تقدير بعض القلويدات في الكالس المُعرض للموجات فوق السمعية لنبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. المكثرة خارج الجسم الحي بإستخدام تقانة كروماتوغرافيا السائل الفائق الاداء *

م. هبة نواف أحمد العكيدي
كلية النور الجامعة/ *جامعة الموصل*

أ.د. بشار زكي قصاب باشي
كلية الزراعة والغابات/ *جامعة الموصل*

(قدم للنشر في ٢٠١٩/٥/٢١ ، قبل للنشر في ٢٠١٩/٧/١٧)

ملخص البحث: تناولت هذه الدراسة تقدير بعض القلويدات لنبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. المكثرة خارج الجسم الحي من خلال الكالس المستحدث من اوراق البادرات المكثرة خارج الجسم الحي, الكالس المستحدث من زراعة أجزاء من الأوراق على وسط MS الصلب المزود بالتركيز 1,0 ملغم. لتر-1 2,4-D + 0.5 ملغم. لتر-1 BA بعد 4 أسابيع عرض الى الموجات فوق السمعية حيث وضعت في حجرة جهاز الموجات فوق السمعية عند التردد فوق السمعي 50 كيلو هرتز ولفترات 20، 40، 60 دقيقة وعند درجة حرارة الغرفة، وبعد إنتهاء تعريض جميع العينات زرعت في وسط الاستحداث المشار إليه أعلاه لأربعة أسابيع أخرى، إضافة إلى معاملة المقارنة التي تمثل عينات الكالس غير المعرضة للموجات فوق السمعية. تم تقدير بعض القلويدات في الكالس المعرض للموجات فوق السمعية والمتمثلة بـ قلويدات Atropine و Hyoscyamine Sulfate وScopolamine وTropine بإستخدام تقانة كروماتوغرافيا السائل الفائق الأداء .

كلمات دالة: ست الحسن، **Atropine**، **Hyoscyamine Sulfate**، **Scopolamine**، **Tropine** .

Estimation of some Alkaloids in the Callus Exposed to the Ultrasound of the Extravagant *Atropa belladonna* L. Plant using the Technique of High Performance Liquid Chromatography

Abstract: This study examined the estimation of some of the alkaloids of the **A*tropa belladonna* L**. plant grown *InVitro* through the callus, which was obtained from the seedling leaves. The callus is developed by implanting parts of the leaves on the center of the MS medium with a concentration of 1.0 mg / l 2,4-d + 0.5 mg /l BA after 4 weeks the width to the waves above the audio at 50 Hz frequency and at room temperature, after the exposure of all the samples was planted in the medium of the above mentioned development for another 4 weeks to add to the comparative coefficient which represent the samples of callus non- opposition to the waves above the sound of the capsules (Atropine, Tropine, Hyoscyamine sulfate, Scopolamine) using the technique of high- performance liquid chromatography.

---

* مستل من اطروحة دكتوراه الباحث الاول

المقدمة

يعود نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. والمعروف بإسم Belladonna الى العائلة الباذنجانية Solanaceae التي تضم 90 جنساً و2000 نوع من النباتات، 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 لاسيما في مجال إكثار أنواع عديدة 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) . أشارت البحوث الى إن إستعمال الترددات الواطئة من الموجات فوق السمعية Ultrasonic أدى الى زيادة في حدوث التفاعلات البايوكيميائية وتكمن تأثيراتها الفيزيائية- الكيميائية في تحفيز فعالية الأنزيمات أو تثبيطها وتغير الحالة الغروية والنفوذية للغشاء وتحطيم الجذور الحرة بواسطة الطاقة الصوتية فضلاً عن تأثيرها في زيادة الجريان السايتوبلازمي ومؤثراً في تركيب الأنزيم وإنحراف فعاليته إعتماداً على كمية الطاقة والتردد وفترة

