتباس والمساحة تحت المنحني للعينات القياسية.

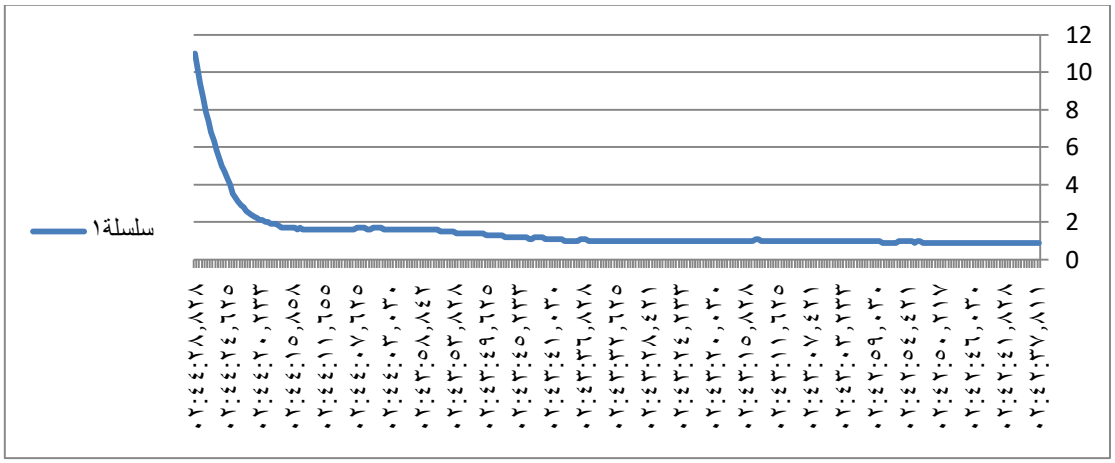
المادة Standared Sample	زمن الأحتباس (دقيقة) Retention Time (min)	المساحة تحت المنحني Detected Area
Atropine	3,626	273,2
Hyoscyamine Sulfate	3,494	278,8
Scopolamine	2,892	270,8
Tropine	2,910	217,7



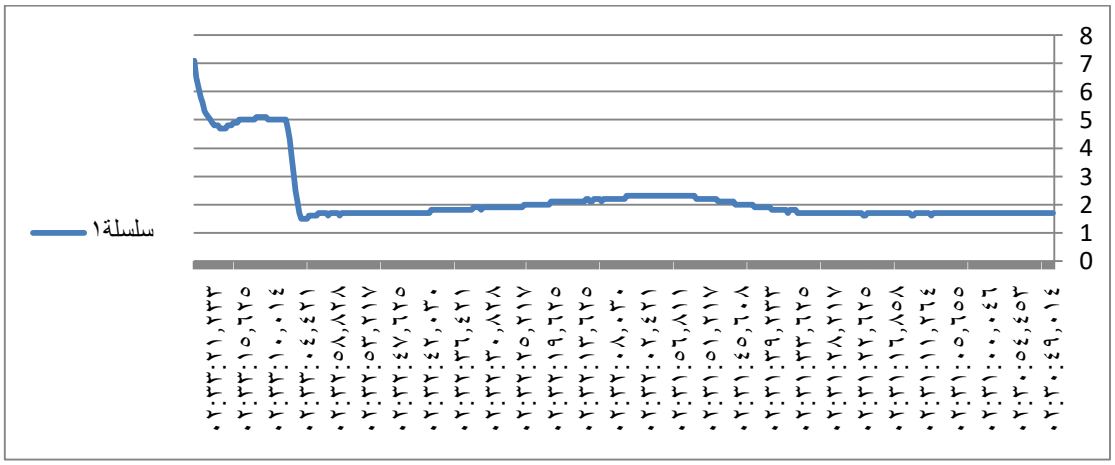
الشكل (3): زمن الإحتباس (دقيقة) للعينة القياسية Atropine.



الشكل (4): زمن الإحتباس (دقيقة) للعينة القياسية Hyoscyamine Sulfate.



