الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة منتوري –قسنطينة-

كلية علوم الطبيعة و الحياة　　　　　قسم البيولوجيا و علم البيئة

رقى انتزتِب.........　　　　　قى رانتسهسم ....

أطروحــــة

مقدمة لنيل درجة دكتـوراه في العلـوم

شعبــة: بيولوجيا نبات

تخصص: تحسين إنتاج النبات

الموضوع:

مساهمة لدراسة تأثير الهرمونات النباتية على تراكم المواد الفعالة في نبات السكران الأبيض *Hyoscyamus albus* L.

تقديـم:
قــاضــي كنزة

تحت إشراف الدكتور:
يحــي عبد الوهاب

لجنة المناقشة:

ثبلجبسن	رأعر	خبِعخ زىسٌ لغغُءخ	سؤغب
حِ عِذ اٌىهبةأعزب رسِضش		ٌثُوض اٌد بعِ ُخ	شهِسا
صشى صوس اِ حّخ	رأعر	خبِعخشحبدعجبط ععُف	ّزحب
خف نادَخ	عزأبرح	خبعخ زىسٌ لغغُءخ	ّزحخ
د ٌُجبد اٌعُذ	أعزب رسِضش	خبعخ زىسٌ لغغُءخ	ّزحب
شحص الله داود	رأعر	خبِعخشحبدعجبط ععُف	ّزحب

ناسُت لنبيعٍ: **2010-2009**

اهداء

إلى روح والدي الطاهرة

إلى والدتي العزيزة

إلى زوجي الفاضل

إلى ابنتي شبيلة

إلى جميع أفراد أسرتي الكبيرة

أهدي ثمرة جهدي

كنزة قاضي

شـــكــــــــر و امتـــنــــــان

الحمد و الشكر لله الذي أكرمني فأنار دربي و أتم علي نعمته لإكمال هذا البحث و إخراجه

في المستهل أتقدم باسمي معاني الشكر وعظيم الامتنان لأستاذي الفاضل الدكتور يحي عبد الوهاب الذي اشرف على هذا البحث و لم يبخل علي بنصائحه و توجيهاته و الذي ذلل أمامي أصعب خطوات عملي، كما اشكره على صبره و سعة صدره طيلة مشوار عملي راجية من المولى عز و جل أن يرفعه بالعلم درجات.

و انه لشرف عظيم لي قبول الأستاذ **باقة مبارك** أستاذ بقسم البيولوجيا و علم البيئة – جامعة منتوري قسنطينة- على قبوله ترأس لجنة المناقشة.

بكثير من الثناء و الشكر للأستاذ **بوزرزور احمنة** أستاذ بجامعة فرحات عباس-سطيف- على قبوله عضوية لجنة المناقشة و الذي لم يبخل علي بنصائحه و توجيهاته القيمة.

و يستوقفني كذلك الشكر الجزيل للأستاذة الفاضلة يخلف نادية أستاذة بمخبر الوراثة، بكلية العلوم الطبيعية بجامعة منتوري.LMDالكيمياء الحيوية و البيوتكنلوجيا و مسؤولة

و انه لشرف عظيم حضور الدكتور دهيمات العيد عميد كلية علوم الطبيعة و الحياة بجامعة منتوري – قسنطينة- و قبوله عضوية لجنة المناقشة.

كما أتقدم بأخلص الشكر للأستاذ **حرز الله داوود** أستاذ و نائب عميد كلية العلوم بجامعة فرحات عباس – سطيف- على قبوله عضوية لجنة المناقشة.

كذلك لا يسعني أن اعبر عن عميق شكري و امتناني و عرفاني بالجميل للأستاذ الدكتور محمد **ثروت عبد الهادي** رئيس قسم النبات وحدة البيوتكنولوجيا بالمركز القومي للبحوث -القاهرة-، الذي استضافني لإجراء الزراعة النسيجية و مساعدته القيمة.

كما لا يفوتني أن أتقدم بأسمى عبارات الشكر للأستاذ الفاضل **بوالخلوة** أستاذ بجامعة تبسة على سعة صدره و توجيهاته القيمة التي لم يبخل بها علي.

في الختام اثني على كل من ساهم في إخراج هذا البحث إلى النور.

المختصـــرات

- **IAA** Indole 3-Acétique Acide
- **ARN** Acide Ribonucléique
- **ARN_m** Acide Ribonucleïque Messager
- **ARN_T** Acide Ribonucleïque Transport
- **BAP** Benzyl Amino Purine
- **CCM** Chromatographie sur Couche Mince
- **CPG** Chromatographie en Phase Gazeuse
- **CPL** Chromatographie en Phase Liquide
- **2,4-D** 2,4- Dichloro Phénoxy Acétique
- **H** Hyoscyamus
- **H6H** Hyoscyamine 6β-hydroxylase
- **HPLC** Chromatographie Liquide à haute performance
- **IR** Infra Rouge
- **K** kénetine
- **L.** Linné
- **LS** Linsmaier and Skoog's basal salts
- **MS** Murashige and Skoog's basal salts
- **NAA** Naphthalin Acetic Acid
- **ODC** Ornithine Décarboxylase
- **PAA** Phenoxy Acétic Acid
- **PAA** Phényle Acetic Acid
- **PMT** N-Methyle Putrescine Transférase
- **Rf** Rate of Flow
- **RMN** Résonance Magnétique Nucléaire
- **SM** Spectrophotométrie de Masse
- **UV** Ultras Violet

الفهــرس

المحتوى | الصفحة

مقدمـــــة.. 1

الجزء النظري

I- نبات اٌغَشا ْ.. 3

I-1-رعشَف نبات اٌغىشا... 3

I-2- و طف نبات اٌغ شاأ الثُض .Hyoscyamus albus L................................... 4

I-3-ر ظ ُف نبات اٌغىشاأ لثُض... 5

I-4- أل ه ّ ُخ اٌغخ ُخ ٌجبد اٌغ شاأ الثُض... 5

I-5- اٌخ ىي اٌىُّ بئ ٍجبد اٌغ شاأ لثُض... 6

II- اٌمٍ ىَذ اد.. 6

II-1-ِش جبد اٌزّثُ ىَضُخ ٌٕجبد ي ٌ... 6

II-2-رعشَف اٌمٍ ىَذ اد.. 7

II-3- ى ب ِْس اخز اٌمٍ ىَذ اد وخ ُ م ب... 7

II-4- خى اص اٌمٍ ىَذ اد.. 8

II-5-رغ ّ ُخ اٌمٍ ىَذ اد.. 9

II-6- اٌزخ ٍُك اٌح ُ ىٌ ٌٍمٍ ىَذ اد.. 9

II-7-ر ظ ُف اٌمٍ ىَذ اد.. 11

II-8- طشق رحذ ش اٌمٍ ىَذ اد.. 13

II-9- طشق اٌىشف عَ اٌمٍ ىَذ اد... 13

II-10- طشق اعخالص اٌمٍ ىَذ اد.. 13

II-11ف ظ ٌ اٌمٍ ىَذ اد.. 14

II-12-لٍ ىَذ اد اٌزشاُث ْ.. 14

II-12-1-رعشَف لٍ ىَذ اد اٌزشاُث ْ.. 14

II-12-2-اٌ ه ىُع ُ ب ِ.. 15

II-12-3- اٌغ ى ىُ لامين.. 15

II-12-4-رحىي اٌ ه ىُع ُ ب ِ إ ٌ َ اٌغ ى ىُ لامين... 16

III- اٌهشمونات إٌجبر ُخ... 16

III-1-رعشَف اٌهشمونات إٌجبر ُخ.. 16

III-2- ع ّ ً اٗشمونات ٙجٌبوخ ُف ٍ اٌٗخ ٍُخ 17
III-3- الووغ ُبد 19
III-3-1 -رعٍشف اال ووغ ُبد 19
III-3-2 ثعض ٔاٌزٌٗؤُش اد اٌّعشوف خ ّ ً األووغ ُبد 19
III-3-3-رأٔش األووغ ُبد ع ٍ ً ٌٕاد ح اٌزّ ٕبث خ ٌٍض ٌّٕ ح ٌبثبد ف ٕاٌضس اع خ اٌخ ّ ٌٍش خ 20
III-3-4- أٔٛاع حب ٍِض اٌٗخ ٍُه 20
III-3-5 - 4,2 ثبئ ٍ ٌٍٛسوف ُى وغ ح ٍّض اٌٗخ ٍُه 20
III-4- اٌغزُٛو ُ ٍُ ُبد 21
III-4-1-رعٍش َف اٌغزُٛو ُ ٍُ ُبد 21
III-4-2- أ ه ُ اٌزٌٗؤُش اد اٌّعشوف خ ٌع ً اٌغزُٛو ُ ٍُ ُبد 22
III-4-3-رؤٌٗش اٌغزُٛو ٍُ ُبد ع ٍ ً ٌٕاد ح اٌزّ ٕبث خ ٌٍض ٌّٕ ح ٌبثبد ف ٕاٌضس اع خ اٌخ ّ ٌٍش خ 22
III-4-4- اٌٗ ٍ ُ ُ ٓ ٌ ص 23
III-4-5-ثّبض َ ً أ ٍ ُ ٍٛ ٌٗ ُ ى ٍس َ 24
III-5-رؤٌٗش اٌزذاخ ً ث ٌٓ اٗش ٌٗ ى ٌبد ع ٍ ً رشاو ُ ٌٕاد ح اٌزّ ٕبث خ ٌٍض ٌّٕ ح ٌبثبد ٌ ً فٍ خ ٍ ظ اٌ ٌغٗ ٍش ا 24
IV- اٌضس اع ـــــ خ اٌخ ّ ٌٍش خ La culture *in vitro* 25
IV-1- ٌ ّ ـــ ح ربس ٌ ٌ خ 25
IV-2-رعٍش َف ٌضس اع ٍ ح األٔ غد خ 26
IV-3- أ ه ُ ُ ٌٗد ال ٌد اٌٗشٌئ ٍ ُغ ُ ال ٌ ع ٌ ع ّ ً اٌضس اع خ اٌٗ ٍ غ ُد ُخ 26
IV-4شش وط و ِ شاح ـــ ً اٌضس اع ـــ خ اٌٗ ٍ غ ُد ُـــ خ اٌٗ ٍّبخ ح ـــــ خ 28
IV-5 ـــ ٌ ٌ ٌ ص س اع ـــ األٔ غد ـــ خ 28
IV-6- اٌخ غ ـــ ٌ اد ٌٗ ٌ ٌ ص س اع ـــــ األٔ غد ـــ خ 31
IV-7- ش ٌٗ ق اٌز ع ُّ ٌ ف ٌ ص س اع األٔ غد خ 31
IV-8- ٌٗ ٌٗش وف اٌ ٌٗ ُئ ُ خ ال ص خ ر ٌٗ ص س اع األٔ غد خ 31
IV-8-1- ال ٌٗ ِ ٌٗ خ ب د ا ٌٗ ٌ ٌ ئ ُخ 31
IV-8-2- ال ٌٗ ِ ٌٗ خ ب د ٌٗ ذ ش اس َخ 32
IV-8-3- اٌز ٌ ى َخ 32
IV-8-4- ح ٌ ّ ض خ ٌٕ ى ع ظ 32
IV-9- أ ه ُ ال ٌٗ ٌ ال ف ا ٌٗ ذ ٌ ُ ص س اع األٔ غد خ ٌٗ ى ع ُ خ ٌٍ ٌ ع ب ئ ٍ ً اٌز ٌٗ ُ ٌٗ ذ ٌٗ ٌ ُ ٌٗ ٌٗ ش 33
IV-10- ِ غ ـــــ ب ٌٗ ه و ع ش ق اٌٗ ح ظ ـــ ي ع ٍ ـــ ً ٌ ج ـــ ر ب د ا غ ال ٌٗ ـــ خ اٌٗ خ ض ـــ ش خ 33

الوسائل و الطرق

I-ص ساعخ إ٘جبد 34

II-ٌذساعخ إٌجبر١خ ٌجبد ا٘غ شا األِشاض 36

III-ٌذساعخ اٌّٛبئ١خ ٌجبد ا٘غ شا األِشاض 36

III-1-ازّذ١ش اٌّ ـ ٌّٛى١ـبد ٔجبد ا٘غ شا األِشاض 36

III - 1-1- اعخالص اٌّٛى١ـبد ثبٌّغزخ ٌـ ا العٛى١خ 36

III -1-2- اٌّبئ١خ ٚرع ٗ ا ٌّغ ٌٍـّ١خ ٌّٛى١ـبد اٌى١خ 37

III-2- ازٌح ٍ ٗ ٌّغٛش ٚغ١ش اف ٌ ٌّٛى١ـبد ٔجبد ا٘غ١ش األِشاض 37

III-2-1-ٚشٛ ثٛعبئً ٔـ ف ٌّغ ا٘غ شال١خ ٌ ّغ ٌزجض ا ٌّٛى١ـ ٔجبد ا٘غ١ش األِشاض 37

III-2-2-ٚشٛ ثٛعبئً ٔـ ف ٌّغ ا٘غ ـ ٌّغ ٌ ّغ ٌزجض ا ٌّٛى١ـ ٔجبد ا٘غ١ش األِشاض 38

IV-ال ضساعخ اٌ ٌغ ٌخ 39

IV-1- إٔبء اٌجٌٛس 39

IV-2 -رحض١ش ٍ ٌ١ال ضساعخ اٌ ٌغ ٌخ 39

IV- 3-رعم ١ ُ اٌجزٚح 40

IV-4-ٌٍضء اٌ ٌّغ ع 40

IV-5- ٔم ٌٍضء اٌ ٌّغ ع ٌغغ اٌجزٚح 40

IV-6- ٌٍزشٛف اٌجزٚح 41

IV-7- ٌٍّبعجبد اٌ أخٛرح 41

V-ٌذساعخ االحظبئ١خ 41

النتائج و المناقشة

I-اٌؼساعخ اٌٍجبر١خ ٌجبد ا٘غ شا األِشاض 42

I- 1-دساعخ رأص١ش اٌّشٛٔبد إٌجبر١خ ع ٍ ٝ ٌٍطف١بد اٌجٛش٠خ ٚفـ١ٍخ اٌّبعخ ٌجبد ا٘غ١ش األِشاض 42

I-1-1-رأص١ش اٌّشٛٔبد إٌجبر١خ ع ٍ ٝ ع ٝ ٙق ٔجبد ا٘غ١ش األِشاض 42

I-1-2-رأص١ش اٌّشٛٔبد إٌجبر١خ ع ٍ ٝ ع ٝ خزس ٔجبد ا٘غ شا األِشاض 43

I-1-3-رأص١ش اٌّشٛٔبد إٌجبر١خ ع ٍ ٝ غبح ٌّٛس ٌخ ٔجبد ا٘غ شا األِشاض 43

I-2-دساعخ ٠ُ شٛ ٚف١ٍٛخ ٌجبد ا٘غ شا األِشاض 46

I-2-1-دساعخ غ شـ ٍخ ٌزس ٔجبد ا٘غ١ش األِشاض 47

I-2-2-دساعخ حشش َ ح ُخ يجق نبات ا ّغ شا األش ُض 48
I-2-3-دساعخ حشش َ ح ُخ يجسل خ نبات ا ّغ ىشا ألش ُض 50
II-دساعخ ا ّ ىبُئ ُخ ِجبد ا ّغ ىشا اج ُ ض 51
II-1- اس ِ ّ ش ا ّ ى " ٍ ّ يِ َ ذ اد نبات ا ّغ ىشا ألش ُض 51
II-2-دساعخ حشوُخ ا ّ يِ ذاد ف ٍ نبات ا ّغ ىشا ألش ُض 56
II-2-1-ر ح ُ ّ ً اس ّ جبَ 56
II-2-2-ي ُ جخ ا ّ شاح ّ 57
II-2-3-دساعخ حشوُخ ي َ ذ اد نبات ا ّغ ىشا ثب ّغ ش ّ بيِ اس ّ ح ُ اإلحظبئ ٍ إ ّ ا ّ كونات الأساعُخ 58
II-3- اس ِ ّ ش ا ّ ي ع ٍ ّ يِ َ ذ اد نبات ا ّغ ىشا ألش ُض 62
II-3-1-وشوبوغشافُب ا ّ غشخ ّ ش ُ خ C.C.M. ّ ٍ ّ غخ ض ا ّ ي ّ ذ ّ ب َ ّ جبد ا ّغ شا األش ُض 62
II-3-2-وشوبوغشافُب ا ّ غبص ّ ش ُ خ C.P.G. ّ ٍ ّ غخ ض ا ّ ي ّ ذ ّ ب َ ّ جبد ا ّغ شا األش ُض 64
III-اضساعخ ا ّ ج ش ُ خ ِجبد ا ّغ شا األش ُض la culture *in vitro* 68
III-1-رإص ش ا ّ ش مونات و ا ّ ي ذ ع ٍ ا ّ ي ص ّ ا ّ غ ص ج ّ ٍ ّ ى ط ّ ب ّ ر ح ا ّ ض ساعخ ا ّ غ ُ ذ ُخ ي ّ ى س
نبات ا ّغ ىشا ألش ُض 68
III-1-1-رإص ش اس ّ ذا خ ّ ث ّ ا ّ K و ا ّ IAA ع ٍ ا ّ ي ص ّ ا ّ غ ص ج ّ ٍ ّ ى ط نبات ا ّغ شا األش ُض 68
III-1-2-رإص ش ّ ش ٍ ى ّ ا ّ 2,4-D ع ٍ ا ّ ي ص ّ ا ّ غ ص ج ّ ٍ ّ ى ط ّ جبد ا ّغ شا األش ُض 69
III-1-3-رإص ش اس ّ ذا خ ّ ث ّ ا ّ K و ا ّ NAA ع ٍ ا ّ ي ص ّ ا ّ غ ص ج ّ ٍ ّ ى ط نبات ا ّغ شا األش ُض 69
III-2-رإص ش ا ّ ش مونات و ا ّ ي ذ ع ٍ ا ّ غ خ ا ّ ى ّ ى خ ّ يِ َ ذ اد ا ّ ز ش او خ ف ٍ ا ّ ى ّ ط ّ ب ّ ر ح ع
ا ّ ض ساعخ ا ّ غ ُ ذ ُخ ي ّ ى س نبات ا ّغ شا األش ُض 70
III-2-1-رإص ش ّ ش ٍ ى ّ 2,4-D ع ٍ ا ّ غ خ ا ّ ى ّ ى خ ّ يِ َ ذ اف و ّ ى ط نبات ا ّغ ىشا
ألش ُض 71
III-2-2-رإص ش اس ّ ذا خ ّ ث ّ ا ّ K و ا ّ NAA ع ٍ ا ّ غ خ ا ّ ى ّ ى خ ّ يِ َ ذ اف و ّ ى ط نبات ا ّغ ىشا
ألش ُض 72
III-2-3-رإص ش اس ّ ذا خ ّ ث ّ ا ّ IAA و ا ّ K ع ٍ ا ّ غ خ ا ّ ى ّ ى خ ّ يِ َ ذ اف و ّ ى ط نبات ا ّغ ىشا
ألش ُض 73
اخال طخ 74

قبئًخ انًشاخع

ث ب ّ غ ا ّ ع ش ّ ُخ 77
ث ب ّ غ اد ألخ ج ُخ 78
اي ِ ح ك 97

قائمـــة الجـــداول

الرقم	العنـــــــــوان	الصفحة
01	أنواع السكران المنتشرة في مصر	03
02	الخواص العلاجية لبعض القلويدات ذات الأهمية الطبية و الصيدلانية و مردودها في الزراعة المخبرية *In vitro*	08
03	كمية القلويدات الكلية في الأعضاء المختلفة لنبات السكران خلال مرحلتي الإزهار و الإثمار	09
04	تصنيف القلويدات على أساس الحلقة غير المتجانسة	12
05	تأثير السيتوكنينات على القلويدات في الزراعة المخبرية *in vitro*	23
06	بعض أهم المواد الطبيعية المستخرجة من النباتات	27
07	أهم أنواع أوساط الزراعة المستعملة	30
08	تحليل التباين لتأثير الهرمونات على طول ساق نبات السكران الأبيض	42
09	تحليل التباين لتأثير الهرمونات على طول جذر نبات السكران الأبيض	43
10	تحليل التباين لتأثير الهرمونات على مساحة ورقة نبات السكران الأبيض	43
11	تأثير الهرمونات النباتية على الصفات الماكرومورفولوجية المقاسة لنبات السكران الأبيض	45
12	تحليل التباين لتأثير الهرمونات على النسبة المئوية لقلويدات المجموع الجذري لنبات السكران الأبيض	52
13	تحليل التباين لتأثير الهرمونات على النسبة المئوية لقلويدات المجموع الخضري لنبات السكران الأبيض	52
14	تحليل التباين لتأثير الهرمونات على النسبة المئوية لقلويدات المجموع الجذري لنبات السكران الأبيض في المراحل الأربع	56
15	تحليل التباين لتأثير الهرمونات على النسبة المئوية لقلويدات المجموع الخضري لنبات السكران الأبيض في المراحل الأربع	57
16	قيم معاملات الاستبقاء Rf لقلويدات نبات السكران الأبيض	64
17	نتائج تحليل التباين لتأثير الهرمونات المستعملة و الوقت و التداخل بينهما على الوزن الطازج لكالوس نبات السكران الأبيض	68
18	نتائج تحليل التباين لتأثير الهرمونات المستعملة و الوقت و التداخل بينهما على النسبة المئوية للقلويدات المتراكمة في كالوس نبات السكران الأبيض	70

قائمـــة الأشكـــال

الرقـــم	العنـــــــــوان	الصفحة
01	صورة المجموع الخضري لنبات السكران الأبيض	04
02	التخليق الحيوي للقلويدات التروبانية	10
03	حلقة التروبان	15
04	صيغة الهيوسيامين	15
05	صيغة السكوبولامين	16
06	التحول الحيوي للسكوبولامين انطلاقا من الهيوسيامين	16
07	آلية عمل الهرمونات النباتية في نمو الخلية	18
08	الصيغة الجزئية للـــ IAA	20
09	الصيغة الجزيئية للـــ 2,4-D	21
10	حلقة الأدنين	21
11	الصيغة الجزئية للـK	24
12	الصيغة الجزئية للـــ BAP	24
13	تصميم التجربة ميدانيا	35
14	الصيغة الجزئية للـــ NAA	40
15	قطاعات عرضية لمعاملات هرمونية مختلفة في ساق نبات السكران الأبيض	46
16	قطاعات عرضية لمعاملات هرمونية مختلفة في ورقة نبات السكران الأبيض	46
17	قطاعات عرضيـ في جذر نبات السكران الأبيض	48
18	قطاعات عرضيـ في ساق نبات السكران الأبيض	49
19	قطاعات عرضيـ في ورقة نبات السكران الأبيض	50
20	تأثير الهرمونات النباتية على تراكم قلويدات المجموع الجذري لنبات السكران الأبيض	53
21	تأثير الهرمونات النباتية على تراكم قلويدات المجموع الخضري لنبات السكران الأبيض	53
22	تأثير الهرمونات منفردة على النسبة المئوية لقلويدات نبات السكران الأبيض	54

23	تأثير الهرمونات النباتية متداخلة على تراكم قلويدات نبات السكران الأبيض	56
24	الدراسة الإحصائية باستعمال المكونات الأساسية(A.C.P.) لحركية القلويدات في نبات السكران الأبيض	61
25	كروماتوغرام الطبقة الرقيقة.C.C.M لقلويدات نبات السكران الأبيض	63
26	كروماتوغرام الطور الغازي للمستخلص القلويدي الخام الخضري لنبات السكران الأبيض	66
27	كروماتوغرام الطور الغازي للمستخلص القلويدي الخام الجذري لنبات السكران الأبيض	66
28	كروماتوغرام الطور الغازي الخاص بالسكوبولامين المرجعي	67
29	كروماتوغرام الطور الغازي الخاص بالاتروبين المرجعي	67
30	تأثير الــK و IAA على الوزن الطازج لكالوس نبات السكران الأبيض	69
31	تأثير هرمون الــ2,4-D على الوزن الطازج لكالوس نبات السكران الأبيض	69
32	تأثير هرموني الــ K بتركيز 0.5ملغ/ل و الــ NAA بتركيز 1ملغ/ل على الوزن الطازج لكالوس نبات السكران الأبيض	70
33	تأثير اختلاف تركيز هرمون 2,4-D على النسبة المئوية للقلويدات في كالوس نبات السكران الأبيض	71
34	تأثير 1 ملغ/ل من هرمون 2,4-D على النسبة المئوية للقلويدات في كالوس نبات السكران الأبيض	72
35	تأثير التداخل بين الــK بتركيز 0.5ملغ/ل و الــ NAA بتركيز 1ملغ/ل على النسبة المئوية للقلويدات في كالوس نبات السكران الأبيض	72
36	تأثير التداخل بين IAA و K على النسبة المئوية للقلويدات في كالوس نبات السكران الأبيض	73

مقدمة

مـــقـــــدمـــــــــة

رغم تطور و ازدهار العلوم كالكيمياء و الصيدلة و التقدم الكبير الذي أحرزه التخليق الكيميائي، ظهر في السنوات الأخيرة في أوساط الأطباء و العلماء اتجاه ا يتزايد تدريجيا في الارتداد إلى أساليب الطب الشعبي و التداوي بالأعشاب الطبية البرية الموجودة منذ القدم ، و تمثل هذا الاتجاه في الحصول على الدواء من مصادره الأساسية مباشرة أي من النباتات و الأعشاب البرية؛ هذا الاتجاه فرضته عدة عوامل منها خلو هذه النباتات من المواد الكيميائية الصناعية التي تسبب في كثير من الأحيان أعراضا جانبية قد تؤثر سلبا على صحة المريض، إضافة إلى التقدم العلمي الذي يوفر طرقا و أساليب فعالة في حفظ النباتات الطبية و سهولة تداولها وذلك بتصنيعها في صورة مركزات و خلاصات لزجة أو على هيئة أقراص و حبوب جافة تحتوي على جميع العناصر الفعالة الموجودة في النبتة الأساسية.

فبعد تفاقم الأضرار الناتجة عن استعمال المواد الكيميائية المختلفة، أصبحت العودة إلى الطبيعة مرة أخرى و التداوي بالأعشاب و النباتات الطبية الطبيعية كخامات دوائية و الاعتماد عليها بوصفها مصدرا آمنا للعلاج، ضرورة ملحة و حقيقة لا مفر منها، فـــ 80% من الشعوب تستعمل أدوية نباتية المصدر و 25% من التحضيرات الدوائية في الولايات المتحدة الأمريكية نباتية أي من مستخلصات النباتات الطبية (Fransworth et al., 1985)، إلا أن العائق الذي يحول دون الاعتماد على هذه النباتات كأدوية بشكل رئيسي هو الكميات القليلة التي تنتجها هذه النباتات فهي لا تغطي حاجيات الإنسان منها بالرغم من استعمالها بكميات محدودة.

و أصبح البحث في طرق و كيفية زيادة المواد و المركبات العلاجية في النباتات مجالا قائما بذاته و خص له مجموعات كبيرة من الباحثين، خاصة مع الثورة التي أحدثتها الهرمونات النباتية في مجال تأثيرها بالزيادة على تراكم المواد الفعالة في هذه النباتات و تنشيط الخلايا و تمايزها، و لتخفيض التكاليف الباهظة التي كانت تصرف في إنتاج هذه المواد *in vivo* أصبحت تنتج مخبريا *in vitro* في زراعات خلوية يتحكم بها و بكمية إنتاجها لكن دائما بفضل الهرمونات التي ترفع من تراكم هذه المواد (الشحات، 2000) بالرغم من عدم التوصل بعد إلى معرفة ميكانيزمات هذا التأثير.