التعريض (Ayatollah وأخرون، 2011 و Xie وLiu، 2011 و Vercet وأخرون، 1998 و Price، 1992) . إذ أشار Wray و Small (1958) إن إستخدام جهاز الموجات فوق السمعية Ultrasonic بتردد 50 كيلو هرتز ولمدة 20 دقيقة وعند درجة حرارة الغرفة لإستخلاص القلويدات من العينات النباتية لأوراق نبات البلادونا *Atropa belladonna* L. المجففة مستخدماً الإيثر كمذيب أعطت نتائج جيدة في إستخلاص القلويدات. كما أوضح Demaggio وLott (1964) إن إستخدام جهاز الموجات فوق السمعية Ultrasonic على الأجزاء النباتية لنبات الداتورة *Datura stramonium* ولفترة قصيرة ومن خلال تطبيق عملية الإستخلاص باستخدام المذيب أعطى إنتاج أكبر من القلويدات المحصل عليها. وبين Stanisavljevic وأخرون (2007) إن إستخدام جهاز الموجات فوق السمعية Ultrasonic لإستخلاص الزيت من بذور نبات التبغ *Nicotiana tabacum* L. أعطى أعلى نسبة زيت عند درجة 25 سليليزية ولفترة قصيرة، كما أشار الى إن دعم عملية الإستخلاص بتأثير الموجات فوق السمعية Ultrasonic كانت أقل فاعلية من طريقة الإستخلاص بـ Soxhlet. كما أشار Salih و Al - Obaedi (2011) الى إن إستخدام التردد 47,6 كيلو هرتز شجع زيادة الوزن الرطب لكالس نبات الخروع *Ricinus communis* L. وزيادة بروتيناته لتسجل أعلى معدلاتها 2,21 ملغم/غم في كالس الأوراق الفلقية قياساً بـ 1,53 ملغم/غم لعينة المقارنة. وذكر العبيدي (2012) إن إستخدام التردد 47,6 كيلو هرتز حفز زيادة الوزن الرطب لكالس السيقان لنبات السنامكي *Cassia acutifolia* Del. إذ سجل معدل الوزن الرطب لكالس السيقان 5,24 غم عند تعريضه مدة ٤٥ دقيقة قياساً بـ 2,04 غم لعينة المقارنة وسجل المحتوى البروتيني 1,76 ملغم/غم قياساً بـ 1,50 ملغم/غم للمقارنة.

الهدف من هذه الدراسة ان الكالس المستحدث من اوراق البادرات الناتجة من الزراعة النسيجية قد تأثر بالموجات فوق السمعية عند فترة 20 دقيقة مما أدى الى زيادة وزن الكالس وزيادة كمية البروتين فيه وأيضا معرفة مدى تأثير هذه الموجات على كمية قلويدات التروبان المختلفة (**Scopolamine**، **Tropine**، **Hyoscyamine Sulfate**، **Atropine**) في الكالس المعرض للموجات فوق السمعية.

مواد البحث وطرائقه

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 6٪ 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 أجزاء من الأوراق على وسط MS الصلب المزود بالتراكيز المنتخبة 0,0 ،0,25 ، 0,5 ، 0,75 ، 1,0 ملغم. لتر$^{-1}$ BA مضافاً له 1,0 ملغم. لتر$^{-1}$ 2,4-D وأخذت بياناتها بعد 4 أسابيع من الزراعة. الكالس المستحدث من زراعة أجزاء من الأوراق على وسط MS الصلب المزود بالتركيز 1,0 ملغم. لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0,5 ملغم. لتر$^{-1}$ BA بعد 4 أسابيع عرض الى الموجات فوق السمعية وذلك بوضع عينات الكالس في قنانٍ زجاجية فارغة ومعقمة حجم 125 ملليتر محكمة الغطاء ووضعت في حجرة جهاز الموجات فوق السمعية (Unisonics PTY, LTD, Type : FXP 12, Sydney, Australia) عند التردد فوق السمعي 50 كيلو هرتز ولفترات 20، 40، 60 دقيقة وعند درجة حرارة الغرفة (Al- Obaedi وSalih ، 2011)، وبعد إنتهاء تعريض جميع العينات زرعت في وسط الاستحداث المشار إليه أعلاه لأربعة أسابيع أخرى، إضافة إلى معاملة المقارنة التي تمثل عينات الكالس غير المعرضة للموجات فوق السمعية. استعملت لزراعة الاجزاء النباتية قناني زجاجية سعة 125 مل وضع بها 20 مل من الوسط الغذائي وضبطت الدالة الهيدروجينية pH عند 5.7 وغُطِّيت فوهة القنينة برقائق الألمنيوم،تم تعقيم الوسط الغذائي بجهاز المؤصدة (Autoclave) عند درجة حرارة 121مْ 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^{o}، 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^{o} لحين بدء التشخيص، أما Hyoscyamine Sulfate تم إذابة 0.01 غم من المادة النقية في 5 مل من الأيثانول، أُستخدمت 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 أُستخدم جهاز من نوع (Merck Hitachi L - 7400) المتوفر في مختبر الأجهزة الدقيقة التابع لكلية الزراعة – جامعة صلاح الدين في أربيل، بإستخدام عمود الفصل 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 pH 7.2 وحقن