الشكل (5): زمن الإحتباس (دقيقة) للعينة القياسية Scopolamine



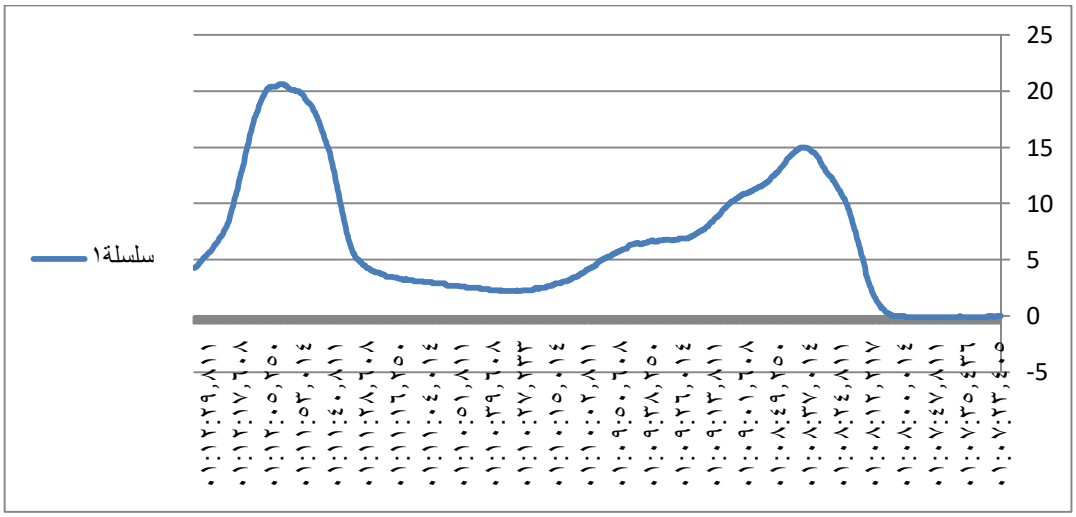
الشكل (6): زمن الإحتباس (دقيقة) للعينة القياسية Tropine.

يبين الجدول (5) زمن الإحتباس والمساحة تحت المنحني وتراكيز القلويدات Atropine وHyoscyamine Sulfate وScopolamine و Tropine في عينات مستخلصات تضاعف عقد نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. النامية على وسط MS المزود بتراكيز مختلفة من BA، إذ تم الحصول على أعلى تركيز لـ Atropine (0,01) ملغم/ غم وزن رطب من عينة المستخلص لمعاملة المقارنة عند زمن الإحتباس (3,768) ومساحة تحت المنحني (2,9)، وإن هذه المعاملة بدورها أعطت أعلى