و من هذا المنطلق، اخترنا في بحثنا هذا، نباتا طبيا من العائلة الباذنجانية (Solanaceae) هو نبات السكران الأبيض ***Hyoscyamus albus* L.** ، الذي يحتوي على قلويدات التروبان ذات الأهمية العلاجية البالغة و التي أهمها الاتروبين و السكوبولامين

(Doerkschmitz et al., 1994)، و قمنا بزراعته *in vivo* و *in vitro* و معاملته بالهرمونات النباتية كالاوكسينات متمثلة في IAA و 2,4-D و السيتوكنينات متمثلة في BAP و K منفردة و متداخلة، و معرفة تأثير هذه الهرمونات على تراكم المواد القلويدية به، كل هذا بعد الدراسة النباتية.

و لهذا شملت هذه الدراسة على الأقسام التالية:

* قسما خاصا بالدراسة النباتية المورفولوجية و التشريحية لنبات السكران الأبيض.

* قسما خاصا بدراسة تأثير الهرمونات النباتية (BAP،K،IAA و2,4-D) منفردة و متزاوجة على تراكم قلويدات نبات *السكران الأبيض* لينيه *in vivo* و تأكيد عمل الهرمونات مخبريا *in vitro*.

* قسما خاصا بالدراسة الكيميائية لنبات *السكران الأبيض* لينه متمثلة في التقدير الكمي و النوعي لقلويداته.

الجزء النظري

I- نبات السكران

I-1- تعريف نبات السكران

ينتمي نبات السكران إلى العائلة الباذنجانية (Solanaceae) (Robbers et al., 1996)، ويعد أهم نوع فيها بعد نباتي الداتورة و البلادون (Lee, 2006)، عرف منها 20 نوعا، ينمو بصورة برية في المناطق الرملية بسيناء وشواطئ البحر الأبيض المتوسط ممتدا حتى جمهورية السودان، إذ أنها تعد موطنه الأصلي (قبيسي، 1999؛ الحسيني والمهدي، 1990)، و يبين الجدول 01 أهم الأنواع المنتشرة في مصر.

كما أنه واسع الانتشار في كل من شمال إفريقيا وآسيا ووسط أوربا وجنوبها، إذ يتوزع 11 نوعا من نبات السكران في هذه المناطق، وأهم أنواعه المعروفة حسب Roberts and Wink (1998):

السكران الهندي *Hyoscyamus reticulatus*

السكران الذهبي *Hyoscyamus aureus*

السكران المصري *Hyoscyamus muticus*

السكران الأسود *Hyoscyamus niger*

Hyoscyamus pisillus

Hyoscyamus major Mill.

Hyoscyamus minor Mill.

Hyoscyamus luridus Salisb.

Hyoscyamus boveanus Dun.

Hyoscyamus desertorum Asch. & Boiss.

السكران الأبيض *Hyoscyamus albus* Linnet والذي هو محور دراستنا.

جدول -01- أنواع السكران المنتشرة في مصر (Tachholm, 1974)

الجنس	النوع	مناطق التواجد في مصر
Hyoscyamus	*H. pusillus* L.	نهر النيل
	H. reticulates L.	شواطئ البحر الأبيض المتوسط
	H. boveanus Dun.	
	H. muticus L.	مناطق النيل
	H. albus L.	الإسكندرية
	H. aureus L.	صحراء مصر
	H. desertorum Asch. & Boiss.	سيناء

اكتشف السكران في انجلترا ثم ادخل إلى المجال الصيدلاني سنة 1809 (Trease and Evans, 1996)، حيث أطلق على نبات السكران عدة تسميات بحسب المنطقة التي عرف فيها، فابن سينا أطلق عليه اسم البنج، وعرف بالسكران في مصر، ويطلق عليه في معظم الدول الغربية باسم: الشكران أو البنج، أما بالجزائر فكان يعرف باسم السكران ، بورنجوف، هبالة، و بالأمازيغية: ڨيرڨيط، طايليلول، أما باللاتينية فيطلق عليه اسم: Hyoscyamus مشتقة من شقين: Hyos و Cyamus وتعني The bean of the hog أي سم الخنزير، ويطلق عليه Henbane باللغة الانجليزية (Bernard, 2001; Arroo et al., 2007).

I-2- وصف نبات السكران الأبيض *Hyoscyamus albus* L.

يعد نبات السكران الأبيض من النباتات الطيبة المنتمية إلى العائلة الباذنجانية، وهو نبات عشبي، ارتفاعه من 30إلى90سم، ذو لون أخضر نوعا ما شاحب، ذو رائحة كريهة، تحمل ساقه المنتصبة والمجوفة أوراقا معنقة، متناوبة، ومغطاة بشعيرات كثيفة، العلوية منها قلبية الشكل، أما الأزهار فهي ناقوسية الشكل، صفراء اللون مائلة إلى الأخضر، بها عروق بنفسجية، خنثى، خماسية السبلات، منضغطة على الثمرة في شكل أقماع (Duke and Edwards, 1985; Pudersell, 2006 ;Iserin, 2001) كما هو واضح في الشكل 01.

شكل -01- صورة المجموع الخضري لنبات السكران الأبيض

I-3- تصنيف نبات السكران الأبيض

يتبع نبات السكران الأبيض في المملكة النباتية التصنيف التالي (Trease and Evans, 1978 ؛ سلامة، 1994):

الشعبة: النباتات الزهرية البذرية	**Phylum: Phanerogamas**
تحت الشعبة: مغطاة البذور	Sub phyhum: Angiospermas
الطبقة: ذوات الفلقتين	Class: Dicotyledons
الطائفة: الأغلفة الزهرية المتميزة	Division: Matachlamydeae
الصنف: ملتحمات البتلات	Raw: Sympetalae
الرتبة: الأبنوبيات	Ordre: Tubiflorae
العائلة: الباذنجانيات	Family: Solanaceae
الجنس: السكران	Genus: *Hyoscyamus*
النوع: الأبيض	Species: *albus*

I-4- الأهمية الطبية لنبات السكران الأبيض

عرف نبات السكران الأبيض منذ القدم بالأهمية الكبيرة في مجال الطب، رغم أنه من النباتات السامة جدا ويعد من المخدرات، وهذا لاحتوائه على مركبات الميتابوليزم الثانوي والتي تتمثل في القلويدات التروبانية أهمها الاتروبين و السكوبولامين (Nabil et al., 2009)، فهو يعتبر:

- مهدأ: Anodyne و مسكن Sedalive للآلام، ومحد د لآلام المثانة البولية (Leikin et al., 1998).
- مضاد للتشنجات Antispasmotique، الخاصة بمرض الشلل الرعاشي، وتخفيف التشنجات في المراحل الأولى من المرض (Chevalier, 1996).
- مدر للبول: Diuretique (Leikin et al., 1998).
- مهلوس: Hallucinogenique، و محدث للاضطرابات في الجهاز العصبي (Roddick, 1991).
- منوم: Hypnotique و معالج للأرق، مخدر: Narcotique (Frank and Rene, 2008)، ومحرض للنوم السريع (Weiner, 1987).
- موسع حدقة العين: Mydriatique، و معالج لمرض الربو (Asthma) و السعال الديكي (Manske and holmes, 1950; Oksman, 2007).
- معالج للقرحة المعدية، و مرض المانخوليا و الصرع (Launert, 1981; Grieve, 1984; Bown, 1995).

I-5- المحتوى الكيميائي لنبات السكران الأبيض

يحتوي نبات السكران الأبيض على الغلايكوسيدات و الفلافونويدات الغلايكوسيدية مثل Hyperside و الفلافونويدات الغليكولية مثل Kaempferole و بعض الأمينات الطيارة و الكولين مثل البيرولين و الكومارين و الدهون و بعض الأحماض غير المشبعة مثل حمض الاول يك و البروتينات (Pudersell, 2006) و العديد من العناصر المعدنية مثل: Mg, K, Zn, Ca (Arroo et al., 2007).

و كمحتوى أساسي، القلويدات التروبانية التي تختلف نسب تراكمها من عضو إلى آخر، حيث تعد النسبة المئوية للقلويدات من 0.5% إلى 1.5% من الوزن الجاف، إذ يشكل قلويد الهيوسيامين 4/3 كمية القلويدات في نبات السكران (قطب، 1979)، إضافة إلى مشتقات قلويدية مثل الاتروزين (Atroscine) و السكوبين (Scopine) (Michael et al., 2004).

II- القلويدات

II-1- مركبات الميتابوليزم الثانوي

تعرف مركبات الميتابوليزم الثانوي على أنها مركبات كيميائية عضوية، تنتج بكميات ضئيلة في النباتات خاصة منها الراقية، حيث تعتبر مركبات أيض نهائية تخزن في أنسجة خاصة (Sachan, 2004)، تنتج أساسا (كما هو واضح في الشكل 02) من التفاعلات الكيميائية المختلفة لمركبات الميتابوليزم الأولي التي تعتبر المصدر الرئيسي لها مثل : الأحماض الأمنية و السكريات و الأحماض الدهنية، هذه الأخيرة تعد نواتج أولية لعمليات الهدم و البناء التي تحدث داخل النبات و الناتجة عن عمليات التنفس و التركيب الضوئي...، حيث تتوسط هذه العمليات للوصول إلى مركبات الميتابوليزم الثانوي تفاعلات مثل عمليات: الأكسدة، الجلكزة، نزع الكاربون...(Tolonen, 2003).

لا تملك مركبات الميتابوليزم الثانوي دورا مباشرا في النبات مثل النمو و التكاثر ، لكنها تقوم بدور هام من اجل المحافظة على استمراره و بقائه مثل: الدفاع، المقاومة و التأقلم مع الظروف البيئية غير الملائمة كما لها فائدة في تشكيل الأدوية (Richter, 1993).

تصنف مركبات الميتابوليزم الثانوي على أساس التخليق الحيوي لها، فتقسم على أساس المركبات الأولية المنتجة منها إلى 3 أقسام هي: التربينات، عديد الفنولات و القلويدات التي هي محور دراستنا (Bourgoud et al., 2001).

II-2- تعريف القلويدات

تعرف القلويدات على أنها مركبات طبيعية عضوية، آزوتية، حلقية، غير متجانسة، تنتج في النباتات بكميات ضئيلة (سعيد، 2001).

كما أنها تعد مركبات قاعدية، متوسطة الكتلة الجزيئية، وتلك الخاصية القاعدية، خاصية غير مستقرة، حيث تختلف باختلاف تموضع ذرات الآزوت الداخل في بنيتها إلى جانب كل من: O، C و H، إذ تعتبر الأحماض الآمنية طلائع تخليق القويدات (Facchini et al., 2004; Oztekin-Mat, 1994).

تعد القلويدات من بين المركبات السامة لذا فهي:

* قد تقوم بدور منظمات للنمو لتأثيرها على العمليات الفيسيولوجية (Zayed and Wink, 2004).
* أو تعتبر مخزون احتياطي لعنصر الآزوت في وقت الحاجة (هيكل و عمر، 1993).
* مرسبات للسموم (Guignard, 1996).
* تلعب دور وقاية وحماية ضد الميكروبات والفطريات والحشرات والحيوانات العشبية (Baldwin and Prestin, 1999).

II-3- مكان تواجد القلويدات وتخليقها

اكتست النباتات الطبية المحتوية على القلويدات أهمية كبيرة منذ القدم، إذ تم فصل أكثر من 100000 نوع (Verpoorte and Memelink, 2002) و أكثر من 12000 نوع قلويدي عرفت بنيته الكيميائية و تخليقه الحيوي و تأثيره الفارماكولوجي (Croteau et al., 2000) و تعتبر النباتات المصدر الرئيسي لاستخلاصها (Foukarids et al., 1994)، و ليس الوحيد لأنه تم فصل القلويدات من مصادر حيوانية مختلفة مثل: قلويد Adrenaline (Bruneton, 1993)، و من بعض البكتيريا كقلويد Pyocyanine الخاص ببكتريا Pseudomonas Aeruginosa (Milcent, 2003).

وتحتل العائلة الباذنجانية المرتبة الثانية بعد العائلة الخشخاشية Papaveraceae من حيث غناها بالقلويدات وخاصة القلويدات التروبانية (Milcent, 2003 ;Pelletier, 1970)، كما أضافت Celma et al. (2001) أن قلويد الهيوسيامين ينتج بكميات كبيرة في جنس السكران بينما قلويد السكوبولامين ينتج بكميات قليلة عكس ما يحدث في نبات الداتورة.

تعتبر القلويدات نواتج عمليات تعرف بالميتابوليزم الثانوي إلى جانب مركبات أخرى هي: الفلافونويدات، التربينات... (Xu et al., 1995)، و قد أثبت علميا أن مقر التخليق الحيوي للعديد من القلويدات هو الجذور (Oksman and Arroo, 2000; Roberts and Wink, 1998)، ثم تنتقل إلى باقي أجزاء نبات عبر الأوعية الخشبية، وتتراكم في الأنسجة البشرية له (هيكل وعبد الرزاق، 1988؛

كما تأكد مؤخرا تمركزها في أنسجة خاصة جدا كالقشرة الخارجية للسيقان (Boitel-conti et al., 2000 والجذور والبذور (Hesse, 2002).

II-4- خواص القلويدات

*** الخواص الطبيعية:**

- مركبات عديمة اللون والرائحة ما عدا جزءا منها مثل: Berbérine.
- مرة الطعم وغير متطايرة، وقليل منها عالي الأروماتية مثل: Colchicine.
- تذوب في المذيبات العضوية القطبية (كلوروفيل، الإيثر) أو غير القطبية (الهكسان) ولا تذوب في الماء إلا في حالات نادرة أو عندما تكون على شكل أملاح (Bruneton, 1999).

*** الخواص الكيميائية للقلويدات**

- سهلة التأكسد عند تعرضها للهواء، الحرارة والأوكسجين مما يسهل انحلالها وتكسرها.
- كتلتها الجزئية محصورة بين 100-900غ/مول.
- أغلبيتها عبارة عن أمينيات قاعدية، وهذا لتواجد زوج إلكتروني حر على ذرة الآزوت ، التي تحتوي منها على ذرة الأوكسجين تكون صلبة، أما التي لا تحتوي على ذرة الأكسجين تكون سائلة.
- تترسب القلويدات بمرسبات مثل: حمض التانيك (Seigler, 1999).

*** الخواص العلاجية:** يختلف تأثير القلويدات باختلاف أنواعها كما هو ملخص في الجدول02.

جدول -02- الخواص العلاجية لبعض القلويدات ذات الأهمية الطبية و الصيدلانية و مردودها في الزراعة المخبرية *In vitro* (Verpoorte et al., 1993)

Alcaloïdes	Propriétés	Espèces	Rendement *in vitro*
Morphine	Analgésique	*Papaver somniferum*	0.25g/l
Codéine	Antitussif	*Papaver somniferum*	0.25g/l
Colchicine	Antigoutteux	*Colchicum autumnale*	0.0006%
Quinine	Antipaludéen	*Cinchona sp.*	Traces
Atropine	Parasympatolytique	*Atropa belladona*	0.1-0.2g/l
		Datura sp.	–
Scopolamine	Parasympatolytique	*Dubiosia sp.*	–
		Hyoscyamus sp.	0.08g/l
Réserpine	Sédatif	*Rauvolfia sp.*	–
Vincristine	Antitumoral	*Catharanthus roseus*	Traces
Vincamine	Oxygénation cérébrale	*Vinca minor*	3.3g/l

II-5- تسمية القلويدات

اتفق العلماء أمثال هيكل وعبد الرزاق(1988) و Milcent (2003) على أن تسمية القلويدات تنتهي بالمقطع: (ine) وهي العامل المشترك الدال على أنها مركبات آمنيۃ، فالجزء الأول يشتق من اسم:

- الجنس (genre) النباتي المستخلص منه القلويد مثل Hyoscyamine من جنس Hyoscyamus.
- النوع (espèce) النباتي الحامل للقلويد مثل قلويد Cocaine من النوع النباتي *Erythroxylum coca*.
- الشائع للنبات المحتوي على القلويد مثل قلويد Ergotamine من نبات الأرجوت Ergote.
- المكتشف مثل قلويد Narcotine مشتق من اسم اللورد Narcot.
- التأثير الفيسيولوجي مثل قلويد Emetine لأن تأثيره Emetique مقيء.
- المنطقة الجغرافية مثل قلويد Tasmanine من منطقة Tasmania.
- الخواص الطبيعية مثل قلويد Hygrine أي متميع.

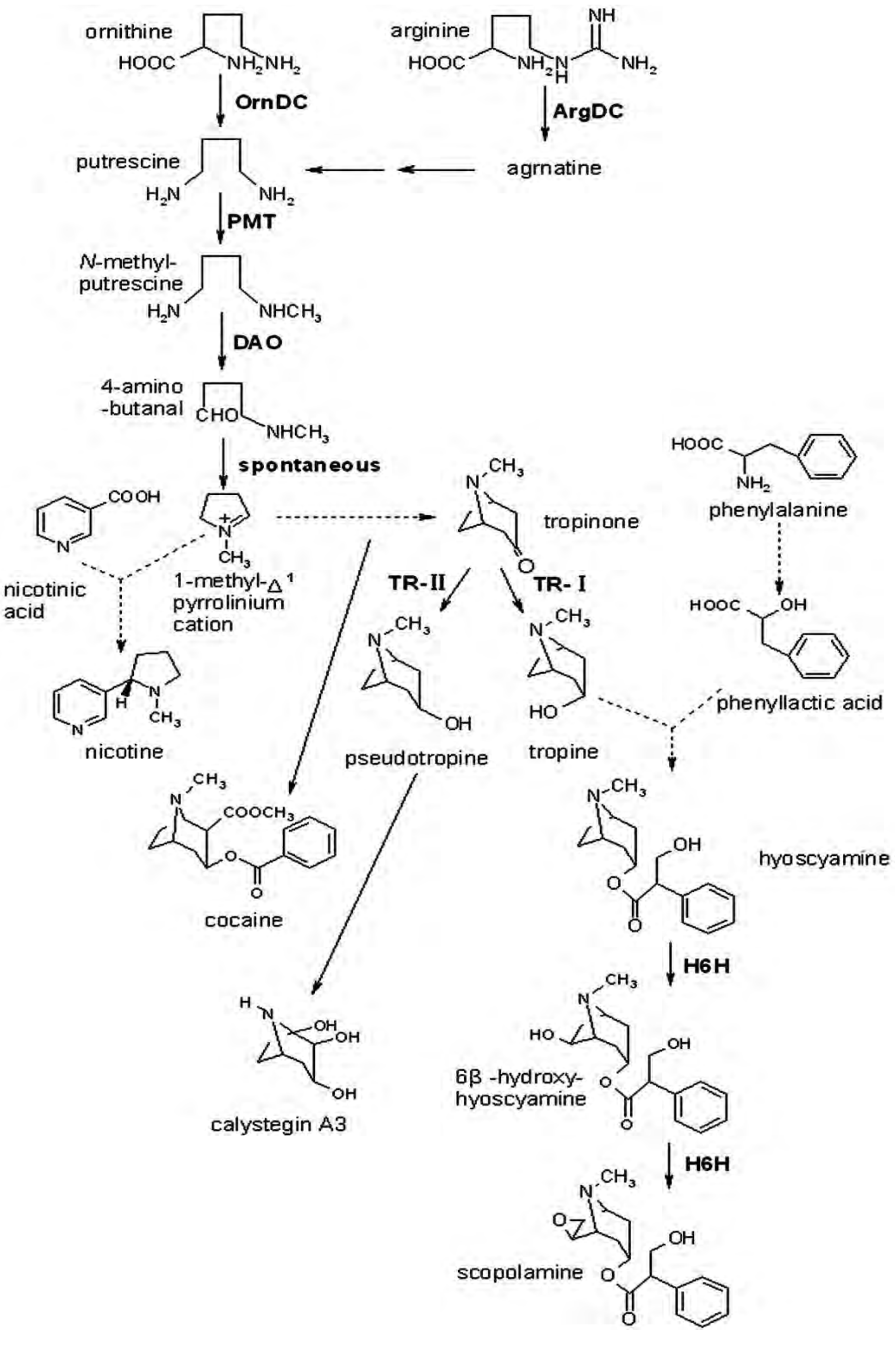
II-6- التخليق الحيوي للقلويدات

تعتبر الجذور هي المقر الأساسي لتخليق القلويدات، هذه الأخيرة تتواجد بالعصير الخلوي ثم تنتقل من مكان تخليقها إلى بقية أجزاء النبات مما يؤدي إلى وجود اختلاف من حيث المحتوى القلويدي حسب العضو و حسب اختلاف أطوار النمو كما هو موضح في الجدول 03.

جدول -03- كمية القلويدات الكلية في الأعضاء المختلفة لنبات السكران خلال مرحلتي الإزهار و الإثمار (الشحات، 1986)

	مرحلة الإزهار		مرحلة الإثمار	
أعضاء النبات	**% للقلويدات**	**القلويدات(غ/نبات)**	**% للقلويدات**	**القلويدات(غ/نبات)**
الأزهار	0.76	0.05	0.52	———
الأوراق	0.65	0.24	0.42	0.08
السوق	0.27	0.06	0.22	0.05
الجذور	0.30	———	0.30	———

تعتبر الأحماض الأمنية طلائع القلويدات التروبانية (Rocha et al., 2002; Ute et al., 2009)، حيث أنها تنشأ من الحمض الاميني الاورنثين ،الهيستدين، الارجنين ، التيروسين و الليسين (De luca and Pierre, 2000 ; Hashimoto et al., 1986) كما هو مبين في مخطط الشكل02.



شكل -02- التخليق الحيوي للقلويدات التروبانية (Lei et al., 2007)

II-7- تصنيف القلويدات

قسمت القلويدات على أساس الحلقة غير المتجانسة الداخلة في تكوين القلويد (Sandrine, 2004; Bruneton, 1999) إلى:

1- القلويدات الأمنية: مثل الافدرين Ephedrine من نبات Ephedra.

2- القلويدات المشتقة من نواة البيريدين والبيبردين: مثل Nicotine من نبات الدخان.

3- القلويدات المشتقة من نواة التروبان: مثل الأتروبين والهيوسين في نبات السكران.

4- القلويدات المشتقة من نواة الكينولين: مثل الكينين Quinine من نبات الكينا Quina.

5- القلويدات المشتقة من نواة الايزوكينولين: مثل Papaverine من نبات الخشخاش.

6- القلويدات المشتقة من نواة الأندول: منها قلويد الستر كنين Strychnine من نبات الجوز.

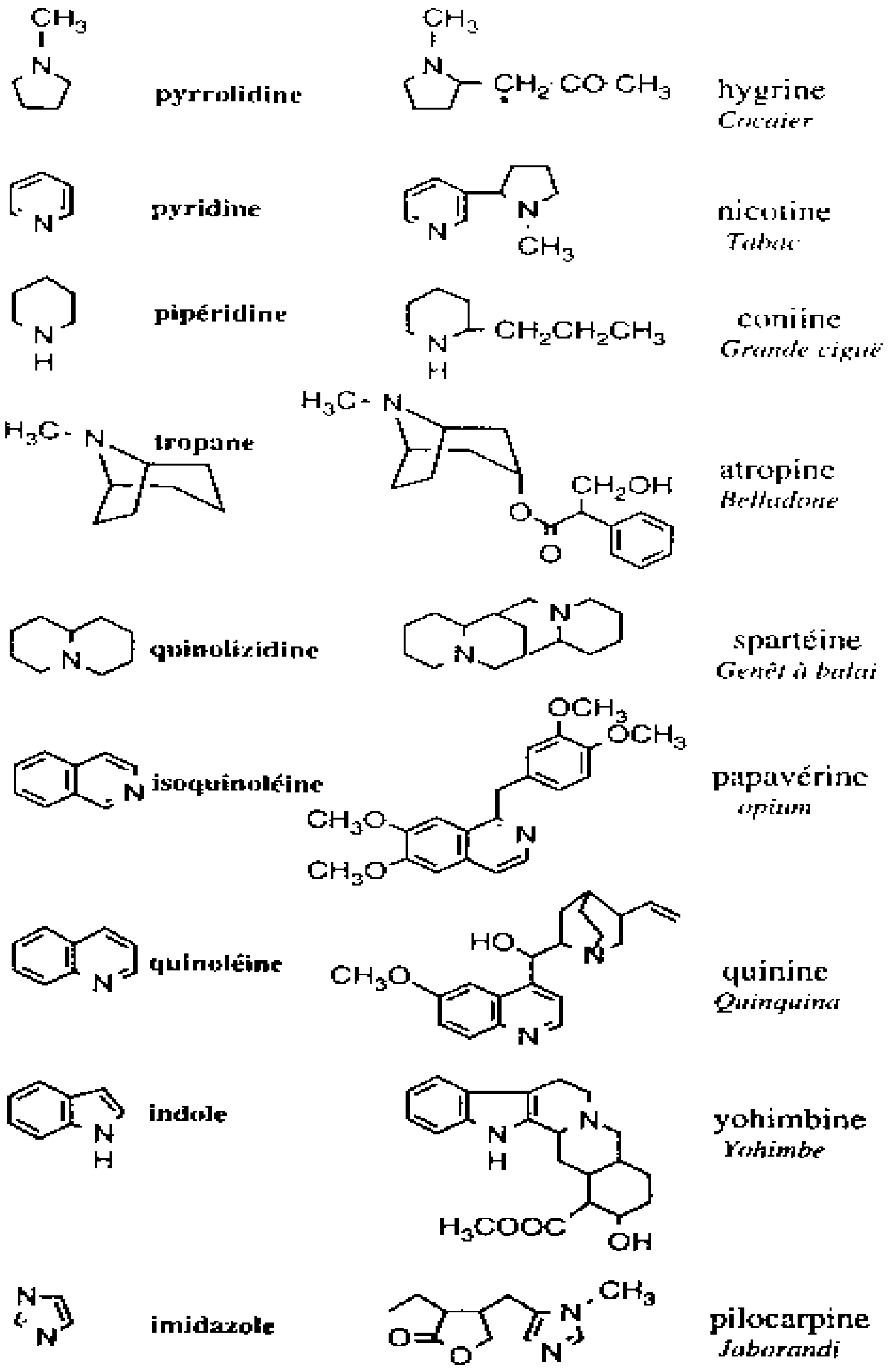
7- القلويدات المشتقة من نواة الفينانثرين: مثل المورفين Morphine من نبات الأفيون.

8- القلويدات المشتقة من نواة البيورين: مثل: الكافيين Caféine من بذور البن والشاي.

9- القلويدات المشتقة من نواة التروبولون: مثل الكولشسين Colchicine في نبات اللحلاح.

10- القلويدات المشتقة من نواة الاسترولية: مثل Solanine من نبات السولانم.

و الجدول 04 يلخص التقسيم كما يلي:



جدول -04- تصنيف القلويدات على أساس الحلقة غير المتجانسة (Guignard, 2000)

II-8- طرق تقدير القلويدات

تقدر القلويدات حسب .Fouché et al (2001) و .Taha et al (2002) بعدة طرق أهمها:

1 - طريقة الوزن: تستعمل من أجل كميات هامة وكبيرة من القلويدات.

2- الطريقة الحجمية: يمكن معايرة القلويدات بأحماض معلومة العيارية مثل: HCl، H_2SO_4.

3- الطريقة اللونية: تعطي القلويدات تفاعلات لونية يمكن تقديرها بجهاز القياس اللوني Spectrophotomètre.