20 مايكروليتر من العينات المراد قياسها كل عينة على حدا وقورن كل من زمن الإحتباس ومساحة المنحني لمركبات Atropine و Sulfate Hyoscyamine و Scopolamine و Tropine للعينات القياسية مع زمن الإحتباس ومساحة المنحني للمركبات في مستخلصات العينات النباتية المدروسة واحتسبت تراكيز المركبات المفصولة حسب المعادلة الآتية :

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

النتائج والمناقشة

يبين الجدول (1) إن نسبة استحداث الكالس كانت 100٪ وللمعاملات المختلفة من زراعة الأوراق وتم الحصول على أعلى وزن رطب للكالس 4,61 غم/جزء نباتي من الزراعة على وسط MS المجهز بـ 0,5 ملغم.لتر$^{-1}$ BA مع ١,٠ ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D متفوقة معنوياً عن باقي المعاملات وهذه المعاملة بدورها أعطت نسبة 90٪ لتمايز الكالس الى نموات وبمعدل عدد 12,0 فرع/جزء نباتي وكان محتواها من البروتين ٠,٢٤ ملغم/غرام، وقد تفسر هذه النتائج على اساس ان للاوكسينات دورا في استحداث الكالس على الاجزاء النباتية وان اضافة السايتوكاينين الى الوسط بوجود الاوكسين تؤدي الى زيادة نمو الكالس وتشجيع انقسام الخلايا وإن حدوث حالة التوازن بين الأوكسين والسايتوكاينين يؤدي إلى تمايز الكالس إلى الأفرع أو الجذور أوكليهما (Hartmann واخرون , 2002).

الجدول (1) تأثير إضافة BA و2,4-D في استحداث وتنمية الكالس من زراعة الأوراق لنبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. على وسط MS الصلب بعد 4 أسابيع من الزراعة.

محتوى البروتين (ملغم/غم)	عدد النموات الخضرية	تمايز الكالس (٪)	وزن الكالس الرطب(غم)	استحداث الكالس (٪)	2,4-D (ملغم.لتر⁻¹)	BA (ملغم.لتر⁻¹)
0,23	0,0	b 0,0	e 0,97	a 100	1,0	0,0
0,22	7,0	b 30	d 3,13	a 100		0,25
0,24	12,0	a 90	a 4,61	a 100		0,5
0,40	11,0	a 90	c 4,11	a 100		0,75
0,26	9,0	a 80	b 4,26	a 100		1,0

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

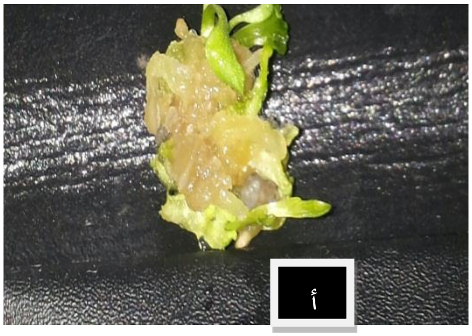
يبين الجدول (2) التأثيرات المشجعة للموجات فوق السمعية في تحفيز نمو الكالس عند فترة التعريض 20 دقيقة إستدلالاً من الزيادة الحاصلة في أوزانه الرطبة عند نموه في وسط الاستحداث بعد 30 يوم من معاملته، وأظهرت النتائج إن فترة التعريض 20 دقيقة حققت أعلى وزن رطب للكالس 7,11 غم متفوقة معنوياً على باقي المعاملات يناظرها أقصى زيادة في كمية البروتينات عند نفس فترة التعريض وبأعلى نسبة بقاء للكالس 70٪ والتي أعطت أعلى كمية من البروتين 0,40 ملغم/غرام (الشكل 1)، وتفسر هذه النتائج على أن الموجات فوق السمعية تؤثر في نفاذية الأغشية البلازمية للخلايا وتكوين فتحات صغيرة تدعى Microwounding تمنح الخلايا فرصة أكبر للحصول على متطلباتها من الوسط الغذائي، فضلاً عن تحفيزها بناء البروتين في هذه الخلايا (Joersbo و Brunstedt، 1990 و Dong وأخرون، 2002)، وإن إنخفاض معدل الوزن الرطب للكالس ومحتواه البروتيني في فترات التعريض الطويلة ربما يعود الى عدم تحمل كتلة الكالس للتأثيرات الميكانيكية لهذه الموجات