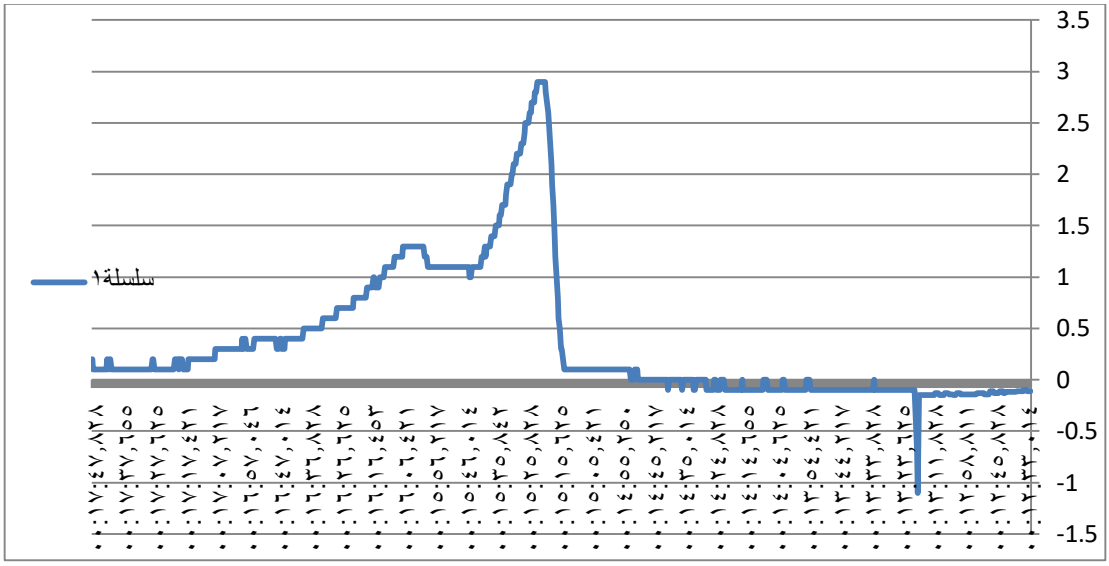
تركيز لـ Hyoscyamine Sulfate (0,01) ملغم/ غم وزن رطب عند زمن إحتباس (3,360) ومساحة تحت المنحني (2,9)، كما أعطت المعاملة نفسها وعينة المستخلص لمعاملة 0,75 ملغم/لتر BA أعلى تركيز لـ Scopolamine (0,01) ملغم/ غم وزن رطب عند زمن الإحتباس (2,892) و(2,888) ومساحة تحت المنحني (3,1) و(2,9) على التوالي، وكلتا المعاملتين أعطت أعلى تركيز لـ Tropine (0,01) ملغم/ غم وزن رطب عند زمن الإحتباس (2,910) و (2,914) على التوالي وكانت مساحة تحت المنحني لكلاهما (2,9) الشكل (7) و (8)، قد تفسر نتائج الحصول على أعلى التراكيز للمواد المدروسة من عينة المستخلص لمعاملة المقارنة الى كون هذه المعاملة لم يحصل فيها تضاعف للأفرع كما حصل في عينات المعاملات الأخرى الجدول (1) والذي ربما أدى إلى ظهور تلك المواد في معاملة المقارنة بينما المعاملات الأخرى حصل لها تضاعف والتضاعف معناه إنقسام خلايا وإستنزاف طاقة والذي ربما قد أثر على تكوين تلك المواد المدروسة.

الجدول (5): زمن الإحتباس والمساحة تحت المنحني وتركيز المركبات القلويدية (ملغم/غم) المفصولة من مستخلصات تضاعف عقد نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. النامية على وسط MS المزود بتراكيز مختلفة من BA بعد 8 أسابيع من الزراعة.

BA (ملغم/لتر)	Atropine			Hyoscyamine Sulfate			Scopolamine			Tropine		
	R.t. (دقيقة)	المساحة تحت المنحني	تركيز القلويد (ملغم/غم)	R.t. (دقيقة)	المساحة تحت المنحني	تركيز القلويد (ملغم/غم)	R.t. (دقيقة)	المساحة تحت المنحني	تركيز القلويد (ملغم/غم)	R.t. (دقيقة)	المساحة تحت المنحني	تركيز القلويد (ملغم/غم)
صفر	3,768	2,9	0,01	3,360	2,9	0,01	2,892	3,1	0,01	2,910	2,9	0,01
0,25	3,660	1,0	0,00				2,895	1,7	0,00	2,912	1,6	0,00
0,5												
0,75	3,670	1,1	0,00				2,888	2,9	0,01	2,914	2,9	0,01
1,0	3,626	1,4	0,00	3,532	1,3	0,00	2,890	1,2	0,00	2,912	1,2	0,00
العينة القياسية	3,626			3,494			2,892			2,910		



الشكل (7): زمن الإحتباس (دقيقة) لمركب Atropine وHyoscyamine Sulfate وScopolamine لمستخلص عينة تضاعف عقد نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. على وسط MS المزود بـ 0,0 ملغم/لتر BA بعد 8 أسابيع من الزراعة.



الشكل (8):زمن الإحتباس (دقيقة) لمركب Tropine لمستخلص عينة تضاعف عقد نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. على وسط MS المزود بـ 0,75 ملغم/لتر BA بعد8 أسابيع من الزراعة.