4- طرق أخرى: منها مساحة البقع على رقائق السليكاجل (.C.C.M)، الكروماتوغرافيا الغازية (.C.P.G) والكروماتوغرافيا السائلة (.C.L).

II-9- طرق الكشف عن القلويدات

يتم الكشف عن القلويدات عن طريق عمليات الترسيب و التلوين (Manske and Holmes, 1950; Balbaa et al., 1976)، باستعمال المحاليل التي أهمها:

* **محلول ماير** : يعطي راسب ابيض مصفر مع القلويدات

* **محلول دراجندورف:** الأكثر استعمالا، يعطي اللون البرتقالي مع القلويدات

* **محلول بوخاردت:** يقوم بهلجنة القلويدات

* **محلول ماندلين** : يعطي راسب بنفسجي مع القلويدات

* **محلول اردمان:** يعطي اللون الأزرق المخضر مع القلويدات

II-10- طرق استخلاص القلويدات

يعتمد استخلاص القلويدات على طبيعتها (Paris and Moyse, 1971)، و هناك 03 طرق عامة لاستخلاصها:

1- الاستخلاص بالمذيبات العضوية اللاقطبية: يتم تحرير القلويدات بشكلها القاعدي باستعمال مسحوق نباتي جاف معالج بقاعدة ضعيفة مثل: النشادر NH_3 ثم تنقى القلويدات بمذيب عضوي لا قطبي مثل: $CHCl_3$، CH_2Cl_2، ... في جهاز الصوكسلي (Soxhlet) مع أخذ بعين الاعتبار درجة الحرارة التي لا تؤثر على تحطيم القلويدات.

2- الاستخلاص بالمذيبات العضوية القطبية: يعالج مسحوق النبات الجاف بالكحول ثم يجفف المستخلص والراسب يذاب في محلول حمضي ثم يستخلص المحلول الحمضي بمذيب عضوي غير قطبي.

3- الاستخلاص بالمحاليل الحمضية الممددة: يعالج مسحوق النبات الجاف بالمحاليل الحمضية حتى النفاذ فنحصل على قلويدات ملحية، ثم يحول المحلول الحمضي إلى محلول قاعدي بإضافة قاعدة مثل: NH_3 وبعده تستخلص القلويدات بمذيب عضوي لا قطبي مثل: $CHCl_3$، CH_2Cl_2، ....

II-11- فصل و تعريف القلويدات

يتم فصل القلويدات بالطرق المطيافية و الكروماتوغرافية المختلفة و المتمثلة في : S.M., U.V., C.C.M., .H.P.L.C., C.P.G., R.M.N., I.R. (Pelletier, 1983; Ceyhan et al., 2001).

فقد استعمل Paris et Moyse (1971) طرق الـــC.C.M. لدراسة القلويدات التروبانية لنوعين من السكران هما *H. aureus* L. و *H. muticus* L. ، و تعتبر كروماتوغرافيا الطور الغازي الأسرع لتحليل و معرفة قلويدات السكران (Majlat, 1982; Ionkova et al., 1994)، كما استعملت طريقة الـــH.P.L.C. وS.M. لمعرفة محتويات نبات *H. aureus* L. من الهيوسيامين و السكوبولامين من طرف كل منً Zayed (2001) وElisabet et al. (2007).

II-12- قلويدات التروبان

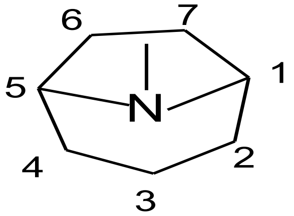
II-12-1- تعريف قلويدات التروبان

يمكن تعريف القلويدات التروبانية على أنها أسترات للكحول الآميني التروبين (Tropine) أو أحد مشتقاته كالسكوبولامين...الخ، مع حمض التروبيك (acide tropique) أو مع أحماض عضوية مثل حمض التجليك (acide tyglique) (Hibi et al., 1992)، كما تعرف على أنها من نواتج عدة عمليات تعرف بالأيض الثانوي(Mann, 1978; Rathbone and Bruce, 2002).

استخلص أكثر من 20 نوع قلويدي طبيعي من العائلة الباذنجانية التي تعد أغنى النباتات بالقلويدات التروبانية الأهم من الناحية الفارماكولوجية (Luckner, 1990)، وأهم نباتاتها: الداتورة، البلادونا والسكران (Lanoue et al., 2002)، ولكن بكميات ضئيلة إذ قدرت النسبة المئوية لقلويدات نبات *السكران الأبيض* لينيه بـــين: 0.70% إلى 1.50% من الوزن الجاف (Gaillard et al., 2001).

تتميز القلويدات التروبانية بوجود حلقة التروبان (Mann, 1987) المبينة في الشكل-03- وهي حلقة ثمانية غير متجانسة $C_8H_{15}N$ و الناتجة عن اندماج البيريدين والبيروليدين في الموضعين 1و5 بمجموعة N- مثيل (Leete, 1990) واسمها الكيميائي حسب Majewski and Lazny (1995)

8-Methyl-8-ozabicyclo(3-2-1) octane.

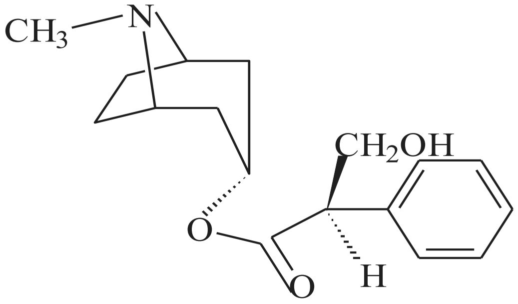


شكل- 03- حلقة التروبان

II-12-2-الهيوسيامين Hyoscyamine

الهيوسامين هو استر لكحول التروبين وحمض التروبيك، صيغته العامة $C_{17}H_{23}O_3N$ و كتلة المولية 289.38 غ/مول (Dräger, 2006)، تم عزله أو استخلاصه مباشرة من النباتات فيعرف بالأتروبين (±)-Atropine (Mateus et al., 2000).

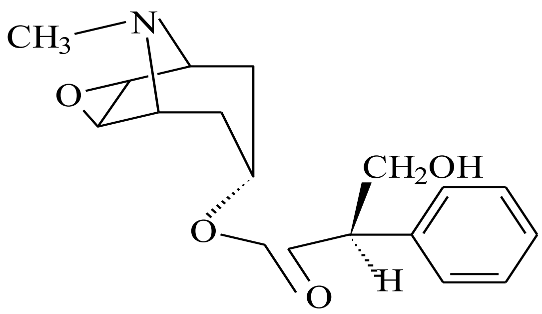
يوجد على شكل اينونتيوميرين D-Hyscyamine وL-Hyoscyamine (شكل04) (Matsuda et al., 1998)، و هو مركب فعال ضوئيا ينتج طبيعيا في النباتات على شكل Hyoscyamine -(-) الذي يعتبر أكثر فعالية من نظيره Hyoscyamine -(+) و لكنه سرعان ما يتحول إلى مركب غير فعال ضوئيا (راسيمي).



شكل-04- صيغة الهيوسيامين

II-12-3- السكوبولامين Scopolamine

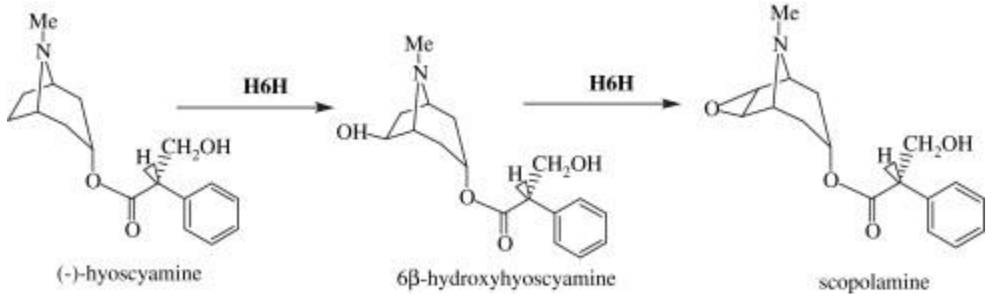
يمكن القول أن السكوبولامين هو عبارة عن مركب الهيوسيامين مضاف إليه رابطة إيبوكسيدية بين ذرتي الكربون C_7-C_6 (شكل 05) (Hashimoto et al., 1986)، كما يعرف على أنه استر للكحول الآميني السكوبين وحمض التروبيك، وهو مركب فعال ضوئيا، صيغته المجملة $C_{17}H_{21}NO_4$ وكتلته المولية 303.06 غ/مول (Leete,1990).



شكل-05- صيغة السكوبولامين

II-12-4- تحول الهيوسيامين إلى سكوبولامين

يتحكم في تحول الهيوسيامين إلى سكوبولامين أنزيم Hyosyamine-6β-Hydroxylase (H6H) الذي يزيد نشاطه بتنشيط الجين المسؤول عن إنتاجه، فيحوله من (-)-hyoscyamine إلى 6β-Hydroxyscopolamine ثم إلى scopolamine حسب الشكل 06 (Elisabet et al., 2003; Lin et al., 2003).



شكل-06- التحول الحيوي للسكوبولامين انطلاقا من الهيوسيامين (Cardillo et al., 2008)

III- الهرمونات النباتية

III-1- تعريف الهرمونات النباتية

هي مركبات عضوية متباينة التركيب الكيميائي، مختلف الفعالية خاصة على الظواهر الفسيولوجية وتنظيماتها البيوكيميائية منها داخليا، و المورفولوجية خارجيا (Hopkins, 2003)، فمنها المنشطة activateurs مثل: الأوكسينات، السيتوكنيبات، الجبريليات، الأثيلين وأخرى مثبطة inhibiteurs مثل حامض الأبسيسيك و الفينولات (Robert et Rolland, 1999).

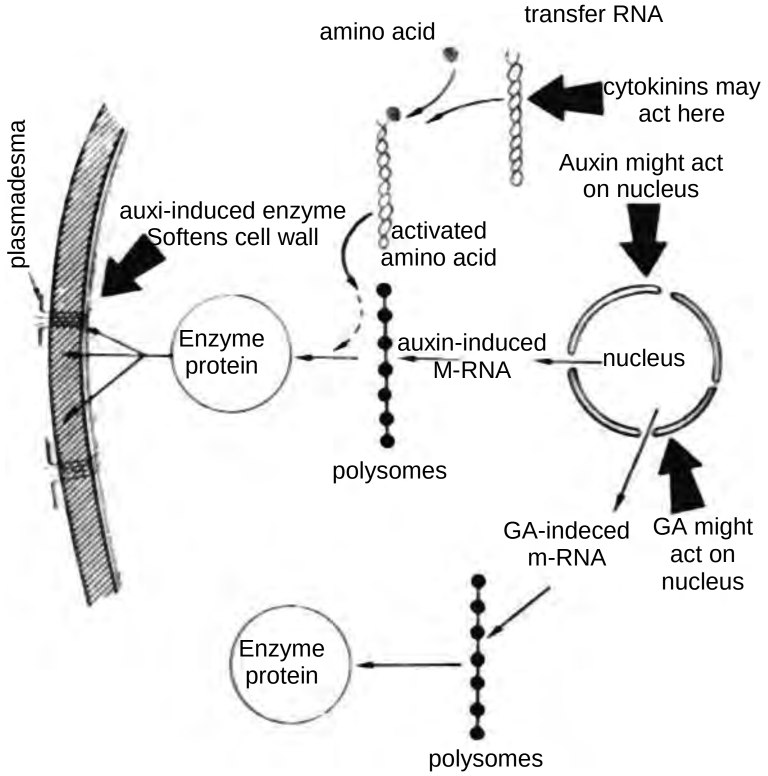
قسمت الهرمونات من حيث الأهمية إلى 05 أقسام هي: الاوكسينات، السيتوكينينات، الجبريلينات، حمض الابسيسيك و الاثيلين بالإضافة إلى هرمونات أخرى اقل أهمية مثل: حمض الجسمين و حمض الساليسيليك (Robert et Rolland, 1999)، كما يختلف مكان تخليق الهرمونات داخل النبات و مكان تأثيرها بتفاعلات معقدة أو متكاملة.

III-2- عمل الهرمونات النباتية في الخلية

تتمثل آلية عمل الهرمونات النباتية الخارجية على مستوى الخلية فيما يلي:

يقوم الاوكسين عند وصوله إلى الخلية بتحرير مادة من الغشاء البلازمي، هذه الأخيرة تنتقل إلى النواة، تؤثر عليها فتنتج نوعا جديدا من الحمض النووي الريبي الرسول ARNm الذي يشكل شفرة خاصة لبناء بروتين معين يحفز بدوره ARN polymérase الذي يساهم في تركيب ARNt الريبوزومي الناقل، ينتج عن كل ذلك بناء شبكة ريبوزيمية تنشط تكوين أنزيمات ارتخاء الجدار الخلوي محفزة بذلك نمو الخلية(حسين و آخرون، 2006)، و زيادة عامة في النشاطات الاستقلابية وبناء أنزيمات أخرى خاصة بالتخليق الحيوي للقلويدات مثل الأنزيمات المختزلة للنترات (روبرت و فرانسيس، 1993) كما هو واضح في الشكل07.

كما أن السيتوكينينات تكون معقدات للحمضين النوويين ARNm و ARNt الذي ينقل الأحماض الأمنية و يحفز ارتباطها مكونا بروتينات و أنزيمات لازمة لإنتاج المواد الاستقلابية مثل: القلويدات (Scalla, 1991)



شكل-07- آلية عمل الهرمونات النباتية في نمو الخلية (بلاك و إيدلمان، 1980)

تعتبر الهرمونات النباتية من المواد الهامة و اللازمة في الزراعة الخلوية، و لا يمكن الاستغناء عنها لنجاح الزراعة في تكوين و تكشف الكالوس، الذي لا يتم إلا في وجود كل من الاوكسينات و السيتوكينينات، فقد وجدا Sauerwein and Shinomura (1992) أن النسبة 1:1 للسيتوكينينات و الاوكسينات المضافة لوسط الزرع الخلوي لنبات *السكران الأبيض* لينيه تؤثر على تكوين و تراكم القلويدات و لضمان هذا التكامل لابد من أن يكون توازن بين الاوكسينات و السيتوكينينات، كما وجد .Koul et al (1983) أن سرعة إنتاج القلويدات في زراعة نسيج نبات .*H. muticus* L يعتمد على المستوى الهرموني المستعمل، أما El-Bahr et al. (1997) فوجد أن اكبر تراكم للقلويدات في كالوس نبات .*H. muticus* L يكون عند 1ملغ/ل من K و2,4-D معا.

III-3- الاوكسينات Les auxines

III-3-1 – تعريف الاوكسينات

يطلق لفظ أوكسين Auxine اليوناني الأصل على مواد عضوية والتي بتراكيز منخفضة تحفز النمو الطولي عند إضافتها المجموع الخضري، بالتالي تؤدي إلى استطالة البراعم والسيقان للنبات (Nultsch,1998).

تتميز الأوكسينات بأنها صلبة، قابلة للذوبان في الماء والكحول، ليست لها رائحة، بيضاء اللون، مائلة للاصفرار (Prat, 1994).

الأوكسين متماثل كيميائيا مع الحمض الآميني التريبتوفان الذي يعتبر طليعة التخليق الحيوي للأكسين الذي تم عزل المئات من أنواعه مثل فينايل حمض الخل Phényle acetic acid (PAA) وأندول 3 حامض الخليك indole-3-acetic acid (IAA)، و فينوكسي حمض الخليك (PAA) Phenoxy acetic acid و مشتقاتها مثل 4,2- ثنائي كلوروفينوكسي حمض الخليك (2,4-D acetic acid 2,4 –Dichlorophenoxy (Heller, 1985).

و يتمركز تكون الأوكسينات في القمم الطرفية للبادرات و النباتات (Dolan, 2006)، إذ تتواجد على شكل 3 حالات فمنها الحرة، المرتبطة أو المقيدة و المستخلصة بالمذيبات العضوية (مرسي و ع ب د الجواد، 1972).

III-3-2 – بعض التأثيرات المعروفة لفعل الأوكسينات

تؤدي الأوكسينات إلى:

1- زيادة النمو الطولي عن طريق تحفيز الاستطالة الخلوية (Davies, 1990).

2- السيادة القيمية، حيث أن البراعم الجانبية أكثر حساسية للأوكسينات عن البرعم النهائي (Heller et al., 2000).

3- ارتفاع معدل الاستطالة و الانقسام الخلوي في الجذور لأن الأوكسينات الطبيعية تنتج أساسا في الخلايا المرسيمية للقمم الطرفية (Luttge et al., 1997)، وانتقالها قطبي، من القمة المورفولوجية إلى القاعدة المورفولوجية (Vilain, 1987).

4- تكوين الثمار اللابذرية (Heller, 1985).

5- العمل على رفع عدد الأزهار المؤنثة (Robert et Rolland, 1999).

6- تنشيط عملية التنفس (Hopkins, 1995).

7- الرفع من تراكم نواتج الأيض الثانوي مثل القلويدات (Lin et al., 2003).

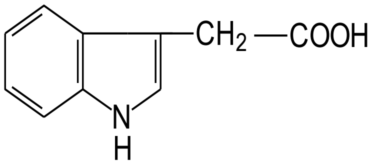
III-3-3- تأثير الأكسينات على نواتج الميتابوليزم الثانوي في الزراعة المخبرية La culture *in vitro*

تساهم الاوكسينات في تراكم المواد الفعالة التي هي من نواتج الميتابوليزم الثانوي في النباتات الطبية عند إضافتها إلى أوساط الزرع ، إضافة إلى ظهور التحورات المورفولوجية، التي تستلزم وجود الاوكسينات، إذ لابد من وجود الاوكسين في بيئة زرع الكالوس و ظهور مختلف تحوراته و تحوله إلى نبات كامل (Dodds and Roberts, 1995) كما أن إضافة مستوى عالي من الاوكسينات IAA وNAA يرفع إنتاج القلويدات التروبانية في الزراعة المخبرية لنبات السكران المصري حسب ما وجده .Ibrahim et al (2009)، كما أنهما يرفعان من تراكم مركب artemisinique في جذور نبات *Artiminin annua* (Bunk, 1997)، ويزيد من تراكم المواد الفعالة في جذور نبات *Targetes Patula* بزيادة مستوى الاوكسين (Arroo et al., 1995)، أما الزيادة في تركيز الاوكسين يحفز نمو الجذور في وسط الزرع و يثبط التخليق الحيوي لقلويدات .*H .niger* L، *Atropa*، *Datura* و *Duboisia* (Hashimoto et al., 1991; Bonhomme and Fliniaux, 2000).

III-3-4- أندول حامض الخليك (IAA) Indole 3- acetic acid

يعد أول مركب عضوي، اكتشف طبيعيا في النبات سنة 1926 من طرف العالم فريت ونت Frits Went (Nultsch, 1998).

وهو عبارة عن مركب عضوي ذو الصيغة العامة $C_{10}H_9NO_2$ وكتلته المولية 175غ/مول، درجة الذوبان تتراوح ما بين 168- 170°م، و الأوكسين مركب متماثل كيميائيا مع الحمض الأميني التربتوفان هذا الأخير يمثل البنية الأولية للتخليق الحيوي له (شكل08)(Dolan, 2006).

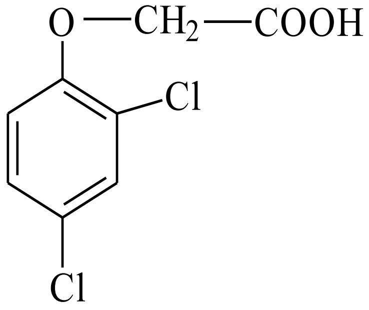


شكل - 8- الصيغة الجزئية للـــ IAA

III-3-5-2،4- ثنائي كلوروفينوكسي حمض الخليك(2,4-D) 2,4-Dichloraphnoxy acetic acid

يعتبر 2,4-D من الأوكسينات الصناعية، ويستعمل كمبيد عشبي، كتلته المولية 221غ/ مول، وتعود فعاليته لوجود نواة بنزينية إضافة إلى المجموعة الحمضية في السلسلة الجانبية، و اللتان تعود فعاليته ما إلى

ذرات الكاربون المتواجدة بهما ، صيغته العامة : $C_8H_6O_3Cl_2$ (Mazliak, 1997) (شكل 09)، و يعتبر التريبتوفان طليعة التخليق الحيوي للاوكسين (Dolan, 2006).



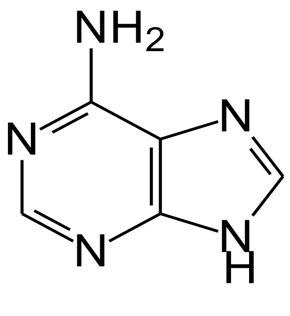
شكل – 9 – الصيغة الجزيئية للــ 2,4-D

III-4- السيتوكينينات les cytokinines

III-4-1- تعريف السيتوكينينات

تعرف السيتوكينينات على أنها مركبات مشجعة و أساسية للانقسام الخلوي (Miller et al., 1956; Werner et al., 2001)، إذ تتواجد إما حرة مثل: الكينتين، أو على هيئة مركبات لناقلات ARNالخاصة بالأحماض الآمينية، أو تكون مرتبطة غير فعالة حيويا مثل: مركب ميثايل ثيو ايزوبنتنايل الأدنين Methyl thiosopentenyl adenine (Luttge et al., 1994; Mann, 1996).

تعتمد حركة السيتوكينينات على وجود الأوكسينات، إذ تتواجد بوفرة في الجذور و الأوراق الحديثة والثمار النامية (Tayeb, 1994) كما تعتبر مشتقات للإيزوينتينايل أدنين Isopentenyl adenin حيث أن البنية الأساسية لجميع الستوكينيات هي حلقة الأدنين (شكل10) التي تزيد من فعاليتها بزيادة الروابط الزوجية في السلسلة الجانبية المحتوية عليها (الشحات، 2000).



شكل – 10- حلقة الأدنين

III-4-2- أهم التأثيرات المعروفة لفعل السيتوكينينات

تعمل السيتوكينينات على:

1/ كسر كمون البذور و الدرنات (برناردس ودونالد، 1966).

2/ منع وتقليل السيادة القمية و زيادة البراعم الجانبية (Robert et Catesson, 1990).

3/ زيادة حجم الخلايا ولها تأثير مثبط للنمو الطولي (Hopkins, 1995).

4/ تحويل الأزهار المذكرة إلى أزهار خنثى عن طريق تنشيط المبيض (Kaminek et al., 1992).

5/ منع تساقط الأزهار والثمار الصغيرة (مرسي وعبد الجواد، 1975).

6/ تكوين الثمار اللابذرية (Mazliak, 1997).

7/ تراكم حبيبات النشاط و المواد البروتينتية و الأحماض النووية (Gausesen et al., 1982).

8/ تراكم المواد الفعالة في النباتات عند رش النباتات بها (الشحات، 2000).

III-4-3- تأثير السيتوكنينات على نواتج الميتابوليزم الثانوي في الزراعة المخبرية *in vitro*

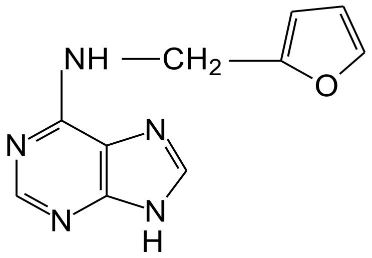
للسيتوكنينات تأثيرات منها ما هو مورفولوجي، ومنها ما هو فيسيولوجي ومتعلق بمركبات الأيض الثانوي، فإضافة السيتوكنين إلى وسط الزراعة الخلوية لنبات *Catharanthus roseus* يؤدي إلى ارتفاع نسبة القلويدات (Zhao et al., 2000)، و إضافة BAP إلى وسط زرع جذور نبات *Artiminin annua* يؤدي إلى تراكم مركب Artemisinique (Bunk, 1997)، أما مركب الكينيتين عند إضافته إلى نبات *H. muticus* يؤدي إلى تراكم القلويدات به و الجدول 05 يوضح أهم تأثيرات السيتوكنينات القلويدات في الزراعة الخلوية.

جدول -05- تأثير السيتوكنينات على القلويدات في الزراعة المخبرية *in vitro*

ٌّ زاخع	اٌرؤثٍش	ٍٛع اٌضساعح	إٌٍثاخ(اٌعائٍح)	ٍٍٛع الا٘ض اٌثاٍٛي
				Polyhénols
Yamada et kuboi (1976)	اٌٍؤ ٍٛظ الاٌغٍٕخ	suspensions	*Nicotiana tabacum* (Solanacées)	Lignine
Ibrahim et Edgar (1976)	اٌٍؤ ٌشاٚ الإٔراج	suspensions	*Perilla ocymoides* (Lamiacées)	Phénols
Shah et al. (1976)	اٌٍؤ ٌشاٚ الإٔراج	suspensions	*Cassia fistula* (Légumineuses)	**Polyphénols**
				Quinones
Zank et al. (1975)	ٌٍؤ ٌثؾظ اٌ ٍٛ ٔرزاج anthraquinones -اٌ	suspensions	*Morinda citrifolia* (Rubiacées)	Anthraquinones
Fujita et al. (1981)	اٌٍؤ ٌثؾظ ٔرزاج shukonine-اٌ	suspensions	*Lithospermum Erythorhizon* (Boraginacées)	Naphtoquinones
				Alcaloïdes
Nakagawa et al. (1984)	ٌٍؤ ٌخفض اٌٍ ٍشفع berbérine-اٌ ٌشوٍض	suspensions	*Thalictrum minus* (Renonculacées)	Isoquinoléiques
Kamimura et al . (1976)	ٌٍؤ ٌخفض اٌٍ ٍشفع ٌرخ٘ن jatrorrhizine-اٌ ٌمض ٌت berbérine-اٌ	cals	*Coptis japonica* (Renonculacées)	
Hodges et Raport (1982)	ٌٍؤ ٌع ٌرؤ codeine ٌخفض اٌ ثاٌزٔرج thébaine-اٌ	suspensions	*Papaver acteatum* (Papavéracées)	Morphiniques
Shiio et Ohta (1973)	اٌٍؤ ٌشف عٍ اٌ ٌح ٌزٌ morphine، codéine، thébaine-اٌ	cals	*Papaver somniferum* (Papavéracées)	
Ikuta et la. (1989)	ٌٍؤ ٌثؾظ ٌرخ٘ن اٌ nicotine-	cals	*Nicotiana tabacum* (Solanacées)	
Kodja et al. (1989)	ٌٍؤ ٌشا ٚ اٌ ajmalicine- ٚ اٌ serpentine-	suspensions	*Catharanthus roseus* (Apocynacées)	Indolique
Loyola-Vargas et al. (1992)	اٌ BAP -ٌشا ٚ فٍ ٚخٌٍ ٌضٍء serpentine-اٌ	Tissus normaux Et tumoraux		
Miguel and Barroso (1994)	اٌٍؤ ٌخفض ٌشاٚ اٌٍ ٍذا د اٌشٍثٍٛذخ ٚ اٌ ٍغٍٛ ٍٍثخ	cals	*H. albus* L. (Solanacées)	**Tropane**

III-4-4- الكنيتين Kinetine (K)

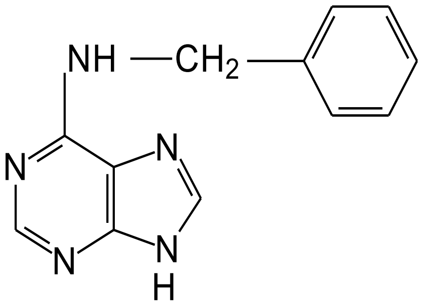
يعد الكنيتين أول السيتوكنينات الصناعية المكتشفة والمحصل عليها من إماهة ADN ذات المصدر الحيواني (Sperm Harenig)، اسمه العلمي 6-Furfuryl amino purine، وزنه الجزئي 215.2 غ/مول (Nultsch, 1998) وتعود فعاليته لوجود نواة البيورين تحمل زمرة آمنيه للموضع السادس (شكل 11) صيغته العامة $C_{10}H_9ON_5$.