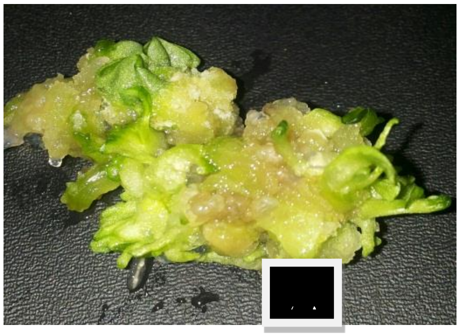
وأضرارها للنسيج النباتي والجزيئات الحيوية وتزايد أعداد الجروح في النسيج المعرض (Liu وأخرون، 2005) . وهذا يتماشى مع العبيدي (2012) .

الجدول (2) تأثير تعريض كالس أوراق نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. للموجات فوق السمعية بتردد 50 كيلو هرتز النامي على وسط MS المجهز بـ 0,5 ملغم.لتر⁻¹ BA مع 1,0 ملغم.لتر⁻¹ 2,4-D بعد 30 يوم من المعاملة.

فترة التعريض (دقيقة)	بقاء الكالس (%)	وزن الكالس الرطب(غم)	محتوى البروتين (ملغم/غم)
0,0	ab 40	b 5,00	0,27
20	a 70	a 7,11	0,40
40	ab 30	c 4,83	0,20
60	b 20	d 4,72	0,33

***الأرقام ذات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً فيما بينها حسب أختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5%.**





الشكل (1): كالس أوراق نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. نامي على وسط الاستحداث

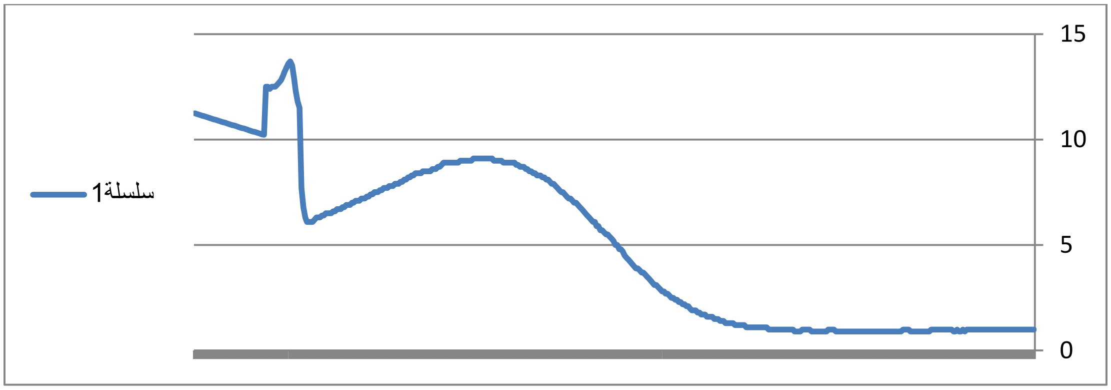
(0.5 ملغم.لتر⁻¹ BA مع 1.0 ملغم.لتر⁻¹ 2,4-D) لمدة 30 يوم

أ- المقارنة ب- كالس معرض الى الموجات فوق السمعية بتردد 50 كيلو هرتز لمدة 20 دقيقة