يبين الجدول (6) زمن الإحتباس والمساحة تحت المنحني وتراكيز القلويدات Atropine وHyoscyamine Sulfate وScopolamine و Tropine في عينات مستخلصات جذور أفرع نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. النامية على وسط MS المزود بتراكيز مختلفة من IBA، إذ يتضح وبشكل عام إن للـ IBA دور في ظهور هذه القلويدات مقارنة مع عينات جذور أفرع المقارنة والتي لم تظهر فيها هذه القلويدات، إذ تم الحصول على أعلى تركيز للـ Atropine (0,09) ملغم/ غم وزن رطب من عينة المستخلص للمعاملة 1,5 ملغم/لتر IBA عند زمن الإحتباس (3,564) ومساحة تحت المنحني (22,6)، وتم الحصول على أعلى تركيز للـ Hyoscyamine Sulfate (0,10) ملغم/ غم وزن رطب من عينة مستخلص معاملة 2,0 ملغم/لتر IBA عند زمن إحتباس (3,508) ومساحة تحت المنحني (24,8)، وإن هذه المعاملة بدورها أعطت أعلى تركيز للـ Tropine (0,32) ملغم/غم وزن رطب عند زمن الإحتباس (2,914) وكانت مساحتها تحت المنحني (59,0)، أما أعلى تركيز للـ Scopolamine كان (0,07) ملغم/غم وزن رطب من عينة مستخلص معاملة 0,5 ملغم/لتر IBA عند زمن الإحتباس (2,892) وكانت مساحتها تحت المنحني (17,7)، قد تفسر هذه النتائج على إن مكونات الوسط الغذائي ومن ضمنها منظمات النمو ذات تأثير كبير على زيادة إنتاج مواد الأيض الثانوي في المزارع النسيجية وصولاً للتركيز الأمثل (Yongوأخرون، 2008) بالإضافة إلى إن زيادة تركيز مادة في معاملة معينة ربما يؤثر على تركيز مادة أخرى لنفس المعاملة وذلك لكون البناء الحيوي لكل مادة تتعلق بالبناء الحيوي للمادة التي سبقتها.

الجدول (6): زمن الإحتباس والمساحة تحت المنحني وتركيز المركبات القلويدية (ملغم/غم) المفصولة من مستخلصات جذور أفرع نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. النامية على وسط MS المزود بتراكيز مختلفة من IBA بعد 4 أسابيع من الزراعة.

Tropine			Scopolamine			Hyoscyamine Sulfate			Atropine			
تركيز القلويد (ملغم/غم)	المساحة تحت المنحني	R.t. (دقيقة)	تركيز القلويد (ملغم/غم)	المساحة تحت المنحني	R.t. (دقيقة)	تركيز القلويد (ملغم/غم)	المساحة تحت المنحني	R.t. (دقيقة)	تركيز القلويد (ملغم/غم)	المساحة تحت المنحني	R.t. (دقيقة)	IBA (ملغم/لتر)
0,00	0,8	2,910	0,00	0,8	2,892				0,00	0,2	3,642	0,0
0,10	19,6	2,910	0,07	17,7	2,892	0,04	9,9	3,304	0,04	9,8	3,707	0,5
0,05	9,6	2,912	0,02	5,6	2,892	0,04	10,4	3,494	0,05	11,4	3,620	1,0
0,08	16,3	2,970							0,09	22,6	3,564	1,5
0,32	59,0	2,914				0,10	24,8	3,508				2,0
		2,910			2,892			3,494			3,626	العينة القياسية

يبين الجدول (7) زمن الإحتباس والمساحة تحت المنحني وتراكيز القلويدات Atropine وHyoscyamine Sulfate وScopolamine و Tropine في عينات مستخلصات جذور أفرع نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. النامية على وسط MS المزود بتراكيز مختلفة من IAA، ويبين الجدول أن للـ IAA تأثير في تركيز المواد المدروسة، إذ تم الحصول على أعلى تركيز للـ Atropine (0,05) ملغم/ غم وزن رطب من عينة المستخلص للمعاملة 2,0 ملغم/لتر IAA عند زمن الإحتباس (3,674) ومساحة تحت المنحني (13,4)، وكما أعطت المعاملة نفسها أعلى تركيز للـ Scopolamine (0,07) ملغم/غم وزن رطب عند زمن الإحتباس (2,892) وكانت مساحتها تحت المنحني (16,6)، وكما أعطت أيضاً أعلى تركيز للـ Tropine (0,11) ملغم/غم وزن رطب عند زمن الإحتباس (2,910) وكانت مساحتها تحت المنحني (21,3)، ويلاحظ ظهور قلويد الـ Hyoscyamine Sulfate عند عينة مستخلص معاملة 1,0 ملغم/لتر IAA بتركيز (0,01) ملغم/ غم وزن رطب عند زمن إحتباس (3,494) ومساحة تحت المنحني (3,5).