شكل-11- الصيغة الجزئية للــK

III-4-5 بنزيل أمينو بيورين Benzyl amino purine (BAP)

الــ BAP هو أيضا من السيتوكنينات الصناعية اسمه العلمي 6-Benzyl amino purine، وزنه الجزئي 253 غ /مول، صيغته العامة $C_{12}H_{11}N_5$ (Heller et al., 2000) (شكل12)



شكل-12- الصيغة الجزئية للــ BAP

III-5- تأثير التداخل بين الهرمونات على تراكم نواتج الميتابوليزم الثانوي (القلويدات) في جنس السكران

إضافة إلى التأثيرات المورفولوجية لكل من الاوكسينات و السيتوكنينات منفردة و متداخلة، تكمن العلاقة بينهما في أن الاوكسينات تنشط الجينات المسئولة على إنتاج البروتينات و السيتوكنينات تنشط الانقسام الخلوي و زيادة إنتاج الــ ADN و ARN ما ينعكس على إنتاج أنزيمات مثل أنزيم (N-Methyle Putrescine Transférase) PMT المسؤول عن إنتاج القلويدات التروبانية في جنس السكران(Elizabet and Sarah., 2009) و الأنزيمات المختزلة للنترات و أنزيم (Hyoscyamine 6β-hydroxylase) H6H المسؤول عن تحويل قلويد الهيوسيامين إلى سكوبولامين.

كما أن الجمع بين الهرمونات النباتية سواء كانت من نفس النوع أو من نوعين مختلفين تختلف نتائجه حسب نوع النبات و التراكيز المستعملة في تطبيقاتها الزراعية و المخبرية، و تبعا للاختيار الأمثل لنسبة الاوكسين على السيتوكنين يكون التأثير إما بالزيادة أو بالنقصان فقد وجدا Sauerwein et Shinomura (1992) انه توجد علاقة بين الهرمونات الخارجية المضافة إلى وسط الزرع *in vitro*

لنبات السكران الأبيض و تكوين الكالوس في وجود كل من الاوكسين و السيتوكنين معا لان لهما دورا تكامليا و كل هرمون يكمل عمل الهرمون الآخر فالأول ينشط استطالة الخلايا و نموها و الثاني يضمن النمو العرضي للنبات إضافة إلى دوره ما الفعال في تراكم مركبات الميتابوليزم الثانوي التي تنتج في نبات السكران(Oxenberg, 1995).

فقد أشار Grewal et al. (1979) إلى أن إضافة الكينتين متداخلا مع الـIAA و NAA بتركيز 10^{-5}M/L تنتج القلويدات في الزراعة المخبرية لنبات *H. muticus* ابتداء من الأسبوع الرابع، الخامس و السادس كما أن تمايز الكالوس و القدرة على إنتاج القلويدات يكون حسب المستوى الهرموني المستعمل.

و أضاف El-Bahr et al. (1997) أن استعمال 1 ملغ/ل لكل من الــ2,4-D و الــK في زراعة كالوس نبات *H. muticus* تعطي أعلى إنتاج للقلويدات، كما أكد Trease and Evan (1996) أن جنس السكران يعطي تراكم معتبر للقلويدات عند معاملته بالكينتين.

و في تطبيقات أخرى للهرمونات النباتية متداخلة فقد ذكر الشحات (2000) أن رش النباتات الطبية بالكينتين منفردا أو متداخلا مع الاوكسين أو الجبريلين يؤدي إلى زيادة النمو الخضري، و أن السيتوكنين مع 2,4-D يعملان على رفع نسبة المواد الفعالة بالنبات لأنه حسب Cary et al. (1995) فهما يراكمان الايثيلين و يحفزان تخليقه، حيث أن الاوكسين يزيد من معدله بحوالي من 8 إلى 10 مرات عند إضافته رشا على الأوراق و هذا الأخير أي الايثيلين يراكم القلويدات حسب Kim et al. (2002) كما انه ثبت دوره في تراكم نواتج الميتابوليزم الثانوي في الزراعة الخلوية من طرف Deikman and Hammer (1995).

IV- الزراعـــة المخبرية La culture *in vitro*

IV-1- نبـــذة تاريخيـــة

أول من تنبه إلى أن الأجزاء النباتية لها القدرة على التكاثر وتكوين نبات كامل هو العالم Haberlandt سنة 1902 والتي عرفت "بالقدرة الذاتية" التي اعتمد عليها علم زراعة الأنسجة النباتية، وكانت أول تجاربه لم تكلل بالنجاح ولم يفسر في ذلك الوقت سبب فشله على نحو محدد، حيث وجد فيما بعد أن البيئة الغذائية التي استعملها لم تكن تحتوي على الهرمونات و التي لم تكن تعرف في ذلك الوقت ولم يكن معروفا دورها الأساسي في تنشيط الخلايا و كذلك تمايزها وتخليقها أي كل ظواهر التكشف الم ورفولوجي، وقد مارس الفسيولوجيون فكرة زراعة الأنسجة النباتية باعتبارها طريقة ذات قيمة كبيرة في دراسة بعض الظواهر الخاصة بالنمو، وأهم هذه الدراسات تمكن العالم White سنة 1934 من تركيب واستنباط بيئة و إنماء جذور الطماطم عليها .

ثم اكتشف بعد ذلك أول الهرمونات النباتية وهو الفيتو أوكسين من طرف العالمين Simth and و Erxleben سنة 1934 و قد أضافه العالم Guattari سنة 1939 إلى البيئة الغذائية وتمكن من إنتاج الكالوس Callus لأول مرة من زراعة نخاع الجذور ، و في نفس العام تمكن من إنتاج الكالوس من نبات الدخان. و في عام 1959 أشار كل من Martin و Morel إلى إمكانية إنتاج نبات كامل من زراعة القمم النامية للنباتات للحصول على نباتات خالية من الفيروس ، ومن ذلك التاريخ توالت الأبحاث مثل ابحاث كل من Hamill et al. (1987) و Kim et al. (2003) و Kang et al. (2004) حتى أصبحت زراعة الخلايا و الأنسجة و الأعضاء أداة هامة مساعدة لبعض الأنشطة الاقتصادية التي تعود بعائد مجزي مع تسهيل العمل وانخفاض التكاليف (محمد، 2002).

IV-2- تعريف علم زراعة الأنسجة

يقصد بزراعة الأنسجة هو استخدام جزء من النبات قد يكون بذرة أو جزء من الجذر أو جزء من الساق أو جزء من الورقة أو المتك أو حبوب اللقاح على بيئة مغذية غالبا ما تحتوي على العناصر الكبرى و العناصر الصغرى و مصدر للسكريات و غالبا ما يستخدم السكروز كبيئة مغذية و أحيانا تضاف بعض منظمات النمو أو الهرمونات التي توجه النبات لتكوين نسيج الكالوس callus الذي هو عبارة عن مجموعة من الخلايا منتظمة أو غير منتظمة(Canel et al., 1998; Khanam et al., 2001).

IV-3- أهم المجالات الرئيسية لاستعمالات الزراعة النسيجية

توجد أربعة مجالات هامة و رئيسية الأنسجة هي:

1- إنتاج بعض المواد الكيميائية العلاجية والمواد الطبيعية (Kukreja et al., 1975)؛ و هو ما نختص به في هذا البحث.
2- التحسين الوراثي للمحاصيل (Kitamura et al., 1996).
3- الحصول على سلالات خالية من الأمراض (Hall, 1999).
4- استخدام زراعة الأنسجة كوسيلة سريعة للتكاثر و إنتاج غزير من النباتات (Kitamura et al., 1996).

إنتاج المواد الكيماوية والعلاجية الطبية والمواد الطبيعية

كما هو معروف فإن هناك العديد من النباتات التي تنتج مواد طبيعية تعتبر إحدى نواتج عمليات التمثيل الغذائي بها كما هو مبين في الجدول رقم 06، يقوم الإنسان باستخراجها واستعمالها في صناعات عديدة أهمها صناعة الدواء وإنتاج الزيوت العطرية ومكسبات النكهة والطعم (Yeoman and Macleod, 1977).

جدول-06- بعض أهم المواد الطبيعية المستخرجة من النباتات

المادة	اسم النبات المستخرج منه
1-**القلويدات**	
-الأتروبين	*Atropa belladonna*
-أفيدرين	*Ephédra vulgarise*
-لينين	*Cinchono spp.*
- الكوكايين	*Erythraxylon coca*
-الهيوسيامين	*Hyoscyamus spp.*
2- **الجلوكوسيدات**	
- الساليسين	الصفصاف
- الاميجدالين	نوى الخوخ، المشمش والبرقوق
3- **الزيوت العطرية**	نباتات عديدة مثل الريحان و النعناع
4- **الفيتامينات**	نباتات عديدة

ولقد أمكن استخدام زراعة الأنسجة لبعض النباتات الطبية مثل الداتورة و السكران لإنتاج المواد الطبية (Hilton and Rhodes, 1990; Elizabet and Sarah, 2009) و ذلك بزراعة أنسجة وأعضاء مختلفة من تلك النباتات، للحصول على الكالوس ثم يستخلص المادة الفعالة منه دون الحاجة لزراعة النبات بأكمله (Zayed et al., 2006; Kukreja et al., 1975)، وبذلك يمكن توفير مساحات الأراضي اللازمة لاستخراج هذه المواد من النبات الكامل كذلك من الناحية الإقتصادية، تكون أكثر نفعا بسبب نقص التكاليف و تذليل الصعوبات (El-Bahr et al., 1997) .

IV-4- شروط و مراحـــل الزراعـــة النسيجيـــة الناجحـــة

حسب Dodds and Roberts (1995) فان مراحل الزراعة الناجحة هي:

- المـــرحلة الأولى:

-البيئة الزراعية : مرحلة هامة جدا والغرض منها هو الحصول على مزرعة معقمة وذلك بتعقيم البيئة المستخدمة والأدوات المستعملة وكذلك الأنسجة المستعملة (أجزاء النبات المراد زراعتها كالقمم النامية للسيقان والجذور أو أجزاء من السيقان والجذور والأوراق أو نسيج الكالوس ...الخ) وأخيرا الزراعة في وجود حيز معقم .

- المرحلة الثـــانية :

- الزيـــادة : الهدف منها هو زيادة الأعضاء أو التراكيب التي تعطي في النهاية النبات الكامل، وتعتمد هذه المرحلة على زيادة إنتاج الأعضاء العرضية أو زيادة تكوين الأجنة أو زيادة تنشئة النموات الجانبية، وعندما يكون الكالوس خطوة وسطية يكون الهدف في تلك المرحلة هو زيادة نمو الكالوس ثم تخليق النموات العرضية الخضرية أو تكوين الأجنة الجسمية .

- المـــرحلة الثـــالثة:

- نقـــل النبات إلى التربة: يعتبر التكاثر عن طريق زراعة الأنسجة ناجحا إذا توج بنجاح نقل النبات الناتج في الأنبوبة المعقمة إلى التربة واستمرار نموه، إذ يجب أقلمة النبات قبل نقله للظروف الصعبة المحتمل تواجدها في التربة (مثل نقص الرطوبة والحرارة) والتي يجب استفاؤها قبل نقله للتربة.

- و تشمل احتياجات كل مرحلة احتياجات غذائية تتعلق بمكونات البيئة وطبيعتها واحتياجات البيئة (كتعويض الأنسجة لدرجة حرارة وشدة إضاءة معينة) كما أن حسن اختيار الجزء النباتي المراد زراعته يلعب دور في إنجاح الزراعة.

IV-5- بيئـــة زراعة الأنسجـــة

تختلف البيئة الملائمة لزراعة الأنسجة تبعا لاختلاف النسيج المستعمل وطور النمو لذلك نجد عدد من البيئات الغذائية المختلفة كما هو واضح في الجدول 07. وتتركب البيئة الغذائية من:

1- الأملاح الغير عضـــوية: وتشمل على العناصر الكبرى مثل: النتروجين، البوتاسيوم، الفسفور، المغنزيوم و الكبريت، أما العناصر الصغرى فتشمل : الحديد، المنغنيز، النيكل، الزنك، النحاس، البورو م والكوبالت .....الخ.

كما تحتوي البيئة على خليط الأملاح الذي يختلف تركيزه حسب احتياجات الأجزاء النباتية.

2- **السكريات:** تعتبر السكريات الأحادية أو الثنائية أو الثلاثية كمصادر للطاقة مثل: الجلوكوز، الفركتوز، المانوز، اللاكتوز ....

3- **الفيتـــامينات:** إحدى المكونات الهامة في بيئات زراعة الأنسجة ويستعمل فيتامين B1 و حمض النيكوتتين nicotinic acid و البيرودوكسين pyridoxine، والتي تعتبر مرافقات أنزيمية هامة إضافة إلى فيتامين البيوتين Biotin وغيرها.

4- **الأحماض الأمنيـــة والأميـــدات:** إضافتها للبيئة يكون مفيدا خاصة الأرجنتين، حمض الأسبارتيك، حمض الجلوتاميك و غيرها، و ترجع أهميتها في زيادة الكالوس و ليس في تكوين الأعضاء.

5- **المـــواد الطبيعية:** عادة لا تستعمل إلا في حالت فشل البيئات في إنماء النسيج مثل: مستخلص الخميرة والشعير، لبن جوز الهند، أند وسرييوم الذرة ......

6- **منظمات النمو:** تعتبر أهم مكونات البيئة ومن دونها قد لا تنج ح الزراعة. وتشمل على: الأوكسينات (IAA, NAA ,2,4-D...)، أما السيتوكنيات فتمثلت في (K,BAP,BA...)، وترجع أهميتها في قدرتهما على إحداث التخليق وتكشف الأعضاء المختلفة و أقوى الأكسينات المستخدمة تأثيرا على تخليق الأجنة وتكوين الكالوس هو2,4-D أما من ناحية السيتوكينينات فأكثرها تأثيرا هي BA, K، كما أن الجبر يلين له دور أيضا في نمو الأعضاء وتخليقها، فقد أشار (Gautheret,1969) أن الجبر يلين يمكن أن يكون بديل للضوء أو معرض للاحتياجات الضوئية في تنشيطها لتخليق الجذور في نبات الطرطوفة و عادة يستعمل في المرحلة الثالثة (مرحلة نقل النبات) للإسراع من عملية تكوين الأعضاء الم تكشفة قبل نقلها للتربة كما يستعمل لإعطاء نمو سريع من الأجنة الخضرية (Giri and Narasu, 2000; Wethrell, 1982).

جدول-07- أهم أنواع أوساط الزراعة المستعملة (Mantell et al., 1985)

Inorganic Constituents	Concentration mg/l	Concentration mg/l
	MS medium	**LS medium**
Ammonium nitrate	1650	1650
Potassium nitrate	1900	1900
Calcium nitrate	440	332.02
Magnesium Sulfate	370	180.54
Potassium dihydrogen phosphate	170	170
Sodium EDTA	36.7	36.7
Ferrous sulfate	27.81	27.81
Borac acid	6.200	6.20
Manganese sulfate	16.9	16.9
Zinic sulfate	8.600	8.60
Potassium iodide	0.830	0.83
Sodium molybdate	0.250	0.25
Copper sulfate	0.0250	0.025
Cobalt chloride	0.025	0.025
Sucrose	30g/l	30g/l
Edamin (optional)	1g/l	1g/l
Glycine	2	-
IAA	1-30	1-30
K	0.04-10	0.04-10
Agar	10g/l	10g/l
Myoinositol	100	100
Pyridoxine HCl	0.500	-
Nicotinic acid	0.500	-
Thiamine Hydrochloride	0.100	0.400

IV-6- الخطــوات الهامة لزراعـــة الأنسجـــة

حسب Barnum (1996) لنجاح الزراعة النسيجية لابد من إتباع الخطوات التالية:

1- تحضير البيئة

2- اختيار النبات الأم

3- اختيار الجزء المراد زراعته

4- تعقيم الجزء المستعمل

5- نقل الجزء المستعمل لسطح البيئة

6- تعريض (البيئة+الجزء المزروع) للظروف البيئية الملائمة

7- تخليق الأعضاء (نمو خضري)

8- تكوين الجذور

9- أقلمة النبات قبل نقله للتربة

IV-7- طرق التعقيم في زراعة الأنسجة

تختلف طريقة التعقيم حسب الجزء المراد تعقيمه تبعا لــ Hall (1999) كالتالي:

- يتم تعقيم المعمل كليا بالفورمالدهي .
- يتم تعقيم الأدوات الزجاجية و المعدنية على درجة حرارة 160°م لمدة 4 ساعات في فرن باستور.
- يتم تعقيم البيئة في الاوتوكلاف على درجة حرارة 121°م و 1.5 ضغط جوي لمدة 15 دقيقة.
- الهرمونات و منظمات النمو يتم تعقيمها بواسطة المرشحات المعقمة.
- تعقم الأجزاء النباتية بالكلوروكس (هيبوكلوريت الصوديوم) 5% لمدة 15- 20 دقيقة، أو بتركيز 10% أو 20 % لمدة 10-30 دقيقة أو باستخدام الكحول 70% لمدة 1-5 دقائق، أو باستخدام الكحول المطلق 90 % لمدة ثواني ثم الغسيل بالماء المقطر مرتين أو ثلاث.
- يمكن استخدام المضادات الحيوية عندما يكون النبات مصابا من الداخل لكنها هامة جدا كوسيلة للتعقيم.

IV-8- الظروف البيئية اللازمة عند زراعة الأنسجة

IV-8-1- الاحتياجات الضوئية

تتمثل في:

* **شدة الضوء:** يعد الضوء منظم و مساعد على تكوين مبادئ الجذور و السوق، إذ انه يساعد على تكوين و تخليق الأجنة النيوسيلية و الأجنة الخضرية العرضية من نسيج الكالوس، و قد لوحظ أن زراعة الأنسجة يلزمها التدرج في شدة الإضاءة من 300الى lux700 و في مرحلة تكوين بدايات الجذور يلزمها التدرج من

1000 إلى lux 3000، و قد اقترح (Nobel and Naylar, 1968) بعد دراسة الكثير من النباتات أن الدرجة المثلى من كثافة الضوء تكون عادة lux1000 في المرحلتين الأولى و الثانية أما الثالثة تكون بين 3000 و lux 1000 و تعرض الزراعات إلى مدة إضاءة قدرها 16 ساعة يوميا.

* **طول النهار**: تختلف حسب احتياجات و نوع النبات ما إذا كان قصير النهار أو طويل النهار، إذ تؤثر فترة طول النهار على تكوين الأنسجة والأعضاء، فقد وجد (Nobel and Naylar, 1968) أن أقصى تخليق للجذور في نبات الطرطوفة يكون عند كثافة ضوئية قدرها lux5000 باستعمال ضوء ابيض لمدة 12 ساعة يوميا، كما أن (El-Bahr et al., 1997) ذكر أن زراعة نسيج من نبات *H. muticus* L. تحت الضوء تعطي نمو جيد للكالوس عكس النامي في الظلام و الذي أعطى نمو ضعيف، و على الخلاف منه فالزراعات النامية في الظلام تعطي تراكم جيد للقلويدات خلاف النامية في الضوء.

* **نوع الضوء**: يلعب الفيتوكروم دورا هاما في عملية التكشف ، فقد ذكر (Beauchesne, 1970) أن الضوء الأحمر و الضوء الأخضر يؤثران أحسن من الضوء الأزرق على نمو نسيج الدخان، كما أضاف (Seibert, 1975) أن الضوء الأزرق و البنفسجي يحفزان التكشف الخضري في نبات الدخان.

IV-8-2- الاحتياجات الحرارية: تعد درجة 25°م مستمرة أفضل الدرجات، حيث وجد (Gautheret, 1969) أن التجذير يحدث بشكل جيد عند تعرض الزراعات لدرجة متباينة من الحرارة 26°م نهارا و 15°م ليلا، و أضاف (Hilton and Rhodes, 1990) أن درجة 25°م تعطي نمو أفضل لجذور نبات *Datura stramonium* L. و نمو اضعف عند درجة 20°م، أما المحتوى الأعلى من الهيوسيامين فيكون عند درجة 20°م.

IV-8-3- التهوية: وجد (Pierik and Steegmans, 1975) أن التهوية تعطي نمو جيد للنسيج، و أضاف (Bereznegovskaya and Smordium, 1973) أن زراعة نسيج *Datura innoxia* Mill. يعطي نمو جيد للنسيج و تراكم اكبر للقلويدات في وجود التهوية.

IV-8-4- حموضة الوسط pH: تؤثر حموضة الوسط على النمو في الزراعة الخلوية فهي توقفه إذا كان اقل من 4.5 و اكبر من 7، فقد ذكر (Koul et al., 1983) أن اكبر إنتاج للقلويدات في كالوس نبات *H. muticus* L. يكون عند pH= 5.3.

IV-9- أهم الاختلافات بين زراعة الأنسجة كوسيلة والوسائل التقليدية للتكاثر

1- صغر حجم الجزء المستعمل في التكاثر.

2- تتم الزراعة على بيئة سائلة أو شبه سائلة.

3- تتم الزراعة تحت ظروف معقمة وظروف بيئية (حرارة وضوء) مناسبة.

4- تمكن من إنتاج أعداد كبيرة إذا ما قورنت بالطرق التقليدية.

5- خلوها من الأمراض.

6- سهولة الاحتفاظ بتلك النباتات و تخزينها لحين الحاجة إليها.

وهناك فائدة اقتصادية تتمثل في انخفاض تكلفة الإنتاج مقارنة بالطرق التقليدية وعدم ارتباط الإنتاج لموسم زراعي معين (Yeoman and Macleod, 1977).

IV-10- مســالك وطرق الحصــول على نبــاتات السلالة الخضرية

1- تكــوين الكالــوس : فيها يزرع الجزء النباتي للحصول على الكالوس خلال المرحلة الأولى (بيئة الزراعة)، ثم تنقل إلى بيئة جديدة يتغير فيها مكونات البيئة من حيث المستوى الهرموني وكذلك الفيتامينات، وقد تتغير الاحتياجات البيئية لتكوين النموات الخضرية العرضية على الكالوس خلال المرحلة الثانية (مرحلة الزيادة)، ثم يعزل كل من المجموع الخضري لوحده أو منفردا وتخلق عليه الجذور خلال المرحلة الثالثة (نقل النبات للتربة) مع أقلمة النبات لإمكان نقله للتربة.

2- **الطــريقة الســريعة** : دون المرور على مرحلة تكوين الكالوس، يتم زراعة الجزء النباتي (براعم جانبية، شرائح من الساق أو الأوراق أو الجذور) وإنمائه مباشرة إلى أجزاء خضرية وذلك خلال المرحلة الأولى، أما في المرحلة الثانية يكون الغرض منها زيادة الأجزاء المزروعة، حيث أنها في الطريقة الأولى يتم ذلك بنقل أجزاء من الكالوس على نفس البيئة (حوالي 0.5غ من الكالوس) لاستمرار نموها وزيادة عدد خلاياها ثم إحداث التخليق عليها، في هذه الطريقة تكون الزيادة بنقل الأجزاء الخضرية إلى بيئة تساعد على تكوين نموات جانبية عليها ثم عزل كل جزء خضري منفردا ونقله مرة أخرى على نفس البيئة المتكون عليها الأجزاء الخضرية الأخرى خلال المرحلة الثانية. أما المرحلة الثالثة فتكون بنقل كل جزء خضري منفردا على بيئة تخليق الجذور.

3- تخليق الأجنــة الجسمية : يتم زراعة الجزء النباتي حيث ينمو مباشرة إلى أجنة خضرية أو يتكون الكالوس خلال المرحلة الأولى ثم ينقل على بيئة غذائية لإنماء الأجنة خلال المرحلتين الثانية والثالثة أو تتكون الأجنة من الكالوس مباشرة (Reinert and Yeoman, 1973).

الوسائل

و

الطرق

I- زراعة النبات

تحت ظروف البيت البلاستيكي المتربع على مساحة قدرها 168.5م² و ارتفاع 3 م، أجريت التجربة بكلية علوم الدقيقة و علوم الطبيعة و الحياة التابع لجامعة العربي بن مهيدي أم البواقي خلال الموسم 2004-2005.

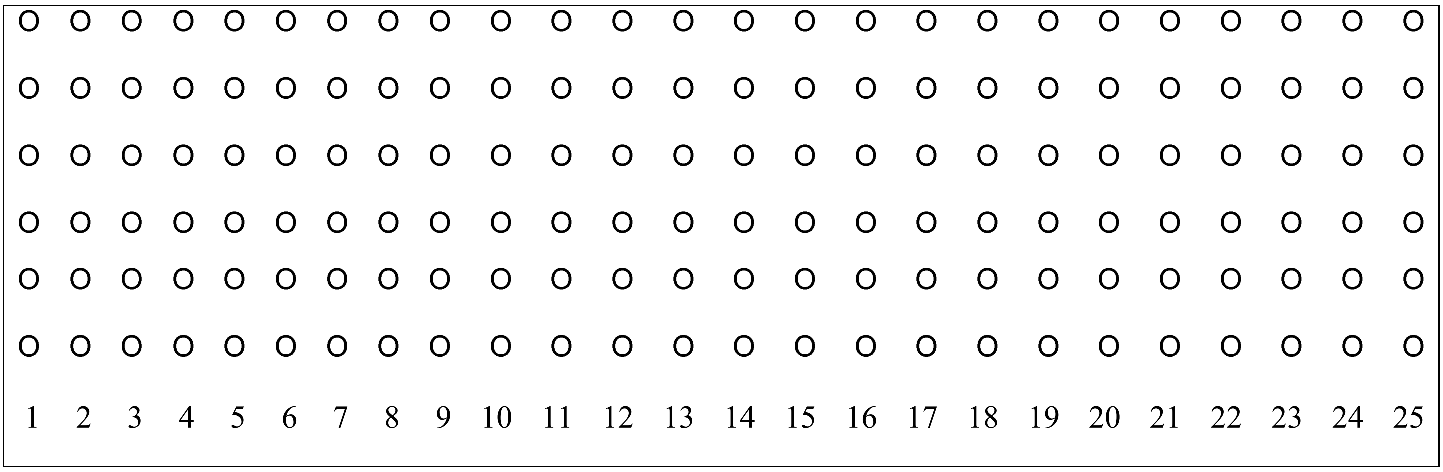
كان تسميد التربة المخصصة للزراعة بالغبار بمعدل 1 إلى 5 (هيكل وعبد الرزاق، 1988)، و تمت عملية البذر لبذور نبات السكران الأبيض في شهر نوفمبر 2004 داخل أصص كبيرة الحجم، وعندما وصل معدل طول البادرات حوالي 8 سم، تمت عملية الشتل في شهر مارس 2005، بمعدل بادرة في كل أصيص، وكان المجموع 150 أصيص، كان السقي في البداية بالسعة الحقلية، ثم بعد شهر من الشتل (شهر أفريل 2005) طبق السقي بنصف السعة الحقلية (**المرحلة1**).