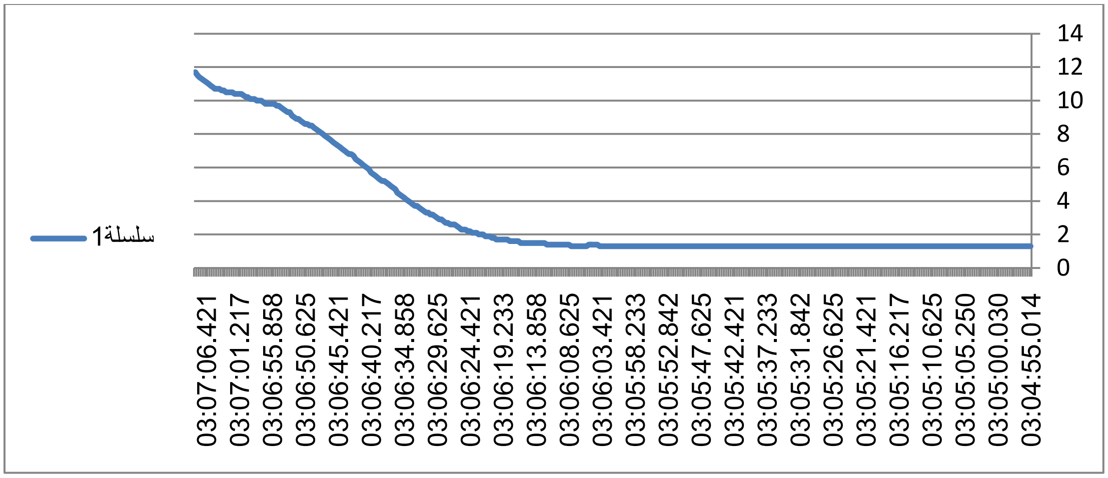
يبين الجدول (3) والأشكال (2، 3، 4، 5) زمن الأحتباس بالدقيقة والمساحة تحت المنحني للعينات القياسية إذ كان زمن الأحتباس والمساحة تحت المنحني (3.626 – 3.494 – 2.892– 2.910) و(273.2 – 278.8 – 270.8 – 217.7) للمركبات Atropine، Hyoscyamine Sulfate، Scopolamine، Tropine على التوالي.

الجدول (3): زمن الأحتباس والمساحة تحت المنحني للعينات القياسية.

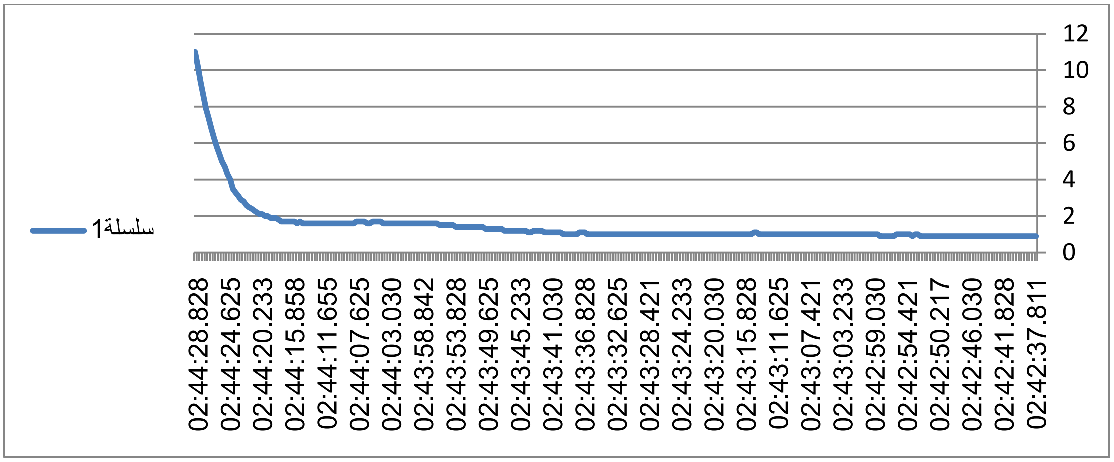
المساحة تحت المنحني **Detected Area**	زمن الأحتباس (دقيقة) **Retention Time (min)**	المادة **Standared Sample**
273.2	**3.626**	**Atropine**
278.8	**3.494**	**Hyoscyamine Sulfate**
270.8	**2.892**	**Scopolamine**
217.7	**2.910**	**Tropine**