الجدول (7): زمن الإحتباس والمساحة تحت المنحني وتركيز المركبات القلويدية (ملغم/غم) المفصولة من مستخلصات جذور أفرع نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. النامية على وسط MS المزود بتراكيز مختلفة من IAA بعد 4 أسابيع من الزراعة.

Tropine			Scopolamine			Hyoscyamine Sulfate			Atropine			
تركيز القلويد (ملغم/غم)	المساحة تحت المنحني	R.t. (دقيقة)	تركيز القلويد (ملغم/غم)	المساحة تحت المنحني	R.t. (دقيقة)	تركيز القلويد (ملغم/غم)	المساحة تحت المنحني	R.t. (دقيقة)	تركيز القلويد (ملغم/غم)	المساحة تحت المنحني	R.t. (دقيقة)	IAA (ملغم/لتر)
0,00	0,8	2,910	0,00	0,8	2,892				0,00	0,2	3,642	0,0
												0,5
0,03	5,9	2,976				0,01	3,5	3,494	0,01	3,5	3,574	1,0
0,03	6,6	2,910	0,01	4,5	2,892				0,00	2,0	3,752	1,5
0,11	21,3	2,910	0,07	16,6	2,892				0,05	13,4	3,674	2,0
		2,910			2,892			3,494			3,626	العينة القياسية

نستنتج من هذه الدراسة الحصول على تراكيز أعلى للمواد المدروسة من العينات لتجربة التجذير IBA مقارنة مع العينات لتجربة IAA أوعينات تضاعف العقد ربما يعود السبب إلى إن فاعلية IBA بشكل عام هو أنشط من IAA بالإضافة إلى إن IAA يتأكسد بالإضاءة بشكل أكبر من IBA (Hartmann وأخرون، 2002).

المصادر:

حسين، فوزي طه قطب (1981). النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها. دار المريخ للنشر، الرياض– السعودية.

الدجوي، علي (1996). موسوعة النباتات الطبية والعطرية. مكتبة مدبولي، مطبعة أطلس (الكتاب الثاني).

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

سعد الدين، شروق محمد كاظم وعادل يوسف نصر الله ومدحت الساهوكي (2005). نمو وحاصل وقلويدات البلادونا . *Atropa belladonna* L تاثير مواعيد الزراعة والشتل في صفات نمو وحاصل النباتات في الحقل المكشوف. مجلة العلوم الزراعية العراقية، 36(1) :80-75.

الشحات، نصر أبو زيد (1986). النباتات والأعشاب الطبية. دار البحار بيروت، لبنان.

العرقاوي، نبيل (2009). موسوعة النباتات الطبية المصورة. الطبعة الأولى. إتحاد الناشرين السوريين.

الكناني، فيصل رشيد (1987). زراعة الأنسجة والخلايا النباتية. مديرية دار الكتب والطباعة/جامعة الموصل– العراق.

المنظمة العربية للتنمية الزراعية (1988). النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي. جامعة الدول العربية، الخرطوم - السودان.

محمد، عبد المطلب سيد ومبشر صالح عمر (1990). المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والأعضاء للنبات. مديرية دار الكتب للطباعة والنشر/ جامعة الموصل – العراق.

وصفي، عماد الدين حسين (1995). منظمات النمو والأزهار واستخدامها في الزراعة. الأكاديمية. القاهرة ـ مصر.

Al-Wasel, A .S. A. (2000). *In Vitro* regeneration of *Atropa belladonna* L. from leaf discs. Bulletin of Faculty of Agriculture, 51 (4) : 489 – 500.