تحضير تراكيز محاليل الهرمونات النباتية

تم وزن 10 و20 ملغ من كل هرمون (K, 2,4-D , BAP, IAA) ثم يذاب كل وزن على حدة في أقل كمية ممكنة من NaOH مع الرج والتحريك (بينما هرمون 2,4-D فيذاب في اقل كمية ممكنة من الكحول في الظلام) و نكمل بالماء المقطر إلى غاية 1ل فنحصل على محاليل جرعتها 10 أو20 مل غ/ل لكل هرمون، أما محاليل الهرمونات المتداخلة فتكون بخلط 500مل من كل محلول هرمون منفرد (مثلا محلول هرمون K تركيز 10ملغ/ل) مع 500 مل من محلول الهرمون الآخر(مثلا محلول هرمون 2,4-D تركيز 20ملغ/ل) فنحصل على محلول لهرمونين متداخلين (Kx2,4-D 10x20ملغ/ ل).

تحضر محاليل المعاملات قبل موعد الرش الأول بيوم واحد حيث توضع في حوجلات سعتها 1 ل لكل معاملة و تكون محكمة القفل وتحفظ في الثلاجة، وبنفس الطريقة تم تحضير كل الجرعات ذات الهرمون الواحد أو الهرمونات المتداخلة مثنى مثنى فنتحصل على محاليل المعاملات السابقة الذكر في المخطط.

تمت معاملة المجموع الخضري لنبات السكران الأبيض رشا بالهرمونات النباتية الصناعية، الأوكسينات متمثلة في الـــ IAA و2,4-D، و السيتوكنينات متمثلة في BAP و K منفردة ومتجمعة هرمونين، هرمونين بالتراكيز 0، 10، 20 ، ملغ/ل بمعدل 6 تكرارات لكل معاملة، و أجريت التجربة بعدد مضاعف أي بمجموع 300 أصيص، والمخطط التالي يوضح تصميم التجربة ميدانيا (شكل13).



1- الشاهد
2- K 10 ملغ/ل
3- K 20 ملغ/ل
4- BAP 10 ملغ/ل
5- BAP 20 ملغ/ل
6- 2,4-D 10 ملغ/ل
7- 2,4-D 20 ملغ/ل
8- IAA 10 ملغ/ ل
9- IAA 20 ملغ/ل
10- 2,4-D ×K (10×10) ملغ/ل
11- 2,4-D × K (10×20)ملغ/ل
12- 2,4-D× K (20×10) ملغ/ل
13- 2,4-D ×K (20×20) ملغ/ل
14- IAA × K (10×10) ملغ/ل
15- IAA × K (10×20) ملغ/ل
16- IAA× K (20×10) ملغ/ل
17- IAA× K (20×20) ملغ/ل
18- BAP ×IAA (10×10) ملغ/ل
19- BAP × IAA (10×20) ملغ/ل
20- BAP × IAA (20×10) ملغ/ل
21- BAP× IAA (20×20) ملغ/ل
22- BAP ×2,4-D (10×10) ملغ/ل
23- BAP ×2,4-D (10×20) ملغ/ل
24- BAP× 2,4-D (20×10) ملغ/ل
25- BAP× 2,.4-D (20×20) ملغ/ل

شكل- 13 – تصميم التجربة ميدانيا

* عملية الرش تمت ليلا للمحافظة على الهرمونات التي تتأكسد بالضوء، وكانت على مرحلتين:

المرحلة الأولى: بداية فترة الإزهار (بداية شهر ماي 2005)(**المرحلة 2**).

المرحلة الثانية: نهاية فترة الإزهار (منتصف شهر ماي 2005)(**المرحلة 3**).

جمع العينات

خلال عملية الإثمار وبالتحديد حوالي شهر من آخرعملية الرش (شهر جوان 2005)(**المرحلة4**)، تم جمع عينات نبات السكران الأبيض، و المعاملة بمختلف الهرمونات النباتية الاصطناعية (BAP ,IAA , 2,4-D, K) منفردة و متداخلة بتراكيز مختلفة (0 ،10 و20 ملغ/ل)، ثم فصل الجزء الخضري عن الجزء الجذري بعد تنقيتها من الشوائب، جففت العينات داخل في الظل ثم داخل فرن على درجة حرارة 60°م لمدة 24 ساعة.

تم سحق العينات بعد التجفيف التام، وحفظت داخل أواني خاصة محكمة القفل بعيدا عن الضوء والحرارة لحين إجراء باقي الاختبارات، و في عمل موازي، و لدراسة حركية القلويدات في نبات السكران، تم جمع العينات خلال المراحل (1،2،3 و4) المبينة سابقا، بمعدل تكرارين لكل تركيز و عينت النسب المئوية لها.

II- الدراسة الهباتية لنبات السكران الأبيض

* قبل عملية الحش أجريت دراسة تشريحية بسيطة لقطاعات عرضية لأكبر أجزاء النبات (جذر، ساق، ورقة) لمعاملات مختلفة و قمنا بتصويرها بمجهر ضوئي مجهز بآلة تصوير رقمية من نوع (Motic Image 2000) متصلة بالحاسوب و رسم المقاطع التخطيطية و التفصيلية لها.

* بعد عملية الحش و قبل التجفيف أخذت القياسات التالية:

– **طول الساق(سم):** قيس طول الساق من قاعدته إلى قمته.

– **طول الجذر(سم):** قيس طول الجذر من نهايته إلى منطقة اتصاله بالساق.

– **مساحة الورقة (سم ^{2}):** تم اختيار ورقتين من كل أصيص و تحسب المساحة بضرب طول الورقة في عرضها قسمة اثنان ويحسب المتوسط.

* تجفف العينات و تحفظ لإجراء باقي الاختبارات.

III- الدراسة الكيميائية لنبات السكران الأبيض

III-1- التقدير الكمي لقلويدات نبات السكران الأبيض

III - 1-1- استخلاص القلويدات بالطريقة الكلاسيكية

حسب Balbaa et al. (1981) يؤخذ 10غ من مسحوق المجموعين الخضري و الجذري لجميع العينات، كل معاملة على حدة وتوضع داخل جهاز المنقط ويضاف إليها الكحول الإيثلي 70 % (للقلويدات خاصية الذوبان في الكحولات) وتجرى عملية الاستخلاص حتى النفاذ من القلويدات (للتأكد نستعمل كاشف ماير).

يبخر المستخلص الكحولي تحت ضغط منخفض بجهاز التبخير الدوراني ثم يعالج هذا الأخير 3 مرات ب5 مل من هيدروكلوريك (HCl) 0.1 عياري مع التقليب في كل مرة لإذابة القلويدات، يجمع المحلول الحمضي ويرشح، ثم يغسل مرتين بواسطة 5مل كلووفورم والمستخلص الكلوفورمي يغسل بواسطة 5مل من الهيدروكلوريد 0.1 عياري (مرتين)، و يضم إلى المحلول الأول ويجعل قلويا بإضافة هيدروكسيد الصوديوم (NaOH)، ثم يترك لمدة 15 د لكي تتحرر القلويدات في المحلول ثم يستخلص 3 مرات بإضافة 10مل من الكلوروفورم في كل مرة.

يتم تبخير المستخلص الكلوفورمي في جهاز التبخير الدوراني للحصول على راسب القلويدات الخام لكل من الجزأيين الخضري والجذري لكل المعاملات.

III- 1-2- المعايرة وتعيين النسبة المئوية للقلويدات الكلية

يذاب الراسب في 30 مل من حمض هيدرو كلوريد HCl (0.02 ع) يضاف له بضع قطرات (2-3) أحمر المثيل ثم يعاير بواسطة هيدروكسيد البوتاسيو م KOH (0.02 ع).

وتحسب النسبة المئوية للقلويدات الكلية باستعمال العلاقة التالية:

$$\textbf{\% للقلويدات الكلية} = \frac{\text{حجم الحمض (0.02ع) – حجم القاعدة المستهلكة (0.02ع)}}{\text{وزن العينة (غ)}} \times 0.00587 \times 100$$

III-2- التحليل الكروماتوغرافي لقلويدات نبات السكران الأبيض

تحضير المستخلصات

تم اختيار العينات التي سجلت فيها اكبر نسبة للقلويدات و التي تتمثل في المعاملة Kx2,4-D تركيز 20x20 ملغ/ل و المعاملة IAA بتركيز20ملغ/ل، للقيام بالتحليل الكروماتوغرافي، حيث استخلصت بنفس الطريقة السابقة حتى الوصول إلى المستخلص الكلوروفورمي الخام و الذي يبخر حتى تبقى منه اقل كمية تمكن من إجراء التحليل.

III-2-1- كروما توغرا فيا الطبقة الرقيقة للمستخلص القلويدي لنبات السكران الأبيض

استعمل في هذه الاختبارات ألواح كروماتوغرافيا جاهزة مغطاة بهلام السليكاجيل.Silicagel G ذات سمك 0.2 ملم (تنشط قبل الاستعمال في الفرن لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 60 °م).

وتم وضع بقع المستخلصات (المستخلصات التي سجلت اكبر نسبة مئوية للقلويدات)على خط بداية اللوح الكروماتوغرافي المحدد بـــ 2 سم على أن تترك مسافة معلومة بين كل بقعة و أخرى حيث كانت آخر بقعتان هما الأتروبين و السكوبولامين المرجعيين و هي نفس الطريقة المتبعة من طرف Mateus et al. (2000).

توضع الألواح داخل إناء الفصل الكروماتوغرافي لإجراء عملية الفصل وكان محلول الفصل (كلوروفورم: ميثانول) بحجم 9 : 1 تبعا لـ Kadi et Yahia (2007)، بعد نهاية الفصل تجفف الألواح تحت درجة حرارة 45 °م لمدة 10 دقائق ثم ترش بمحلول كاشف دراجندورف المعدل الذي يعطي اللون البرتقالي مع القلويدات، ثم تعاين الألواح تحت الأشعة البنفسجية.

تقاس المسافات ثم يحسب معامل الاستبقاء Rf وفقا للعلاقة:

$$\textbf{معامل الاستبقاء Rf} = \frac{\text{المسافة المقطوعة من طرف البقعة}}{\text{المسافة المقطوعة من طرف المذيب}}$$

III-2-2- كروماتوغرافيا الطور الغازية للمستخلص القلويدي لنبات السكران الأبيض

تطبق كروماتوغرافيا الطور الغازية على العينات الغازية أو السريعة التحول إلى غاز دون تفككها أثناء حقنها في المحقن، والمادة المتحركة (Phase mobile) عبارة عن غاز الهليوم، الأزوت، الأرغون أو الهيدروجين، و يسمى الغاز المستعمل في هذه الحالة بالغاز المشع و الذي يمسح العمود الكروماتوغرافي بشكل دائم، هذا الأخير عبارة عن أنبوب صغير ملتو حول نفسه و يحتوي على المادة المدمصة و موضوع في فرن، أما الكاشف فهو يسمح بالتحليل الانتقائي و التعريف بخليط المركبات، و التي تظهر بشكل إشارات.

طريقة عمل الجهاز

بعد حقن العينة المراد تحليلها على رأس الأنبوب بواسطة حقنة من رتبة الميكرون حتى الوصول إلى مصعد الأنبوب.

تنتقل العينة بواسطة الغاز المشع على طول العمود و بدرجات حرارة موافقة لدرجات حرارة تطاير المركبات المراد تحليلها.

تحل المركبات و تفصل عن بعضها بدلالة الألفة الكيميائية مع المادة المدمصة التي قد تكون سائلة غير متطايرة أو متطايرة جزئيا أو صلبة.

فكلما كان المركب ذو ألفة كيميائية كبيرة مع المادة المدمصة كلما استغرق وقتا أطول للخروج من العمود الكروماتوغرافي و هذا ما يسمى بوقت الحجز temps de rétention، و هو وقت الجريان أو الوقت المستغرق من بداية الحقن إلى غاية ظهور الإشارة العظمى للمذاب على شاشة الكاشف.

و عند خروج المركبات من العمود فإنها تصطدم مباشرة بالكاشف الذي يقيم باستمرار كمية كل من مكونات العينة بواسطة الغاز المشع و ذلك بحساب مختلف الخواص الفيزيائية للخليط الغازي، فالكاشف يرسل الإشارة الالكترونية نحو المسجل، الذي يرسم منحنيات كل إشارة بدلالة الشدة، و مجموع الإشارات المسجلة تسمى: كروماتوغرام(Ionkova et al., 1994).

IV- الزراعة النسيجية

1IV- إنماء البذور

تم إنماء البذور بمخبر وحدة البيوتكنولوجيا قسم النبات بالمركز القومي للبحوث بجمهورية مصر العربية، بإتباع الخطوات التالية:

- تعقم اليدين بالكحول.
- تعقم البذور بغسلها بالماء الساخن ثم بالكحول ثم بالماء المقطر.
- يعقم ورق الترشيح الذي يستعمل في إنماء البذور بماء مغلي وذلك بعد تقسيم كل ورقة ترشيح دائرية إلى نصفين متساويين وكل نصف يطوى على النصف الآخر.

توضع البذور المعقمة على ورق الترشيح بشكل صف واحد ثم تلوى ورقة الترشيح ثم توضع في إناء به كمية صغيرة من الماء، بحيث تكون جهة ورقة الترشيح الحاوية على البذور نحو الأعلى لكي لا تتعفن (Torres, 1989).

2-IV - تحضير بيئات الزراعة النسيجية

- تم تحضير تراكيز من الهرمونات K، NAA، 2,4-D و IAA و ذلك بتحضير محلول مكون من K بتركيز 1ملغ/ل و IAA بتركيز 2 ملغ/ل و الذي يكون بوزن 1 ملغ من الكينتين و 2 ملغ من IAA و إذابتهما في اقل كمية ممكنة من NaOH (1ع) ثم نكمل بالماء المقطر إلى غاية الحصول على 1ل من المحلول الذي تركيزه K 1ملغ/ل و IAA 2ملغ/ل، و بنفس الطريقة تحضر باقي التراكيز المنفردة أو المتداخلة.

- لتحضير 1ل من البيئة نزن 30غ من السكروز (98%) و4.4غ من وسط MS (Murashige and Skoog, 1962) و إذابتها في ماء مقطر يكون أقل من 1ل في دورق مخروطي لتسهيل رجها وعند التأكد من الذوبان نضيف 7.5غ من الآجار مع الرج حتى الذوبان، ثم نقوم بقياس pH ونضبطه عند: 5.8 و نكمل بالماء المقطر إلى 1ل ثم نضع الدورق (مغلوقة فوهته ب القطن و ورق الألومنيوم) في حمام مائي درجة حرارته 100°م أو أكثر مع التحريك في كل مرة إلى أن نلاحظ صفاء تام للسائل، ثم نصب البيئة في الدوارق المعقمة، بحيث يقسم ربع اللتر من البيئة على 5 دوارق وتغلق بإحكام، بحيث تكون الكمية متساوية في كل الدوارق.

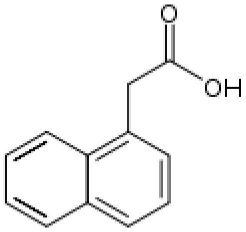
و تتمثل الأوساط البيئية المحضرة فيما يلي:

- بيئة تحتوي على K بتركيز 1ملغ/ل و IAA بتركيز 2ملغ/ل
- بيئة تحتوي على 2,4-D بتركيز 1ملغ/ل
- بيئة تحتوي على 2,4-Dبتركيز 2ملغ/ل

-بيئة تحتوي على 2,4-D بتركيز 3ملغ/ل

-بيئة تحتوي على K بتركيز 0.5ملغ/ل و NAA بتركيز 1ملغ/ل

الـــ NAA هو Naphthalin Acetic Acid وهو عبارة عن اوكسين ذو الصيغة العام ة $C_{12}H_9O_2$ K وكتلته المولية 224.3غ/مول (الشكل 14) (الشحات، 2000)



شكل-14- الصيغة الجزئية للـــ NAA

IV- 3- تعقيم البيئة

يتم تعقيم البيئة بالأوتوكلاف لمدة ربع ساعة بعد أن ترتفع درجة الحرارة إلى 120°م و 1.5 ضغط جوي (Denis et al., 1998)، ثم نضيف الهرمونات المحضرة باستعمال المرشحات المعقمة.

IV-4- الجزء المستعمل

بعد إنبات البادرات (بعد حوالي شهرين) في المخبر، يتم عزل الجذور (وهي الجزء المختار للزراعة) وتقسم إلى أجزاء صغيرة جدا، ثم تعقم في الإيثانول95 % لمدة نصف دقيقة ثم تغمس في ماء الكلوروكس 20% (ماء جافيل) مع نقطتين من مادة Tween 20 لمدة 20 د ثم تغسل 5 مرات بماء مقطر معقم.

IV-5- نقل الجزء المستعمل إلى سطح البيئة

في غرفة التعقيم ينقل الجزء المراد زراعته على سطح بيئة صلبة بواسطة ملقط معقم بحيث يجب التأكد من التلامس الجيد للنسيج مع سطح البيئة ويتم ذلك تحت ظروف تعقيم جيدة.

IV-6- الظروف البيئية

وضعت البيئات المختلفة في حاضنة مضبوطة، تحت إضاءة بضوء أبيض شدته 1500Lux لمدة 16ساعة نهارا، و درجة حرارة (25 ±2)°م و هي نفسها المستعملة من طرف Masanura (1994).

IV-7- القياسات المأخوذة

بعد بلوغ الكالوس عمر 4 أسابيع (50-100ملغ) يجفف لاستخلاص القلويدات منه بالطريقة الكلاسيكية والمستعملة في استخلاص القلويدات من نبات السكران الأبيض *in vivo* (ص36).

يقاس الوزن الطازج و تعين النسبة المئوية للقلويدات في كل كالوس و في كل أسبوع لمدة شهر.

V- الدراسة الإحصائية

تم تحليل النتائج المحصل عليها في الدراسة النباتية باستعمال برنامج الإحصاء MINITAB.

تم تحليل النتائج المحصل عليها في باقي الدراسات باستعمال برنامجي الإحصاء MINITAB و STATISTICA (version6) حيث قمنا بمعالجة النتائج عن طريق تحليل التباين analyse de la variance و مقارنة نتائج الشاهد مع المعاملات عن طريق اختبار Dunnett و مقارنة المعاملات مع بعضها البعض باختبار Scheffé (STATISTICA)، كما استعملنا اختبار Tukey (MINITAB) لمقارنة تراكيز المستخلصات و السلالات البكتيرية، كما قمنا بدراسة حركية قلويدات نبات السكران باستعمال التحليل الإحصائي إلى المكونات الأساسية une Analyse en Composantes Principales (ACP) (STATISTICA).

تحليل و مناقشة النتائج

I- الدراسة النباتية للسكران الأبيض

I-1- دراسة تأثير الهرمونات النباتية على الصفات الماكرومورفولوجية المقاسة لنبات السكران الأبيض

I-1-1- تأثير الهرمونات النباتية على طول ساق نبات السكران الأبيض

بينت الدراسة الإحصائية المتمثلة في تحليل التباين و المبينة في الجدول 08 وجود فروق معنوية واضحة بين تأثير المعاملات الهرمونية على طول ساق نبات السكران الأبيض ($p=0.020$).

جدول- 8- تحليل التباين لتأثير الهرمونات على طول ساق نبات السكران الأبيض

	DDL	S C	M C	Test F	P
Phytohormones	24	78.720	3.280	2.00	0.020
Erreur	50	82.000	1.640		
Total	74	160.720			

يشير الجدول 11 و المبين لمتوسط طول ساق نبات السكران الأبيض لجميع المعاملات الهرمونية المنفردة و المتداخلة، أن الهرمونات النباتية المستعملة أثرت بالزيادة على طول الساق مقارنة بالشاهد غير المعامل، حيث سجل اكبر متوسط طول الساق 36سم عند المعاملة بهرمون 2,4-D منفردا بتركيز 20 ملغ/ل و متداخلا مع الـــ K بتركيز 20 ملغ/ل لكل منهما، فقد ذكر Scalla (1991) أن هرمون 2,4-D يشجع السيادة القمية و بالتالي عند إضافة الهرمونين الاوكسين و السيتوكنين معا فان الاوكسين ينقص قليلا من عمل السيتوكنين في حالة ارتفاع معدل الأول عن معدل الثاني، كما أضاف روبرت و فرانسيس (1993) أن الاوكسين يعمل على جذب ايونات الهيدروجين المسببة أيضا لمرونة جدر الخلايا مما يسهل زيادة النمو الطولي عن طريق تحفيز الاستطالة الخلوية.

I-1-2- تأثير الهرمونات النباتية على طول جذر نبات السكران الأبيض

بين تحليل التباين لتأثير الهرمونات على طول جذر نبات السكران الأبيض (كما هو واضح في الجدول 09) وجود فروق معنوية واضحة بين تأثير المعاملات الهرمونية على طول جذر نبات السكران الأبيض (p=0.000).

جدول-9 - تحليل التباين لتأثير الهرمونات على طول جذر نبات السكران الأبيض

	DDL	S C	M C	Test F	P
Phytohormones	24	2859.79	119.16	35.60	0.000
Erreur	50	167.33	3.35		
Total	74	3027.12			

كما أوضح الجدول 11 و المبين لمتوسط طول جذر نبات السكران الأبيض لجميع المعاملات الهرمونية، أن تأثير الاوكسينات كان اكبر من تأثير السيتوكينينات و التي بدورها زادت من طول الجذر مقارنة بالشاهد غير المعامل و الذي بلغ متوسط طول الجذر فيه 25 سم، إضافة إلى تأثير التداخلات التي سجلت فيها اكبر المتوسطات 50 سم (هو ضعف ما سجل عند الشاهد) عند المعاملة بهرمون الـــ 2,4-D بتركيز 20ملغ/ل متداخلا مع الكينتين بالتركيزين 10 و20 ملغ/ل، إذ أن الجذور أكثر حساسية للاوكسينات عن السيقان، فقد وجد .Sairam et al (2003) أن استعمال تركيز منخفض من هرمون 2,4-D يضاعف عدد الجذور الناشئة من الكالوس من 3 إلى 6 مرات.

I-1-3- تأثير الهرمونات النباتية على مساحة ورقة نبات السكران الأبيض

بينت الدراسة الإحصائية المتمثلة في تحليل التباين لتأثير الهرمونات على مساحة الورقة و المبينة في الجدول 10 وجود فروق معنوية واضحة بين تأثير المعاملات الهرمونية على متوسط مساحة الأوراق في نبات السكران الأبيض (p=0.000).

جدول-10- تحليل التباين لتأثير الهرمونات على مساحة ورقة نبات السكران الأبيض

	DDL	S C	M C	Test F	P
Phytohormones	24	1577.280	65.720	12.93	0.000
Erreur	50	254.167	5.083		
Total	74	1831.447			

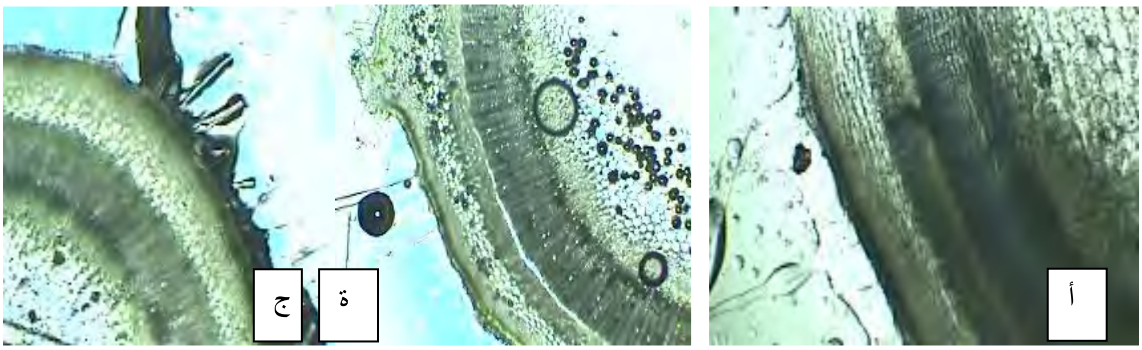
مما تجدر الإشارة إليه من خلال نتائج الجدول 11 أن الهرمونات النباتية المستعملة أثرت بالزيادة على مساحة الورقة، إذ أن جميع المعاملات الهرمونية سجلت زيادة في مساحة الورقة أعلى من المسجلة عند الشاهد، حيث سجل اكبر متوسط مساحة لورقة نبات السكران الأبيض 70 سم^2 عند المعاملة بالكينتين و 2,4-D متداخلين و بأعلى التراكيز و هي زيادة معتبرة مقارنة بمتوسط المساحة 45 سم^2 المسجل عند الشاهد، و فسر ذلك على أن كل من الاوكسين و السيتوكنين لازمين لانقسام النواة و منه انقسام الخلايا بالرغم من أن الاوكسين يسود عمله في هذه الخطوة، إضافة إلى دور السيتوكنين في تضخم الخلايا عن طريق جذب الأحماض الأمنية من الأجزاء غير المعاملة بالهرمونات ثم تحويلها إلى بروتينات و أحماض نووية، كما أن للسيتوكنينات مثل الكينتين القدرة على تنظيم توزيع حركة و انتقال العناصر المعدنية (الشحات، 2000).

جدول -11 – تأثير الهرمونات النباتية على الصفات الماكرومورفولوجية المقاسة لنبات السكران الأبيض

المعاملات	متوسط طول الساق (سم)	متوسط طول الجذر (سم)	متوسط مساحة الورقة (سم^2)
الشاهد	32	25	45
10Kملغ/ل	33.3	26.3	60.3
20Kملغ/ل	35	30.3	61.3
10BAPملغ/ل	34	33	61.3
20BAPملغ/ل	35	34.6	63.6
2,4-D 10 ملغ/ل	35	37.3	58.6
2,4-D 20 ملغ/ل	36	40.3	63.6
IAA 10ملغ/ل	33.3	40.3	60.6
IAA 20ملغ/ل	35.6	40.6	58.6
2,4-D x10x10Kملغ/ل	34.3	43	63.6
2,4-D x10x20Kملغ/ل	34.6	50	62.6
2,4-D x20x10Kملغ/ل	35	45	69
2,4-D x20x20Kملغ/ل	36	50	70
10x10IAAxkملغ/ل	34	44.6	59.3
10x20IAAxkملغ/ل	34.6	43	63
20x10IAAxkملغ/ل	34.3	45.6	62.3
20x20IAAxkملغ/ل	35	44.3	68
10x10BAPxIAAملغ/ل	33.3	40	59.3
10x20BAPxIAAملغ/ل	36	41.3	64
20x10BAPxIAAملغ/ل	34	42	62.6
20x20BAPxIAAملغ/ل	35.3	41	69
10x10 BAPx2,4-Dملغ/ل	34.3	38.6	61
10x20BAP x2,4-Dملغ/ل	35.3	40	61.3
20x10BAP x2,4-Dملغ/ل	34.3	43.6	62.3
20x20BAP x2,4-Dملغ/ل	35.3	46	69

I-2- دراسة ميكرومورفولوجية لنبات السكران الأبيض

من خلال القطاعات المنجزة في أجزاء مختلفة من نبات السكران الأبيض و المعامل بهرمونات نباتية منفردة و متداخلة و بمختلف التراكيز، تبين عدم وجود اختلافات واضحة بين القطاعات العرضية الشريحي للساق، الجذر و الورقة الخاصة بالمعاملات الهرمونية المختلفة نوعا و تركيزا مثلما هو واضح في الشكل15 الذي يمثل قطاع عرضي في ساق نبات السكران لثلاث معاملات هرمونية مختلفة الأولى خاصة بالشاهد غير المعامل و الثانية بالسيتوكنين الـــ BAP بتركيز10ملغ/ل و الثالثة بالاوكسين الـــIAA بتركيز10ملغ/ل، و الشكل 16 الذي يمثل قطاع عرضي في ورقة نبات السكران لمعاملتين هما المعاملة بالــIAA و آخر معامل بالـــ K بتركيز 10 ملغ/ل لكل منهما.