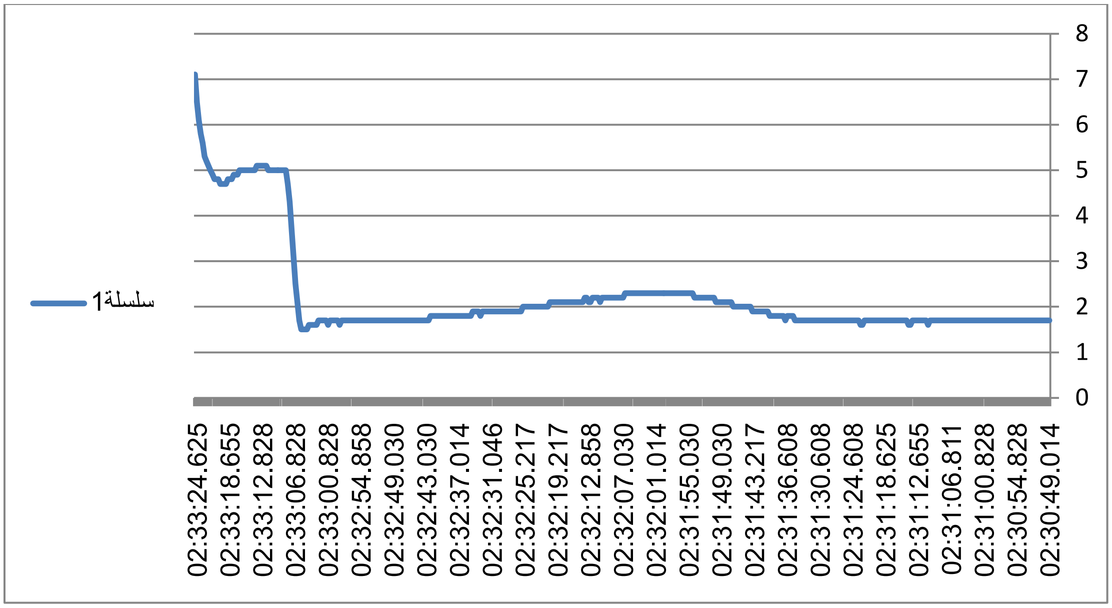
الشكل (2): زمن الإحتباس (دقيقة) للعينة القياسية Atropine.



الشكل (3): زمن الإحتباس (دقيقة) للعينة القياسية Hyoscyamine Sulfate.



الشكل (4): زمن الإحتباس (دقيقة) للعينة القياسية Scopolamine.



الشكل (5): زمن الإحتباس (دقيقة) للعينة القياسية Tropine .

يبين الجدول (4) زمن الاحتباس والمساحة تحت المنحني وكميات القلويدات Atropine و Hyoscyamine Sulfate وScopolamine و Tropine في عينات مستخلصات كالس أوراق نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. المعرضة للموجات فوق السمعية بتردد 50 كيلو هرتز النامية على وسط MS المجهز بـ 0.5 ملغم.لتر⁻¹ BA مع 1.0 ملغم.لتر⁻¹ 2,4-D بعد 30 يوم من المعاملة، إذ يتضح إن عينة المستخلص لمعاملة المقارنة أعطت أعلى كمية للقلويد Atropine (0.08) ملغم/غم وزن رطب عند زمن الاحتباس 3,626 ومساحة تحت المنحني 20,4 ، وكما أعطت المعاملة نفسها أعلى كمية للقلويد Hyoscyamine Sulfate 0,10 ملغم/غم وزن رطب عند زمن احتباس 3,494 ومساحة تحت المنحني 24,2، والتي أعطت أيضاً أعلى كمية للقلويد Scopolamine 0,20 ملغم/غم وزن رطب عند زمن الاحتباس 2,894 ومساحة تحت المنحني 46,0، والتي بدورها أعطت أعلى كمية للقلويد Tropine 0,25 ملغم/غم وزن رطب عند زمن الاحتباس 2,912 ومساحة تحت المنحني 47,1، قد يعود سبب تفوق معاملة المقارنة عن المعاملات المعرضة للموجات فوق السمعية في إنتاج القلويدات إلى التأثير الحراري للطاقة الصوتية والقوة الميكانيكية التي تسبب إرسال

موجات دقيقة مؤذية (Vercet وأخرون، 2002) وهذه العوامل لوحدها أو مع بعضها تؤدي الى تقليل إنتاج مركبات الأيض الثانوي. وإن التعرض لعوامل فيزياوية لاتؤدي فقط إلى تغير في الصفات المظهرية للنباتات وإنما إلى تغير في محتواها من المركبات (مرتضى، 2001 والبياتي، 2002).