Amiri, S. ; S. K. Kazemitabar ; G.A. Ranjbar and M. Azadbakht (2011). *In Vitro* propagation and whole plant regeneration from callus in Datura (*Datura stramonium* L.). African Journal of Biotechnology, 10(3) : 442 – 448.

Ashrafuzzaman, M.; M. M. Hossain; M. R. Ismail; M. S. Haque; S. M. Shahidullah and S. Uz – Zaman (2009). Regeneration potential of seedling explant of Chilli (*Capsicum annuum*). African Journal of Biotechnology, 8 (4) : 591 – 596.

Deliu, C.; A. Keul; C. Munteanu –Deliu; A. Coste; C. Stefanescu and M. Tamas (2002). Tropane alkaloid biosynthesisin tissue culture of *Scopolia carniolica* Jaco. Contributii Botanice, XXXVII.

Dixon, R.A. (1985). Plant Cell Culture; A Practical Approach. IRL Press. Oxford,UK.

Ford, K. G. (2000). Biological and Biomedical Science. Plant Science, Botany- General. McGraw – Hill com. pp. 1-6.

Gupta, S.; A. Dutta and Y. Ibarakl (2006). Plant Tissue Culture Engineering. Vol. 6. The Background. Springer. 496 pages.

Hartmann, H.T. ; D.E. Kester ; F.T. Davies and R.L. Geneve (2002). Plant Propagation Principles and Practices. 7 th. ed., Perntice Hall, Inc. New Jersey. USA.

Hopkins, W. G. and N. P. A. Hiiner (2004). Introduction to Plant Physiology. Third Edition. John Wiley and Sons. Inc.

Kasumi, M.; Y. Takastu; K . Suzuki; T. Gonai; M. Nogi; T. Yamada and T. Manabe (2004). Callus formation and plant regeneration from root explant of Gladiolus (*Gladiolus* X *grandiflora* Hort.). J. JPN. Soc., 4(1).

Loc, N.H. and H.V. Kiet (2011). Micropropagation of *Solanum hainanense* Hance. Annals of Biological Research, 2(2) : 394-398.

Murashige, T. and F. A. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473 – 497.

Ober, D. (2003). Chemical ecology of alkaloids exemplified with the pyrrolizidiner In: J.T. Romeo, Ed., Intergrative Phytochemistry : from Ethuo Botany to Molecular Ecology. 37. Pergamon, Amsterdam 203 – 230.

Otroshy, M.; K. Moraadi and M.K. Nekouei (2011). The effect of different cytokenins in propagation of *Capsicum annuum* L. by *In Vitro* nodal cutting. Takia Journal of Sciences, 9 (3) : 21 – 30.

Richard, J. P. (1998). Natural Products Isolation. The Benlamin Cummings Bublishing Company, Inc. Menlopank , USA.: 585-614.

Rodr, B.; S. F. Figueiredo and M. A. Esquibel (1991). Gallogenesis, organogenesis and micropropagation of *Datura insignis.* R. Bras. Fisiol. Veg., 3 (2) : 63-68.

Sas, copyright © 2002. Institutc Inc. Cary, Nc 27513, U.S.A.

Smith R.H.(2000) .Plant Tissue Culture, Academic Press. Har. S. and Tec. C., San Diego.

Spiegl, F. and S. Fritz (1996). Sick nots An Alphabetical Browsing –Book of Derivatives Abbreviations, Mnemonics and Slang for Amusemen. Washington, DC: Taylor & Franci, pp. 21-22. ISBN 1-85070-627-1.

Tripathi, L. and J. N. Tripathi (2003). Role of Biotechnology in Medicinal Plant. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2(2) : 243-253.

Yong, J.; Z. C. Gong; and X. Tan (2008). Induction of callus and extraction of alkaloid from Yi Mu Cao (*Leonurus heterophylus* Sw.) Culture. African Journal of Biotechnology,7 (8) : 1157-1162.

Zayed, R. and M. Wink (2004). Introduction of Tropane alkaloids formation in transformed root culture of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). 59 P: 863-867.