أ: قطاع عرضي في ساق نبات السكران الأبيض المعامل بـــ BAP بتركيز 10ملغ/ل (تكبيرx160)

ب:قطاع عرضي في ساق نبات السكران الأبيض غير المعامل أي الشاهد(تكبيرx160)

ج : قطاع عرضي في ساق نبات السكران الأبيض المعامل بـــ IAA بتركيز10ملغ/ل (تكبيرx160)

شكل-15- قطاعات عرضية لمعاملات هرمونية مختلفة في ساق نبات السكران الأبيض

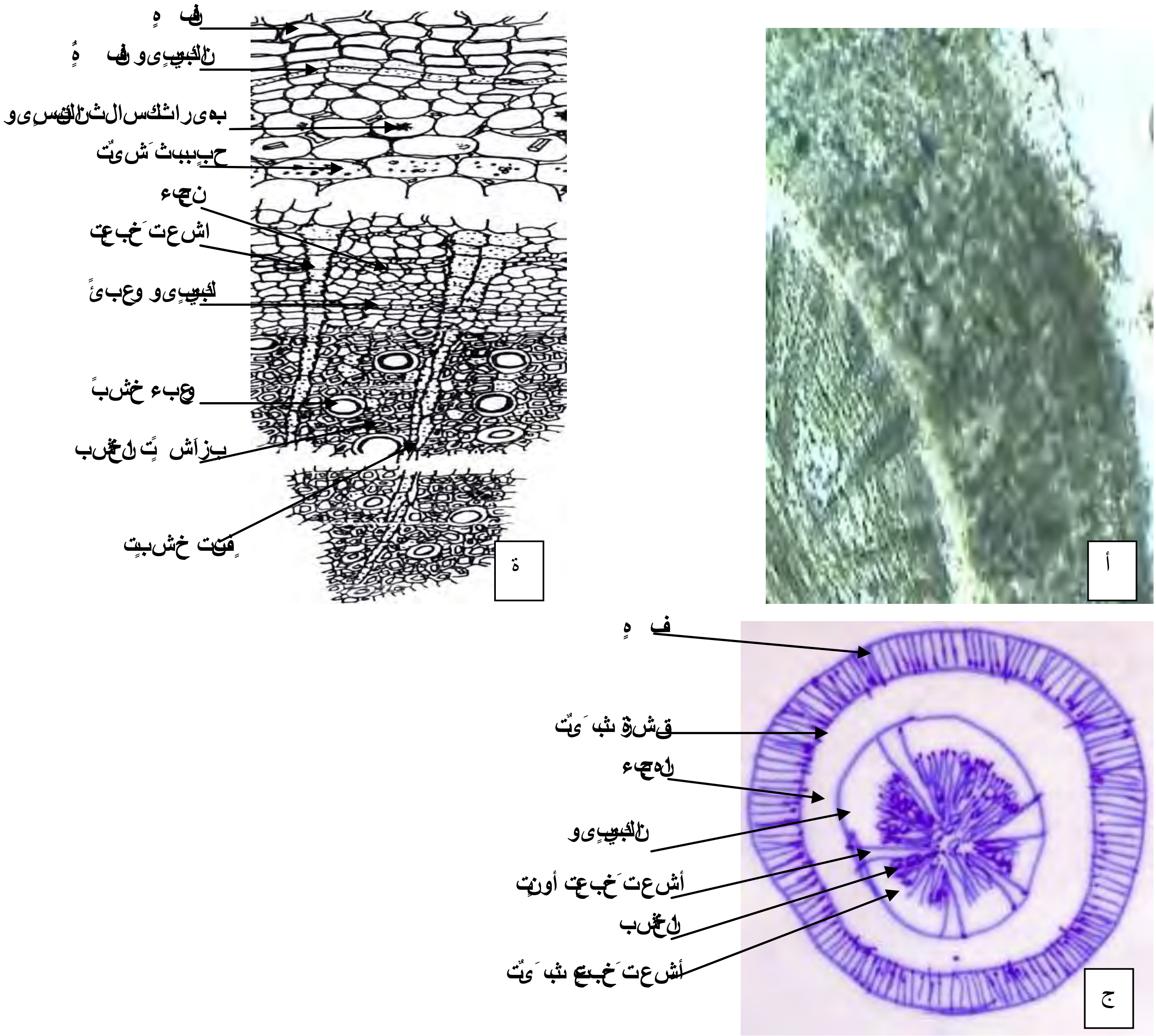
أ: قطاع عرضي في ورقة نبات السكران الأبيض المعامل بـــ IAA بتركيز 10ملغ/ل (تكبيرx160)

ب: قطاع عرضي في ورقة نبات السكران الأبيض المعامل بـــ K بتركيز 10ملغ/ل (تكبيرx160)

شكل-16- قطاعات عرضية لمعاملات هرمونية مختلفة في ورقة نبات السكران الأبيض

I-3-1- دراسة تشريحية لجذر نبات السكران الأبيض

يظهر الشكل 17 الممثل لقطاع في جذر نبات السكران الأبيض انه دائري الشكل، يحفه من الخارج طبقة بنية اللون تمثل طبقة الفلين التي تتكون من عدد كبير من الصفوف يزداد عددها بزيادة عمر الجذور، إلى الداخل منطقة واسعة تمثل القشرة الثانوية و اللحاء، تتكون من خلايا برانشيمية رقيقة الجدر تترك بينها مسافات بينية واسعة نوعا ما، و تحيط بها حلقة الكامبيوم الوعائي المتكون من صف أو صفين من خلايا رقيقة الجدر بمنطقة الخشب، المتمركزة وسط الجذر و مكونة من أوعية خشبية، و خلايا مغلظة و مرتبة ترتيبا قطريا واضحا و تحتوي الخلايا البرانشيمية للقشرة و اللحاء و الخشب على مجموعات من بلورات صغيرة لأكسلات الكالسيوم و بعض حبيبات النشاء.



أ: قطاع عرضي ميكروسكوبي في جذر نبات السكران الأبيض (تكبير x160)

ب: قطاع عرضي تفصيلي لقطاع عرضي في جذر نبات السكران الأبيض (تكبير x160)

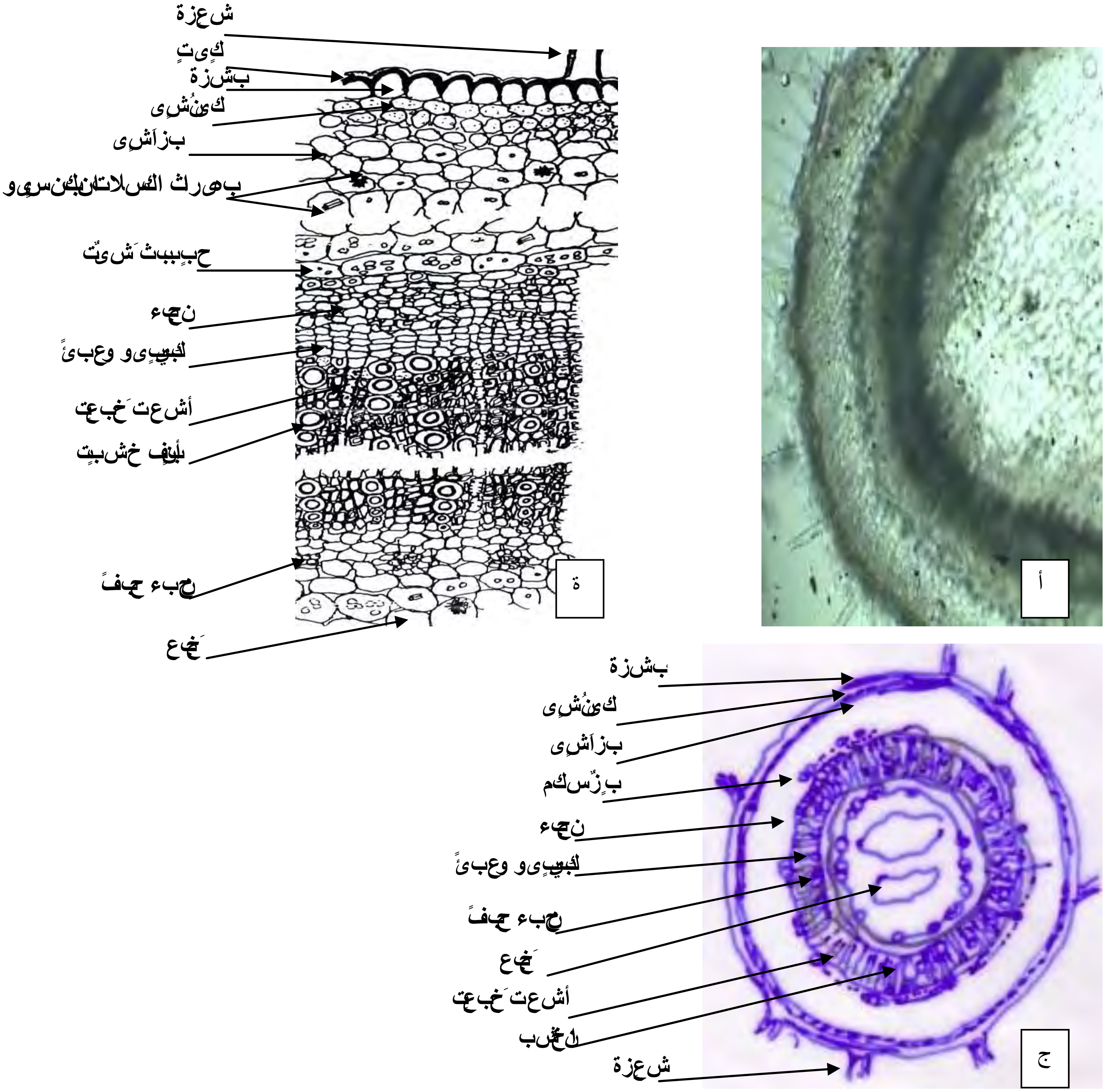
ج: قطاع عرضي تخطيطي في جذر نبات السكران الأبيض

شكل-17- قطاعات عرضية في جذر نبات السكران الأبيض

I-3-2- دراسة تشريحية لساق نبات السكران الأبيض

أوضح الشكل 18 المبين لقطاع عرضي في ساق نبات السكران الأبيض، انه دائري الشكل، محاط من الخارج بطبقة من البشرة التي تليها طبقة القشرة و المكون صفها الداخلي من طبقة الاندودرمس المحتوية على حبيبات نشوية يليها البيريسكل على شكل حلقة تحيط بالاسطوانة الوعائية و هذه الأخيرة يمثل الجزء الأكبر من الساق و تتكون من اللحاء، و هو عبارة عن طبقة ضيقة نوعا ما يليها إلى الداخل حلقة الكامبيوم

ثم حلقة الخشب الذي تترتب خلاياه قطريا، و في الوسط توجد منطقة النخاع و عند حافته بجوار الخشب الأولي مجموعات متفرعة من اللحاء الحافي أو لحاء خارج الخشب و المميز لأفراد العائلة الباذنجانية.



أ: قطاع عرضي ميكروسكوبي في ساق نبات السكران الأبيض (تكبير x160)

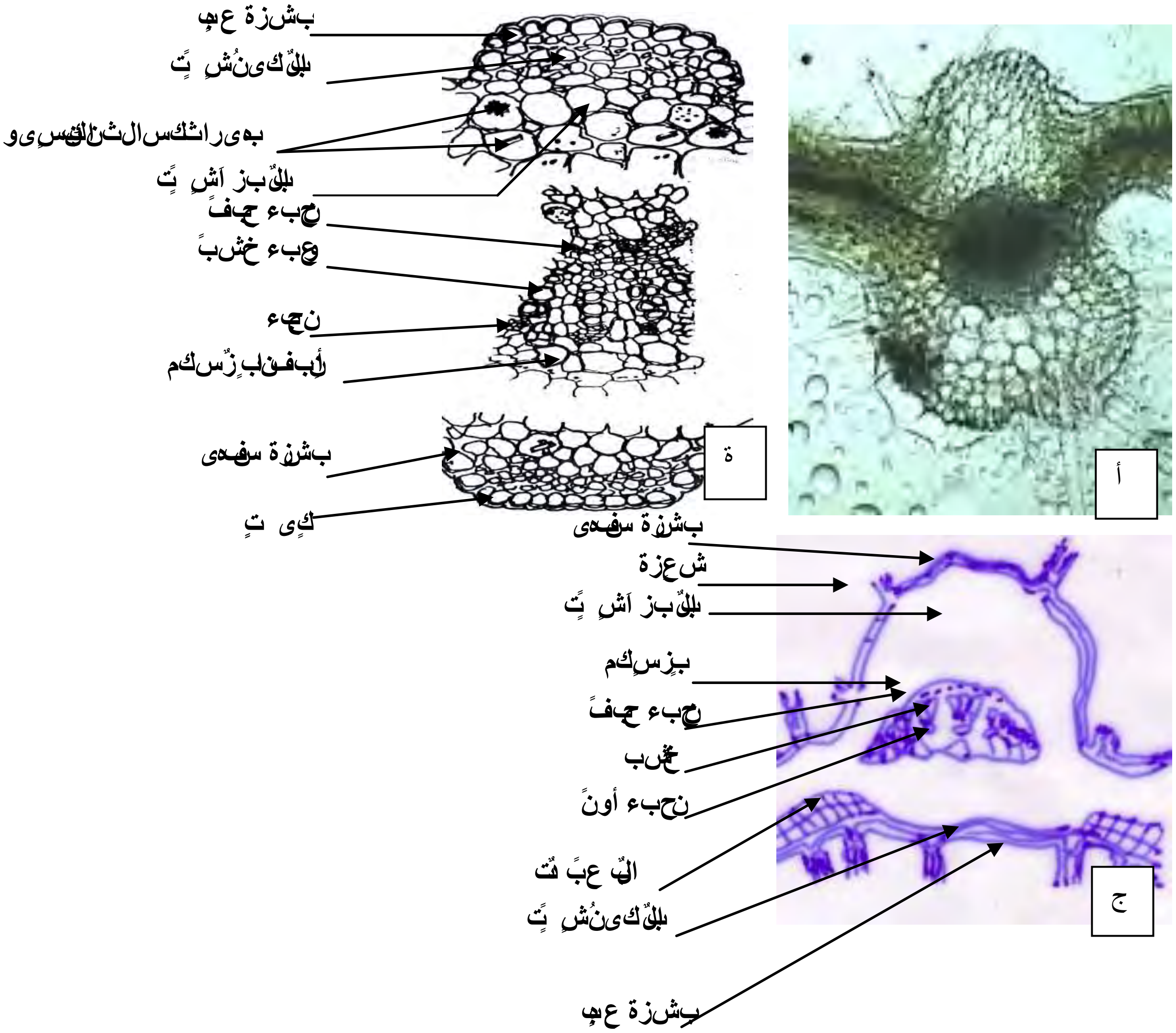
ب: قطاع عرضي تفصيلي لقطاع عرضي في ساق نبات السكران الأبيض (تكبير x160)

ج: قطاع عرضي تخطيطي في ساق نبات السكران الأبيض

شكل-18- قطاعات عرضية في ساق نبات السكران الأبيض

I-3-3- دراسة تشريحية لورقة نبات السكران الأبيض

يظهر الشكل 19 الخاص بقطاعات عرضية في ورقة نبات السكران الأبيض، أن منطقة العرق الوسطى محدبة السطحين و الوجه السفلي أكثر تحدبا من الوجه العلوي و تحمل من البشرة العليا و السفلى كثيرا من الشعيرات و الثغور، و تضم البشرتان بينهما منطقة الميزوفيل (المحتوي على بلورات اكسلات الكالسيوم)، و المتكون من الخلايا العمادية و الخلايا الأسفنجية في منطقة ما بين العروق، حيث تتكون الخلايا العمادية من صف واحد، و لا تستمر في منطقة العرق الوسطي و العروق الجانبية حيث تنفصل عن بعضها بكتل من الخلايا الكولنشيمية، أما الخلايا الأسفنجية فتتكون من خلايا كلورنشيمبة غير منتظمة الشكل تترك بينها مسافات واسعة تمتد حتى السطح السفلي للورقة و تنفصل هي الأخرى في منطقة العرق الوسطى العروق الجانبية بمجموعات من خلايا القشرة البرانشيمية.



أ: قطاع عرضي ميكروسكوبي في ورقة نبات السكران الأبيض (تكبير x160)
ب: قطاع عرضي تفصيلي لقطاع عرضي في ورقة نبات السكران الأبيض (تكبير x160)
ج: قطاع عرضي تخطيطي في ورقة نبات السكران الأبيض
شكل-19- قطاعات عرضية في ورقة نبات السكران الأبيض

II- الدراسة الكيميائية لنبات السكران الأبيض

II-1- التقدير الكمي لقلويدات نبات السكران الأبيض

قدرت النسب المئوية لقلويدات نبات السكران الأبيض المعالج بالهرمونات النباتية الاصطناعية الأوكسينات متمثلة في 2,4-D و IAA و السيتوكينينات متمثلة في BAP و K ب التراكيز: 0، 10 و 20 ملغ/ل منفردة ومتداخلة على أساس القاعدة أوكسين x سيتوكنين، حيث أوضحت الدراسة الإحصائية للنتائج المحصل عليها ما يلي:

أوضحت نتائج الجدولين 12 و13 المبينين لنتائج تحليل التباين لتأثير الهرمونات على النسبة المئوية لقلويدات المجموعين الخضري و الجذري، انه هناك فروق معنوية واضحة للنسبة المئوية للقلويدات في المجموعين الخضري و الجذري، أما عند استعمال اختبار Dunnett للمقارنة بين الشاهد غير المعالج و باقي المعالجات الهرمونية نلاحظ وجود فروق معنوية واضحة بين الشاهد و باقي المعالجات الهرمونية في النسبة المئوية لقلويدات المجموعين الخضري و الجذري، كما وجدنا عند استعمال اختبار Scheffé، فهناك تباين في النتائج حيث ظهرت بعض المعالجات التي ليست بينها فروق معنوية في النسبة المئوية للقلويدات في المجموعين الخضري و الجذري، فمثلا بالنسبة للمجموع الجذري، المعالجات التي لم تبد فروق معنوية بينها هي: K(10mg/l) و BAPx2,4-D(20x10mg/l)؛ BAP(20mg/l) و IAA(10mg/l)؛ IAAxK(20x10mg/l) و BAPxIAA(10x10mg/l)؛ IAA(10mg/l) و Kx2,4-D(20x10mg/l)؛ IAAxK(10x20mg/l) و IAAxK(20x20mg/l)، أما بالنسبة للمجموع الخضري فالمعالجات التي لم تبد فروق معنوية بينها هي: K(10mg/l) و BAP(20mg/l)؛ IAA(20mg/l) و 2,4-D(20mg/l)؛ 2,4-D(20mg/l)و Kx2,4-D(10x20mg/l)؛ IAA(10mg/l)و Kx2,4-D(10x20mg/l)؛ Kx2,4-D(10x10mg/l) و IAAxK(20x20mg/l)؛ 2,4-D(20mg/l) و BAPx2,4-D(10x20mg/l)؛ IAA(20mg/l)و BAPx2,4-D(10x20mg/l)؛ Kx2,4-D(10x20mg/l) و BAPx2,4-D(10x20mg/l؛ BAPx2,4-D(20x10mg/l و BAPxIAA(10x10mg/l)؛ BAPx2,4-D(20x20mg/l) و IAAxK(20x10mg/l)؛ BAPxIAA(20x20mg/l)و BAPx2,4-D(10x10mg/l).

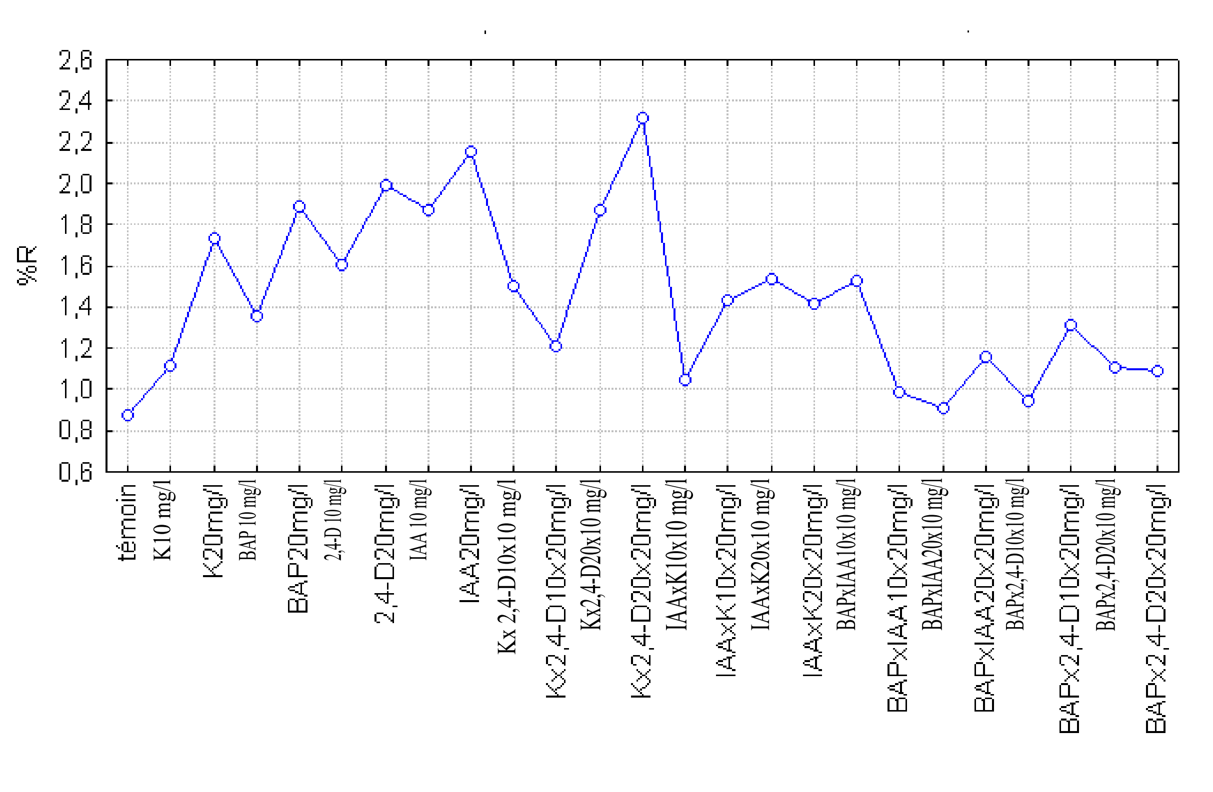
جدول-12- تحليل التباين لتأثير الهرمونات على النسبة المئوية لقلويدات المجموع الجذري لنبات السكران الأبيض

	DDL	S C	M C	Test F	P
Phytohormones	24	12.01174	0.50049	$2.9^{E}+04$	0.0000
Erreur	50	0.00085	0.00002		
Total	74	12.01259			

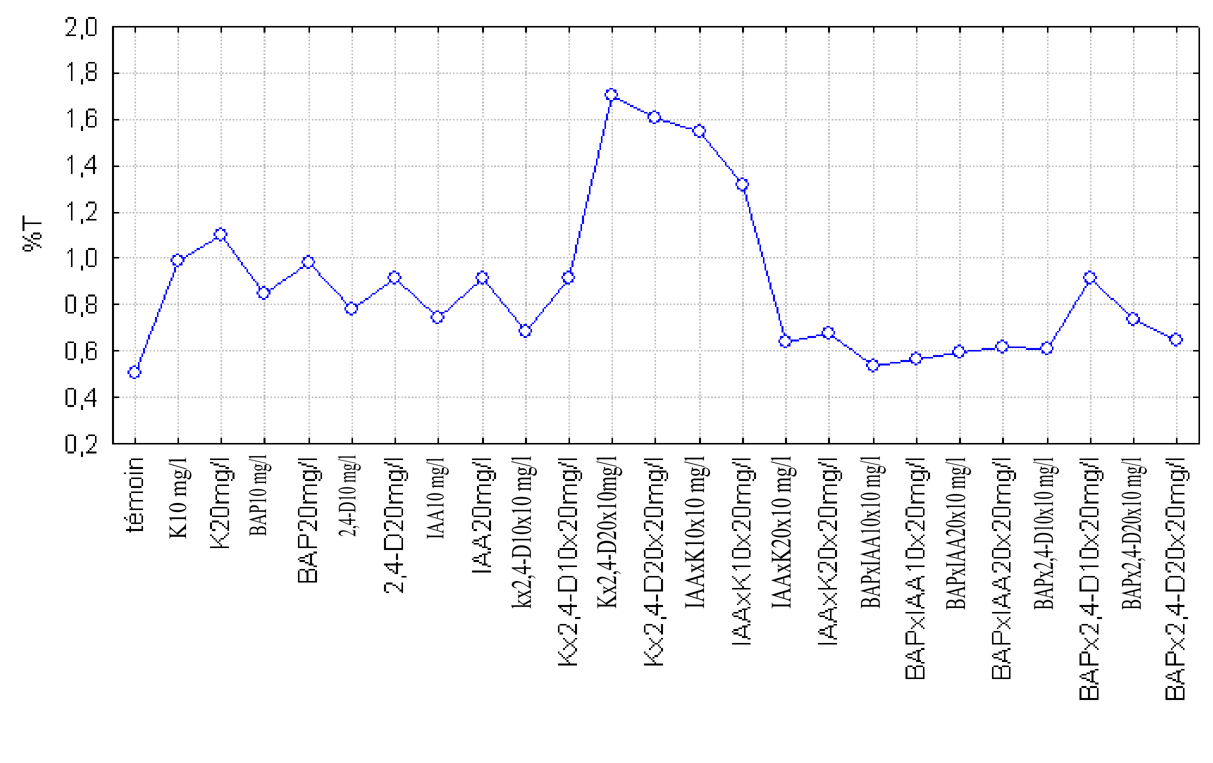
جدول-13- تحليل التباين لتأثير الهرمونات على النسبة المئوية لقلويدات المجموع الخضري لنبات السكران الأبيض

	DDL	S C	M C	Test F	P
Phytohormones	24	8.21250	0.34219	$3.8^{E}+04$	0.0000
Erreur	50	0.00045	0.00001		
Total	74	8.21294			

سجل ارتفاع في النسب المئوية لقلويدات المعالجات بالهرمونات سواء كانت منفردة أو متزاوجة مقارنة بالشاهد الذي قدرت النسبة المئوية لقلويدات مجموع ه الجذري بـــ0.873 % وبمجموعه الخضري بـــ0.505 %، بينما بلغت أعلى نسبة مئوية للقلويدات في المجموع الجذري (الشكل20) حيث تضاعفت بأكثر من مرتين مقارنة بالشاهد و قدرت بـــ 2.321% عند المعاملة Kx2,4-D(20x20mg/l) و هي اكبر نسبة تحصل عليها لحد الآن، أما بالنسبة للمجموع الخضري (الشكل21) فارتفعت النسبة المئوية و تضاعفت به بأكثر من ثلاث مرات مقارنة بالشاهد حيث قدرت بـــ 1.702% عند المعاملة Kx2,4-D(20x10mg/l)؛ و يرجع ذلك إلى أن الهرمونات ترفع من الإنتاج الكلي للقلويدات في النباتات الطبية المعاملة بالهرمونات النباتية من خلال المساعدة على تنشيط إنتاج الأحماض الأمنية مثل: الاورنثين الذي هو أساس بناء القلويدات التروبانية (Mann, 1987).