الجدول (4): كمية المركبات القلويدية المستخلصة من كالس أوراق نبات ست الحسن *Atropa belladonna* L. المعرضة للموجات فوق السمعية بتردد 50 كيلو هرتز النامية على وسط MS المجهز بـ 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ BA مع 1,0 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D بعد 30 يوم من المعاملة.

	Scopolamine			Tropine			Hyoscyamine Sulfate			Atropine		
فترة التعرض (دقيقة)	R.t. (دقيقة)	المساحة تحت المنحني (ملم)	كمية القلويد (ملغم/غم)	R.t. (دقيقة)	المساحة تحت المنحني (ملم)	كمية القلويد (ملغم/غم)	R.t. (دقيقة)	المساحة تحت المنحني (ملم)	كمية القلويد (ملغم/غم)	R.t. (دقيقة)	المساحة تحت المنحني (ملم)	كمية القلويد (ملغم/غم)
0.0	2,894	46.0	0.20	2,912	47,1	0,25	3,494	24,2	0,10	3,626	20,4	0,08
20				2,910	22,5	0,12	3,494	18,0	0,07			
40	2,892	15,2	0.06	2,908	15,1	0,08	3,587	10,2	0,04	3,626	10,7	0,04
60												
العينة القياسية	2,892			2,910			3,494			3,626		

المصادر

١. البياتي، فراس عباس يونس (٢٠٠٢). إحداث التغابرات الوراثية في بذور ونباتات وكالس فول الصويا Glycine max L. (صنف إباء) بإستخدام أشعة كاما وتأثيراتها في المحتوى البروتيني ونسبة الزيت. رسالة ماجستير، كلية التربية/ جامعة الموصل – العراق.

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

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

٤. العبيدي، كرم ثامر عزيز (٢٠١٢). تعزيز الموجات فوق السمعية لزراعة أنسجة نباتات السنامكي *Cassia acutifolia* Del. وتحوله وراثياً ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601. رسالة ماجستير, كلية التربية / جامعة الموصل – العراق.

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

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

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

8. Ayatollah, F.; M. Ghanati and A. Dehaghi (2011). Stimulation of taxol production by combined salicylic acid elicitation and sonication in *Taxus baccata* cell culture. Conference on Life Sciencce and Technology, 3 : 193 – 197.

9. Demaggio, A. E. and J. A. Lott (1964). Application of ultrasound for increasing alkaloid yield from *Datura stramonium* . J. Pharm. Sci., 53 : 945 – 949.

10. Dong, L. L.; W. J. Yong ; L. D. Lin and J. Y. Wu (2002). Enhancement shikonin production in single and two phase suspension cultures of *Leptospermum erythronhizon* cells using low - energy ultrasound. Biotech. Bioeng, 78: 81 – 88.

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

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

13. 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.

14. Joersbo, M. and J. Brunstedt (1990). Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication. Plant Cell Repts, 9: 207 – 210.

15. 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).

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

17. Liu, H.; Y. X. Yan ; W. Y. Wang and Y. Y. Yu (2005). Improvement of the activity of activated sludge by low intensity ultrasound. Environ. Sci., 26: 124 – 128.

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

19. Price, G.J. (1992). Current Trends in Sonochemistry. Cambridge : Royal Society of Chemistry. UK.

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

21. Salih, S. M. and R. F. Al - Obaedi (2011). Investigation of the effect of some ultrasonic waves and electrotreatment in callus initiation and plant regeneration of *Ricinus*

communis L. seedlings. Dirasat. Nat. Pure Sci., 38 : 61- 71.

22. Sas, copyright © 2002. Institutc Inc. Cary, Nc 27513, U.S.A.
23. Stanisavljevic I. T.; M. L. Lazic and V. B. Veljkovic (2007). Ultrasonic extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds. Faculty of Technology, Bulevar Oslobodenja 124, 16000 Leskovac, Serbia. 14 (5) : 646 – 652.
24. Vercet, A.; P. Lopez and J. Burgos (1998). Free radical production by nanothermosonication. Ultrasonic, 36 : 15 - 18.
25. Wray, P. E. and L. D. Small (1958). The application of ultrasonic energy to the extraction of Belladonna leaf U.S.P.. J. Pharm. Sci., 47 : 823– 826.