شكل -20 – تأثير الهرمونات النباتية على تراكم قلويدات المجموع الجذري لنبات السكران الأبيض

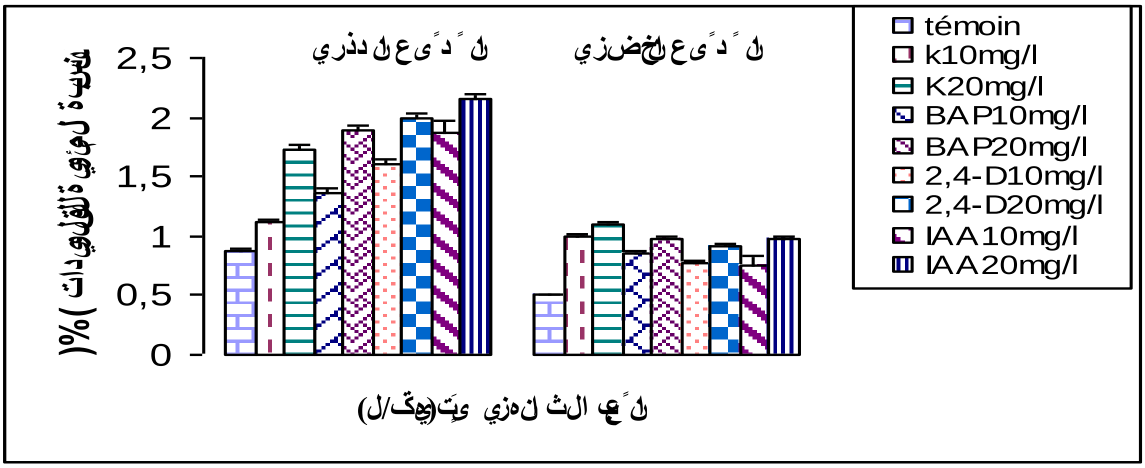


شكل – 21- تأثير الهرمونات النباتية على تراكم قلويدات المجموع الخضري لنبات السكران الأبيض

بينت النتائج الموضحة في الشكل 22 أن تأثير الهرمونات النباتية منفردة كان واضحا وجليا على النسبة المئوية لقلويدات نبات السكران الأبيض، حيث نلاحظ ارتفاع معتبر فيها عند استعمال الهرمونات دون استثناء سيتوكنينات أو اوكسينات، بينما يظهر تأثير الاوكسينات أكبر من تأثير السيتوكنينات في المجموع الجذري، إضافة إلى ارتباط الزيادة أو التأثير بارتفاع تركيز الهرمونات المستعملة أي من 0 إلى 10 إلى 20ملغ/ل، حيث بلغت أكبر النسب عند استعمال الاوكسينات، أما فيم يخص المجموع الخضري فكان تأثير السيتوكنينات أكبر و أوضح من الاوكسينات أي عكس ما حدث في المجموع الجذري و مقارنة بالشاهد غير المعامل.

بلغت أعلى نسبة مئوية للقلويدات في المجموع الجذري عند المعاملة بالاوكسين IAA و بتركيز 20 ملغ/ل، حيث قدرت بـــ2.153% و هي تمثل تقريبا ثلاثة أضعاف النسبة المقدرة في الشاهد الذي بلغت نسبته المئوية 0.873%، أما بالنسبة للمجموع الخضري، فأعلى قيمة للنسبة المئوية للقلويدات سجلت عند استعمال السيتوكنين K بتركيز 20ملغ/ل حيث كانت 1.103%، و هي تمثل ضعفي النسبة المقدرة في الشاهد و الذي قدرت به النسبة بـــ0.505%.

ويرجع ذلك إلى أن الأوكسين يزيد من معدل الإثيلين بالنبات بحوالي 8 إلى 10 مرات عند إضافته رشا على الأوراق حسب Cary et al. (1995)، كما أن الإثيلين يراكم القلويدات في النباتات الطبية مثلما هو الحال في خلايا: *Eschsholtzia California* و *Sommiferum Papaver* حسب Piatti et al. (1991) و *C. roseus* حسب Yahia et al. (1998)، إضافة إلى أن الهرمونات النباتية قامت بتنشيط الجين الخاص بإنتاج أنزيم H6H المسؤول عن تخليق القلويدات التروبانية (Cardillo et al., 2005) و هو نفس ما وجد عند تنشيط هذا الجين مما أدى إلى تكوين القلويدات التروبانية في الزراعة الخلوية لجذور نبات السكران حسب Hibi et al. (1992) و Zhang et al. (2004).



شكل- 22- تأثير الهرمونات منفردة على النسبة المئوية لقلويدات نبات السكران الأبيض

على ضوء النتائج الموضحة في الشكل 23 الممثل لتأثير الهرمونات متداخلة على النسبة المئوية لقلويدات نبات السكران الأبيض، نلاحظ أن النسبة المئوية للقلويدات تزداد بزيادة تركيز الهرمونات المتداخلة مما يدل على أن هذه الأخيرة أدت مفعولها بالزيادة في كلا من المجموعين الجذري و الخضري.

فأعلى نسبة سجلت عند المعاملة بالـ K و 2,4-D متجمعين و بأعلى التراكيز حيث بلغت 2.321% في المجموع الجذري و هي نسبة معتبر مقارنة بباقي المعاملات و الشاهد الذي ذكرت نسبته سالفا، أما المجموع الخضري فسجلت أعلى النسب 1.702% عند المعاملة دائما بالـ k و 2,4-D متداخلين و لكن بتركيز 20 و10 ملغ/ل على الترتيب و هذا دائما مقارنة بالشاهد و باقي المعاملات.

كما نلاحظ في باقي التد اخلات تراجع في النسبة المئوية للقويدات عند ارتفاع تركيز الاوكسين مقارنة بالسيتوكنين، كما هو الحال عند المعاملة بالـBAP وIAA متداخلين فقد قدرت النسبة المئوية للقلويدات عند استعمال التركيز 10ملغ/ل لكل منهما 1.531% و انخفضت إلى 0.984 % عند استعمال نفس الهرمونين لكن برفع تركيز الـ IAA إلى 20ملغ/ل بالنسبة للمجموع الجذري و عكسه في المجموع الخضري حيث ارتفعت النسبة من 0.535 % إلى 0.562 % على الترتيب.

أما فيم ا يخص التداخل بين الهرمونين BAP و 2,4-D فحدث العكس، حيث سجلت نسبة 0.942% عند استعمال الهرمونين السالفي الذكر بتركيز 10 ملغ/ل لكل منهما، و عند الرفع من تركيز الـ2,4-D إلى 20ملغ/ل ترتفع النسبة المئوية للقلويدات إلى 1.315% في المجموع الجذري، بينما في المجموع الخضري فان النسبة المئوية للقلويدات ترتفع كلما زاد تركيز الاوكسين في المعاملات المتداخلة عدا بعض المعاملات و التي يكون فيها الاوكسين أعلى تركيزا من السيتوكنين، وهذا يرجع إلى التداخل بينهما والفعل المضاد لأحدهما على الآخر عند المعالجة بتركيز مرتفع، فالتراكيز العالية للاوكسين تثبط من إنتاج القلويدات في الزراعة الخلوية لجذور نبات *H. niger* L. (Hashimoto et al.,1986).

و عليه فان تأثير الهرمونات المتداخلة يختلف من هرمون إلى آخر حسب نوع الاوكسين و السيتوكنين و التراكيز المستعملة، حيث يمكن أن تؤثر بالزيادة أو بالتراجع إذا ما قورنت المعاملات ببعضها البعض.

وفسر ذلك على أن الهرمونات وخاصة الكنيتين تزيد من امتصاص العناصر المعدنية وتراكم المواد الكربوهيدراتية (Richter, 1993)، وأن هذه المواد في بداية نموها تستهلك في تكوين المجموع الخضري، بينما في نهاية النمو تقوم بتراكم القلويدات التي تعتبر كنواتج أيض نهائية ومخزن للنيتروجين في النبات (Mann and Majie,1992) وهذا ما لاحظناه عند المعالجات التي يدخل فيها K كطرف (الشحات، 2000)، كما أن معاملة نبات *H. muticus* L. بالكنتين يؤدي إلى زيادة معتبرة في المردود القلويدي (Trease and Evans, 1996).

و قد يكون للهرمونات تأثير غير مباشر على عمل أنزيم H6H المسؤول عن تحويل الهيوسيامين إلى سكوبولامين (Rocha et al., 2002; Rafael et al., 2006).

شكل -23- تأثير الهرمونات النباتية متداخلة على تراكم قلويدات نبات السكران الأبيض

II-2- دراسة حركية القلويدات في نبات السكران الأبيض

II-2- 1- تحليل التباين

أوضحت الجدول 14 و المبينة لنتائج تحليل التباين بواسطة برنامج MINITAB لتأثير الهرمونات على النسبة المئوية لقلويدات المجموع الجذري لنبات السكران الأبيض في المراحل الأربع أن الهرمونات المستعملة كان لها تأثير معنوي واضح على النسبة المئوية الكلية في المجموع الجذري(P=0.000)، كما أن مختلف المراحل الأربعة التي حسبت فيها النسبة المئوية للقلويدات الكلية أبدت اختلافا معنويا واضحا من مرحلة إلى أخرى في نفس المجموع(P=0.000).

جدول-14- تحليل التباين لتأثير الهرمونات على النسبة المئوية لقلويدات المجموع الجذري لنبات السكران الأبيض في المراحل الأربع

	DDL	S C	M C	Test F	P
Phytohormones	24	6.0237	0.2510	7.03	0.000
Stades	3	80.5415	26.8472	751.74	0.000
Erreur	272	9.7140	0.0357		
Total	299	96.2793			

أوضحت نتائج الجدول 15 و المبينة لنتائج تحليل التباين بواسطة برنامج MINITAB لتأثير الهرمونات على النسبة المئوية لقلويدات المجموع الخضري لنبات السكران الأبيض في المراحل الأربع، أن الهرمونات المستعملة كان لها تأثير معنوي واضح على النسبة المئوية الكلية في المجموع الخضري (P=0.000)، كما أن مختلف المراحل الأربعة التي حسبت فيها النسبة المئوية للقلويدات الكلية أبدت اختلافا معنويا واضحا من مرحلة إلى أخرى في نفس المجموع(P=0.000).

جدول-15- تحليل التباين لتأثير الهرمونات على النسبة المئوية لقلويدات المجموع الخضري لنبات السكران الأبيض في المراحل الأربع

	DDL	S C	M C	Test F	P
Phytohormones	24	4.5498	0.1896	8.44	0.000
Stades	3	34.5003	11.5001	512.06	0.000
Erreur	272	6.1087	0.0225		
Total	299	45.1588			

II-2- 2- مقارنة المراحل

بينت نتائج اختبارات Tukey (برنامج MINITAB) لمقارنة المراحل التي عينت فيها النسبة المئوية للقلويدات من اجل دراسة حركية القلويدات الكلية في نبات السكران الأبيض ما يلي:

* بالنسبة للمجموع الخضري:

- ✓ عند مقارنة المرحلة الأولى بباقي المراحل الأخرى يتبن أن المرحلة الثانية ليست بينها و بين المرحلة الأولى أي فرق معنوي (P=0.1104)، بينما المرحلتين الثالثة و الرابعة أبدتا فرق معنوي واضح مقارنة بالمرحلة الأولى(P=0.000).
- ✓ عند مقارنة المرحلة الثانية بالمرحلتين الثالثة و الرابعة، بينت الاختبارات وجود فروق معنوية واضحة بين المرحلتين الثانية و الثالثة(P=0.000)، و كذلك وجود فروق معنوية بين المرحلتين الثانية و الرابعة(P=0.000).
- ✓ عند مقارنة المرحلة الثالثة بالمرحلة الرابعة، بينت الاختبارات وجود فروق معنوية واضحة بين المرحلتين(P=0.000).

* بالنسبة للمجموع الجذري:

- ✓ عند مقارنة المرحلة الأولى بباقي المراحل الأخرى يتبن وجود فرق معنوي واضح بين المرحلة الأولى و الثانية (P=0.000)، نفس الشيء بالنسبة للمرحلتين الثالثة و الرابعة اللتان أبدتا فرقا معنويا واضحا مقارنة بالمرحلة الأولى(P=0.000).
- ✓ عند مقارنة المرحلة الثانية بالمرحلتين الثالثة و الرابعة، بينت الاختبارات وجود فروق معنوية واضحة بين المرحلتين الثانية و الثالثة(P=0.000)، و كذلك وجود فروق معنوية بين المرحلتين الثانية و الرابعة(P=0.000).
- ✓ عند مقارنة المرحلة الثالثة بالمرحلة الرابعة، بينت الاختبارات وجود فروق معنوية واضحة بين المرحلتين(P=0.000).

II-2- 3- دراسة حركية قلويدات نبات السكران الأبيض باستعمال التحليل الإحصائي وفق المكونات الأساسية(une analyse en composantes principales (ACP

بين التحليل الإحصائي وفق المكونات الأساسية (ACP) تباينا بنسبة 32.15% على المحور الأفقي و تباينا نسبته 28.91% على المحور العمودي.

يوضح إسقاط المراحل على المحور التمييزي 1-2(ب) اختلاف في توزع هذه الأخيرة على دائرة الارتباط حيث نجد أن المراحل الأولى، الثانية، الثالثة و الرابعة للمجموعين الخضري و الجذري تتخذ كل منها وضعية خاصة في دائرة الارتباط كالآتي:

ترتبط المرحلة الأولى بالنسبة للمجموع الجذري ارتباطا ايجابيا و بقوة على المحور الأفقي (محور السينات)، بينما يرتبط المجموع الخضري في نفس المرحلة ارتباطا ايجابيا و لكنه ضعيف، كما أن النسبة المئوية للقلويدات الكلية في المجموع الخضري تقريبا ضعف نسبتها في المجموع الجذري (حسب طول خط الارتباط)، و هذا راجع إلى أن النبات في بداية نموه يهتم بتكوين المجموع الخضري على حساب المجموع الجذري، كما أن القلويدات التي أنتجت في بداية نمو النبات و التي كانت كميتها ضئيلة خزنت في المجموع الخضري.

بالنسبة للمرحلة الثانية، كان المجموعان مرتبطان بطريقة متعاكسة تماما، حيث أن المجموع الخضري ارتبط ارتباطا سلبيا عكس المجموع الجذري الذي ارتبط ارتباطا ايجابيا على المحورين، كما أن كمية القلويدات به كانت ضعف الموجودة بالمجموع الخضري، و هو عكس ما وجد في المرحلة الأولى التي وافقت عدم تعرض النبات لأي مؤثر خارجي، في حين أن المرحلة الثانية وافقت تطبيق السقي بنصف السعة الحقلية (الإجهاد المائي)، و يمكن تفسير ذلك على أن الإجهاد المائي يحفز تخليق القلويدات في النباتات (الشحات، 2000؛ كرامر، 1989)، كما أن قلة الماء يؤدي إلى زيادة تركيز العناصر المعدنية مثل N التي

تدخل في تركيب القلويدات التروبانية لنبات *السكران الأبيض* لينيه و الذي يعتبر حسب قطب (2002) من النباتات الحساسة للماء.

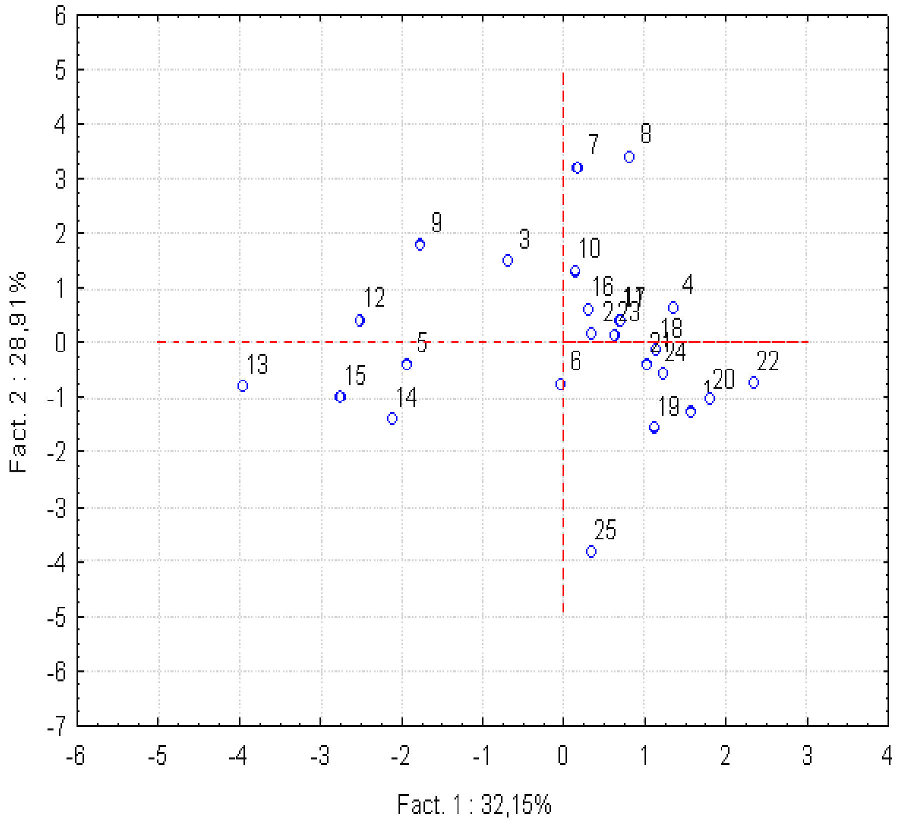
كان المجموعان الخضري و الجذري في المرحلتين الثالثة و الرابعة مرتبطين سلبيا و بقوة في المرحلة الرابعة بالنسبة للمحور الأفقي، في حين كان ارتباط المجموع الجذري في المرحلتين الثالثة و الرابعة و ارتباط المجموع الخضري في المرحلة الرابعة ايجابيا و قويا في المرحلتين الثالثة و الرابعة بالنسبة للمحور العمودي، أما المجموع الخضري في المرحلة الثالثة كان ارتباطه سلبيا و قويا على نفس المحور، حيث أن كمية القلويدات حسب طول خط الارتباط كانت متقاربة في المجموعين و في المرحلتين اللتان توافقان أياما بعد الرشتين الأولى و الثانية بالهرمونات النباتية مما يدل على أن المعاملة بالهرمونات النباتية المختلفة لها تأثيرا على إنتاج القلويدات في المجموع الجذري و التي تكون بكميات كبيرة مما أدى إلى تخزينها في المجموع الخضري لذلك وجدناها بكميات تقريبا متساوية في المجموعين كما انه يفسر تقارب موقع المرحلتين الثالثة و الرابعة (المجموع الخضري) في دائرة الارتباط.

و بمطابقة شكل إسقاط المعاملات على المحور التمييزي (1−2) على شكل إسقاط المتغيرات أي المراحل على المستوى (1−2) (شكل 24)، نجد أن تأثير الهرمونات K 10ملغ/ل و 2,4-D 20ملغ/ل و IAA 10ملغ/ل و التداخلات 10x10 K x2,4-D ملغ/ل و 10x20 Kx2,4-D ملغ/ل و IAAxK 20x20ملغ/ل و 10x20BAPx2,4-D ملغ/ل كان ايجابيا و في نفس الاتجاه على المحورين (السينات و العينات) في المرحلة الثانية بالنسبة للمجموع الجذري، عكس الهرمونات BAP 20ملغ/ل و 2,4-D10ملغ/ل و التداخلات 20x20 Kx2,4-D ملغ/ل IAAxK بالتركيزين 10x10ملغ/ل و10x20ملغ/ل، و التي كانت سلبية التأثير في المرحلتين الثانية و الثالثة بالنسبة للمجموع الخضري و هذا لان مقر إنتاج القلويدات هو الجذور لذلك ظهر تأثير الهرمونات عليها، أما الهرمونات K و 20IAA لغ/ل لكل منهما و التداخل 10x20Kx2,4-D ملغ/ل، فكان تأثيرها ايجابيا على تراكم القلويدات في المرحلتين الثالثة و الرابعة (أي بعد الرشتين الأولى و الثانية بالهرمونات النباتية) بالنسبة للمجموع الجذري و المرحلة الرابعة بالنسبة للمجموع الخضري على محور العينات و سلبيا على محور السينات و هذا راجع إلى ظهور عمل الهرمونات النباتية المستعملة من أوكسينات و سيتوكينينات و تأثيرها على تراكم القلويدات حسب حسين و آخر(2006) و أخيرا كان الشاهد و تأثير الهرمونات المتداخلة BAPx2,4-D و BAPxIAA بتركيز 10و20 ملغ/ل لكل منهما متشابها و ايجابيا على تراكم القلويدات في المجموع الجذري خلال المرحلة الأولى بالنسبة لمحور السينات أما على محور العينات فكان التأثير سلبيا و هذا دلالة على عدم وجود عمل الهرمونات النباتية لان المرحلة الأولى توافق عدم معاملة النبات بالهرمونات النباتية لذلك كان

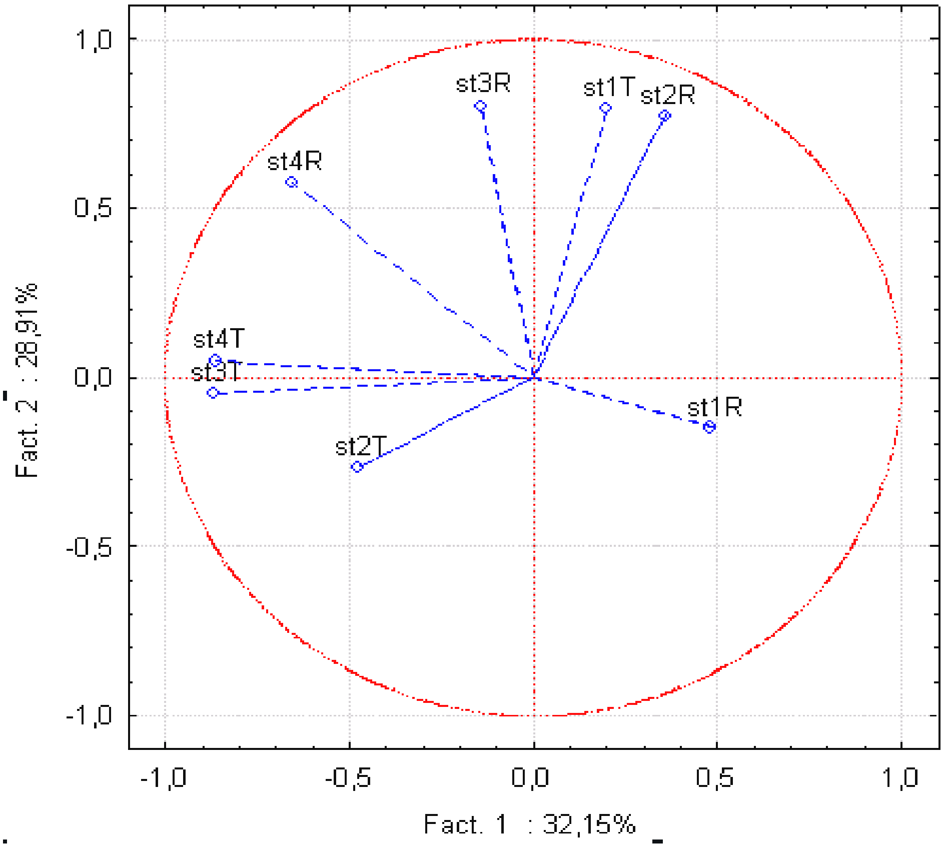
الشاهد و الهرمونات المذكورة سابقا في نفس الجهة، إضافة إلى أن جذور نباتات العائلة الباذنجانية تراكم القلويدات التروبانية مثل نبات السكران حسبOksman and Arroo (2000).

و يمكن تفسير هذه النتائج أن النبات في بداية نموه يستغل كل ما يمتصه من العناصر المعدنية في تكوين المجموع الخضري، أما في نهاية النمو فيقوم بتراكم القلويدات التي تعتبر كنواتج أيض أو تخليق نهائية و مخزن للنيتروجين في النبات، و هذا ما لوحظ من خلال دراسة حركية النسبة المئوية للقلويدات التي كانت ضعيفة جدا في بداية النمو ثم بدأت بالزيادة كلما تقدم عمر النبات (Heller, 2000).

أما اختلاف و زيادة في حركية النسبة المئوية للقلويدات بعد المعاملة بالهرمونات النباتية أي على مستوى المرحلتين الثالثة و الرابعة، يفسر على أن الاوكسين يرفع من الإنتاج الكلي للقلويدات في النباتات الطبية من خلال تنشيط إنتاج الأحماض الأمنية التي تعد طلائع القلويدات (Pelletier, 1970; Pinõl et al., 1999; Teuschler, 1965)، حيث أن 2,4-D يؤدي إلى الزيادة في النمو (Heller et al., 1995)، كما أن الهرمونات تشجع امتصاص العناصر المعدنية و خاصة الكاتيونات، و تزيد من ارتفاع معدلات النيتروجين الكلي ما يزيد من ارتفاع و زيادة تكوين القلويدات التروبانية في جذور نبات السكران الأبيض (Christen et al., 1992)، رغم أن بعض الاوكسينات تعد من مثبطات تخليق القلويدات (2,4-D) في نبات السكران الأسود (Dodds and Roberts, 1995)، ما يفسر التباين في تأثير الهرمونات المتداخلة المستعملة في المرحلتين الثالثة و الرابعة.



إسقاط المعاملات على المستوى (2−1) −ا−



إسقاط المتغيرات على المستوى (2−1) −ب−

شكل−24− الدراسة الإحصائية باستعمال المكونات الأساسية(ACP) لحركية القلويدات في نبات السكران الأبيض

II-3- التقدير النوعي لقلويدات نبات السكران الأبيض

II-3-1- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة .C.C.M للمستخلص القلويدي الخام لنبات السكران الأبيض

لوحظ من خلال النتائج المبينة في كروماتوغرام الطبقة الرقيقة أنه لم تكن هناك فروق بين الشاهد وأعلى نتائج أعطيت في تراكم القلويدات و المتمثلة في المعاملات IAA 20ملغ/ل و 2,4-DxK 20x20 ملغ/ل في عدد القلويدات المفصولة، وهذا ما يدل على أن الهرمونات لا تؤثر بالزيادة أو النقصان في عدد قلويدات نبات السكران الأبيض كما هو واضح في الجدول 16.

و بين الشكل 25 المتمثل في كروماتوغرام الطبقة الرقيقة وجود 6 بقع ذات لون برتقالي بعد رش الصفائح بكاشف دراجندروف الذي أكد وجود 6 قلويدات بكل من المجموعين الخضري والجذري.

وبمقارنة نتائج الجدول 16 المتمثلة في قيم (Rf) معامل الاستبقاء المحسوب للقلويدات المفصولة مع قيم معامل الاستبقاء للقلويدات المرجعية المستعملة والمتوفرة لدينا على نفس الكروماتوغرام، نجد أن نبات *السكران الأبيض* لينيه يحتوي على الأتروبين و السكوبولامين بقيم Rf= 0,21 و 0,56 على الترتيب؛ إضافة إلى البلادونين بقيمة Rf= 0.00 وثلاث قلويدات غير معروفة، قيم معاملات استبقائها على الترتيب: 0,16، 0,33 و 0,42 للمستخلصات الخام للمجموعين الخضري والجذري للمعالجتين 2, 4 -D × K بتركيز (20 ملغ/ل) لكل منهما و الـ IAA 20 ملغ/ل والشاهد.

كما أوضح الشكل 25 أن كل من الأتروبين و السكوبولامين يظهران بشكل بقع كبيرة الحجم (مقارنة بباقي البقع)، حيث يكون الأتروبين بشكل بيضاوي و السكوبولامين بشكل دائري، فقد قدر (Pelt et al ., 1967) نسبة الأتروبين بنبات السكران بـ 45% و السكوبولامين 50 % أما النسبة الباقية فهي باقي المشتقات القلويدية الموجودة بالنبات وعليه فإن كل من الأتروبين و السكوبولامين يعتبران قلويدان رئيسيان بالنبات هذا ما أكده كل من.Doerkschmitz et al (1994) و .Nabil et al (2009).

1-Témoin ; **2**-IAA (20) ; **3**-kx2.4-D (20x20) ; **4**-Témoin, **5**-IAA (20) ;

6-Kx2.4-D (20x20) ; **7**-atropine **;** **8**-scopolamine

1-2-3: عينات المجموع الجذري و **4-5-6**:عينات المجموع الخضري

شكل-25- كروماتوغرام الطبقة الرقيقة .C.C.M لقلويدات نبات السكران الأبيض

جدول-16- قيم معاملات الاستبقاء Rf لقلويدات نبات السكران الأبيض

العينة النباتية		قيم Rf	القلويدات المتعرف عليها	لون البقعة	العينة النباتية		قيم Rf	القلويدات المتعرف عليها	لون البقعة
المجمـوع الخضـري	الشاهـــد	0 ,00	بلادونين	برتقالي	المجمـوع الجـذري	الشاهـــد	0,00	بلادونين	برتقالي
		0,16	غير معروف	برتقالي			0,16	غير معروف	برتقالي
		0,21	الأتروبين	برتقالي			0,21	الأتروبين	برتقالي
		0,33	غير معروف	برتقالي			0,33	غير معروف	برتقالي
		0,42	غير معروف	برتقالي			0,42	غير معروف	برتقالي
		0,56	سكوبولامين	برتقالي			0,56	سكوبولامين	برتقالي
	20IAA ملغ/ل	0 ,00	بلادونين	برتقالي		20IAA ملغ/ل	0 ,00	بلادونين	برتقالي
		0,16	غير معروف	برتقالي			0,16	غير معروف	برتقالي
		0,21	الأتروبين	برتقالي			0,21	الأتروبين	برتقالي
		0,33	غير معروف	برتقالي			0,33	غير معروف	برتقالي
		0,42	غير معروف	برتقالي			0,42	غير معروف	برتقالي
		0,56	سكوبولامين	برتقالي			0,56	سكوبولامين	برتقالي
	2,4-D×K (20×20 ملغ/ل)	0,00	بلادونين	برتقالي		2,4-D×K (20×20 ملغ/ل)	0,00	بلادونين	برتقالي
		0,16	غير معروف	برتقالي			0,16	غير معروف	برتقالي
		0,21	الأتروبين	برتقالي			0,21	الأتروبين	برتقالي
		0,33	غير معروف	برتقالي			0,33	غير معروف	برتقالي
		0,42	غير معروف	برتقالي			0,42	غير معروف	برتقالي
		0,56	سكوبولامين	برتقالي			0,56	سكوبولامين	برتقالي

II-3-2- كروماتوغرافيا الطور الغازية .C.P.G للمستخلص الخام لنبات السكران الأبيض

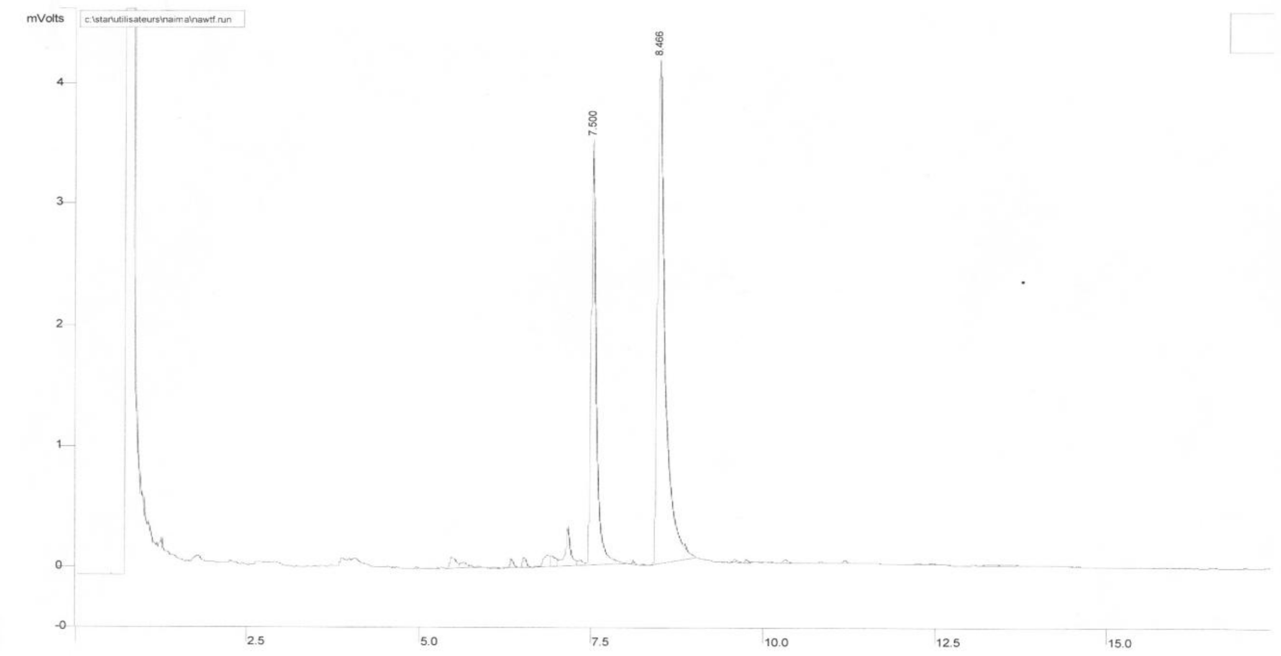
أجريت كروماتوغرافيا الطور الغازية على المستخلص الخام للمجموعين الجذري والخضري للنبات المعامل بالهرمونين 2,4-D×K (20×20ملغ/ل) و القلويدين المرجعين الأتروبين و السكوبولامين المبينة في الأشكال 26-27-28-29.

أوضح كروماتوغرام المستخلص القلويدي للمجموع الخضري المبين في الشكل 26، وجود إشارتين بارزتين بشكل حاد وإشارات أخرى تظهر بشكل آثار وتتوافق الإشارتين البارزتين مع نتائج كروماتوغرام القلويدين المرجعيين السكوبولامين و الأتروبين المتمثلين في الشكلين 27 و28، اللذان أعطيا زمن حجز قدر بــ 7,684 د و 8,435 د على الترتيب، وهي نتائج متقاربة مع النتائج المحصل عليها في كروماتوغرام المستخلص القلويدي للمجموع الخضري، إذ قدر زمن الحجز بــ 7,500د و 8,466د على الترتيب، وتبين الإشارتان البارزتان القلويدين الرئيسيين في النبات و هما الأتروبين و السكوبولامين.

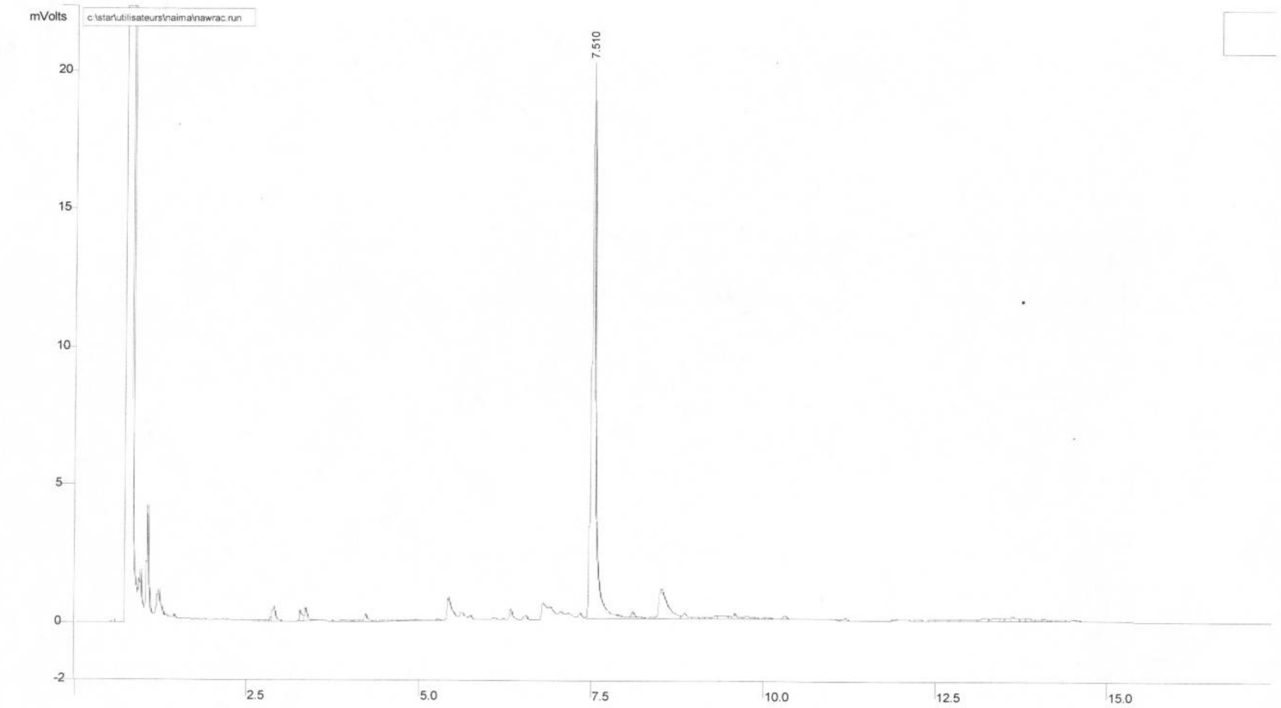
أما عن كروماتوغرام المستخلص القلويدي للمجموع الجذري المبين في الشكل 27 فإشارة الأتروبين كانت جلية بزمن حجز قدر بــ 7,510د وهو متوافق مع ما وجد في كروماتوغرام القلويدات المرجعية (الشكلين28 و29)، و يفسر ذلك على أن نبات السكران المعامل بالهرمونات ربما ارتفع به نشاط أنزيم PMT المسؤول عن إنتاج الهيوسيامين، على خلاف السكوبولامين الذي لم يلتقط له زمن حجز(الشكل28) لقلة وجوده في المستخلص الجذري(Woo et al., 1996) ، ويرجع ذلك ربما لعملية تحويل الهيوسيامين إلى سكوبولامين، والتي لا تتم مباشرة إذ أن الجذور ليست لها القدرة على تحويله إلى سكوبولامين لان التحويل يتم تحت تأثير أنزيم H6H الذي يزيد نشاطه بتنشيط الجين المسؤول عن إنتاجه حسب .Elisabet et al(2003) و .Ute et al (2009)، أو أنه ينتقل إلى المجموع الخضري لتخزينه فتكون كميته ضئيلة في الجذور، حيث قدر .Sevon et al (1998) قلويد السكوبولامين بأقل من 0.2 ملغ/ل في نبات *H. muticus* L..

فقد ذكر Basu and Chan (1998) أن أهم قلويدين في نبات السكران الأبيض هما: الأتروبين والسكوبولامين، كما أكده العديد من الباحثين مثل: .Cusidó et al (1999).

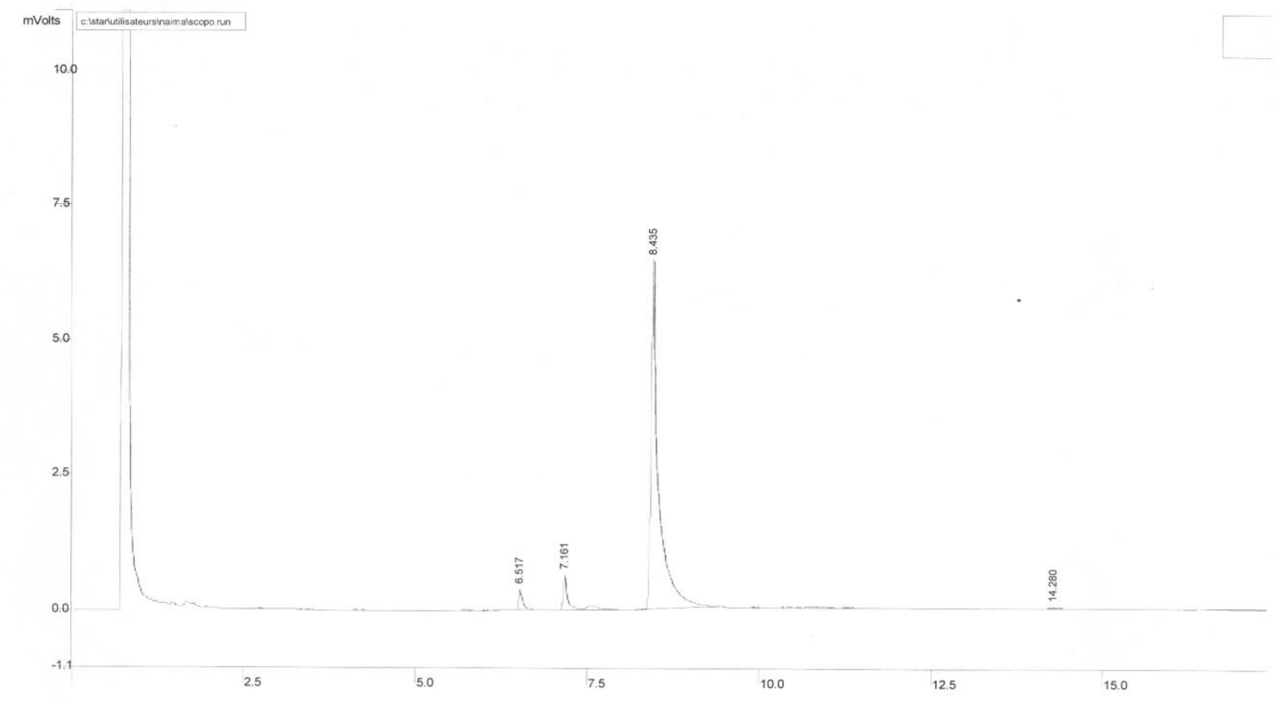
والملاحظ أيضا أن الأتروبين يظهر بزمن حجز دائما أقل من زمن خروج السكوبولامين، هذا ما يدل على أن السكوبولامين أكثر ألفة مع المادة المدمصة للعمود الكروماتوغرافي الغازي وأكثر تطايرا مع الغاز الخامل المستعمل، ما ينعكس على زمن الحجز الذي يظهر دائما أكبر من زمن حجز الأتروبين، وهو ما يتوافق مع نتائج .Eava et al (1998) الذي وجد أن الأتروبين يظهر دائما بزمن حجز أقل منه بالنسبة للسكوبولامين عند استعمال التحليل الكروماتوغرافي الأيوني لمستخلص نبات *H. muticus* L..



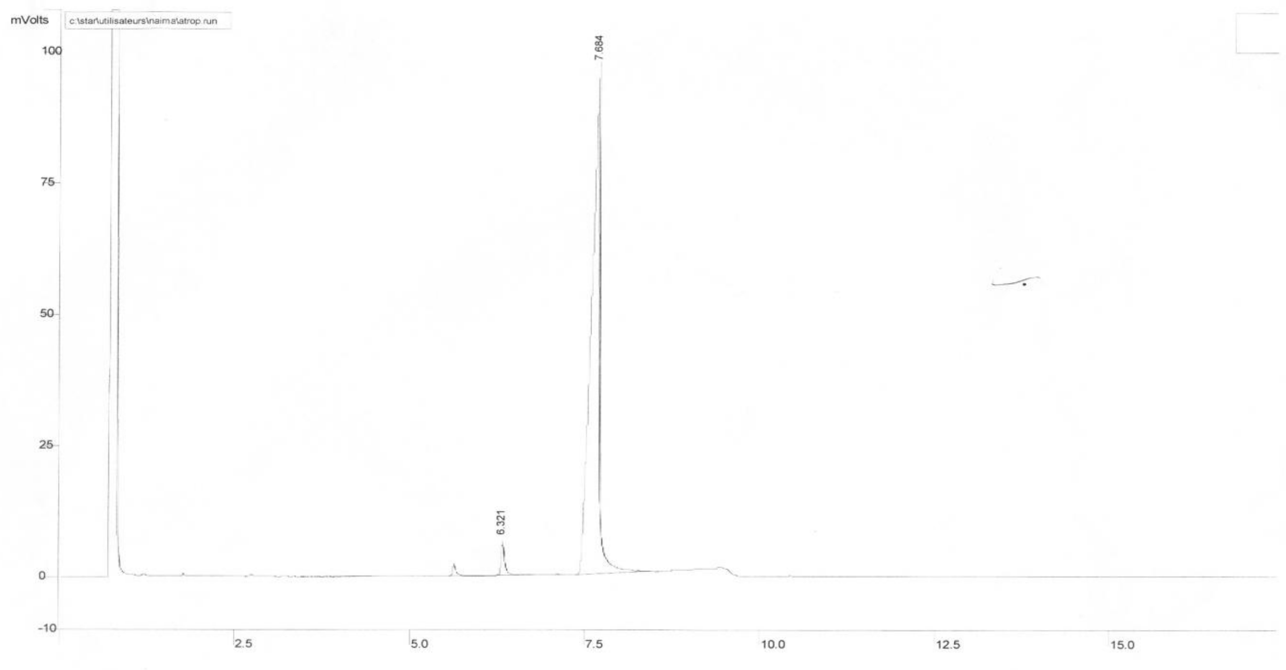
شكل-26- كروماتوغرام الطور الغازي للمستخلص القلويدي الخام الخضري لنبات السكران الأبيض



شكل-27- كروماتوغرام الطور الغازي للمستخلص القلويدي الخام الجذري لنبات السكران الأبيض



شكل-28- كروماتوغرام الطور الغازي الخاص بالسكوبولامين المرجعي



شكل-29- كروماتوغرام الطور الغازي الخاص بالاتروبين المرجعي

III- الزراعة المخبرية لنبات السكران الأبيض La culture *in vitro*

III- 1- تأثير الهرمونات و الوقت على الوزن الطازج للكالوس الناتج عن الزراعة النسيجية ل جذور نبات السكران الأبيض

أوضح تحليل التباين لنتائج الزراعة النسيجية لجذور نبات السكران الأبيض، وجود فروق معنوية واضحة لتأثير كل من الهرمونات المستعملة و الوقت و التداخل بينهما على الوزن الطازج للكالوس كما هو مبين في الجدول 17.

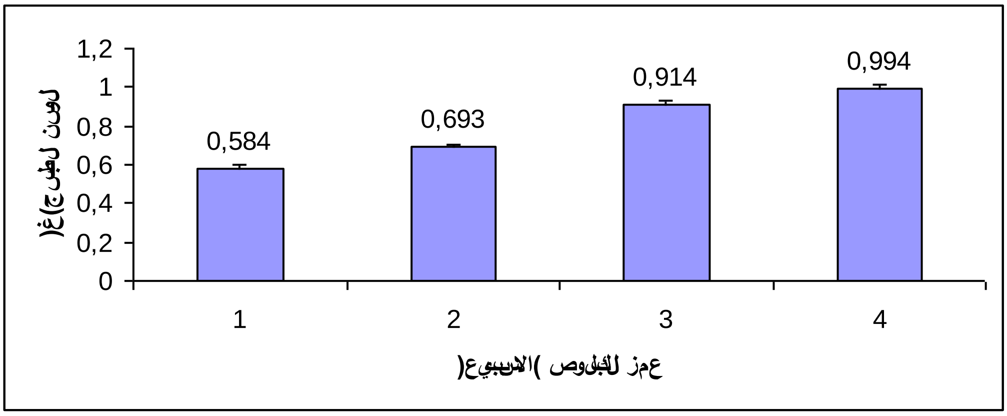
جدول-17- نتائج تحليل التباين لتأثير الهرمونات المستعملة و الوقت و التداخل بينهما على الوزن الطازج لكالوس نبات السكران الأبيض

	DDL	S C	M C	Test F	P
Phytohormones	2	3.730	14.72641	1859.316	0.0000
Temps	3	4.37270	1.86538	235.518	0.0000
Phytoh x Temps	6	3.83010	0.63835	80.596	0.0000
Erreur	24	0.19009	0.00792		

باستعمال الاختبار المقارن Scheffé تبين وجود فروق معنوية واضحة لتأثير الهرمونات المستعملة على الوزن الطازج للكالوس (p=0.000) و كذلك وجود فروق معنوية لتأثير الوقت على الوزن الطازج (p=0.000)، أما بالنسبة للتداخل بين تأثير الهرمونات و الوقت فقد أوضح نفس الاختبار وجود حالات ليست للتداخل هرمونات x الوقت فروق معنوية على الوزن الطازج للكالوس.

III-1-1- تأثير التداخل بين الـــ IAA بتركيز 2ملغ/ل و الـــK بتركيز 1 ملغ/ل على الوزن الطازج لكالوس نبات السكران الأبيض

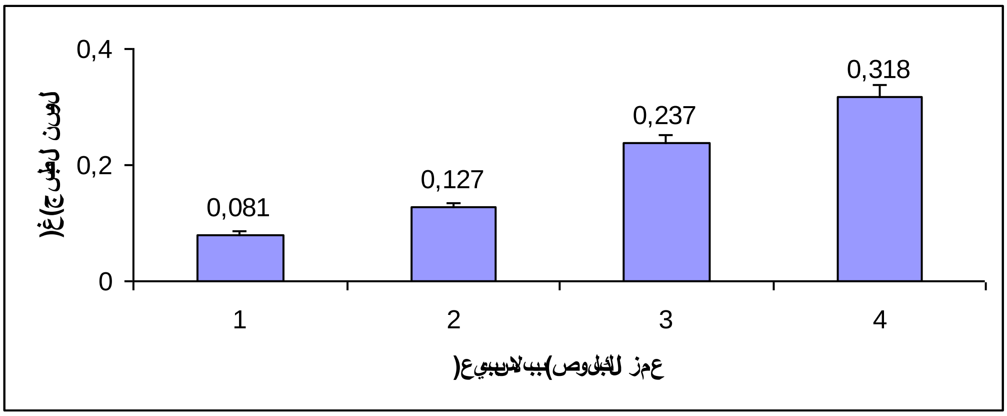
ازداد الوزن الطازج للكالوس، حسب ما وضحته النتائج المبينة في الشكل 30 بازدياد عمر الكالوس، فقد سجل الكالوس وزن يقدر بـــ 0.584غ في الأسبوع الأول و أصبح الضعف في الأسبوع الرابع حيث وصل إلى 0.994غ، و هذا راجع إلى أن الاوكسين يحفز نمو الجذور في وسط الزرع و يثبط التخليق الحيوي لقلويدات *H .niger* L. , *Atrop* , *Datura* و *Duboisia* (Hashimoto et al., 1991).



شكل -30- تأثير الــK و الــIAA على الوزن الطازج لكالوس نبات السكران الأبيض

III-1-2- تأثير هرمون الــ2,4-D بتركيز 1ملغ/ل على الوزن الطازج لكالوس نبات السكران الأبيض

لوحظ حسب النتائج المبينة في الشكل 31، انه عند استعمال هرمون الــ2,4-D بتركيز 1ملغ/ل و هو التركيز الأمثل لنمو الكالوس (El-bahr et al., 1997)، ازداد الوزن الطازج مع تقدم عمر الكالوس، حيث ارتفع من 0.081غ في الأسبوع الأول إلى 0.318غ في الأسبوع الرابع و هي زيادة معتبرة حيث كانت الزيادة بالتضاعف حوالي 04 مرات تقريبا، فقد وجد .Hashimoto et al (1986) أن كل من الاوكسين و السيتوكنين يحفزان نمو الكالوس في الزراعة النسيجية لنبات *H. niger* L.

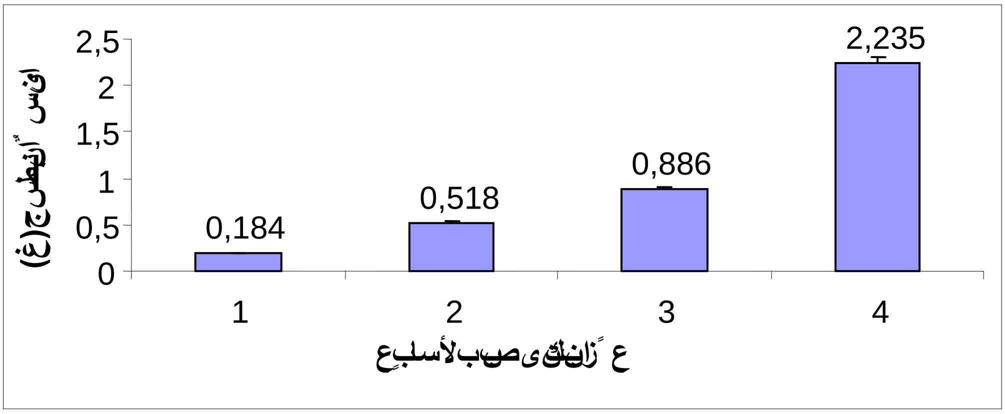


شكل -31- تأثير هرمون الــ2,4-D بتركيز 1ملغ/ل على الوزن الطازج لكالوس نبات السكران الأبيض

III-1-3- تأثير التداخل بين الــ K و الــ NAA على الوزن الطازج لكالوس نبات السكران الأبيض

بينت النتائج الموضحة في الشكل 32، أن استعمال الــNAA بتركيز 1ملغ/ل و الــ K بتركيز 0.5ملغ/ل معا، كان له أحسن تأثير، إذ بلغ الوزن الطازج 2.235غ و هي أحسن النتائج المحصل عليها في الوزن الطازج لكالوس ناتج عن زراعة نسيج جذور نبات السكران الأبيض عمره شهر واحد حيث تضاعفت الكمية بأكثر من 12مرة عن الأسبوع الأول، و هذا راجع وفقا لــ .Grewal et al (1979) إلى أن الـK

مع الـــIAA أو الـــNAA عند 10^{-5} مول/ل (M/L) يحفز نمو جيد للكالوس و تراكم معتبر للقلويدات ابتداء من الأسبوع الرابع، الخامس و السادس من الزراعة؛ كما وجد Saueruwein and Shinomura (1992) انه توجد علاقة بين الهرمونات الخارجية المضافة إلى وسط الزرع *in vitro* لنبات السكران الأبيض و تكوين الكالوس في وجود كل من الاوكسين و السيتوكنين معا لان لهما دورا تكامليا.



شكل -32- تأثير هرموني الـــ K بتركيز 0.5ملغ/ل و الـــ NAA على الوزن الطازج لكالوس نبات السكران الأبيض

III- 2- تأثير الهرمونات و الوقت على النسبة المئوية للقلويدات المتراكمة في الكالوس الناتج عن الزراعة النسيجية لجذور نبات السكران الأبيض

أوضح تحليل التباين لنتائج الزراعة النسيجية لجذور نبات السكران الأبيض بواسطة برنامج STATISTICA، وجود فروق معنوية واضحة لتأثير كل من الهرمونات المستعملة و الوقت و التداخل بينهما على النسبة المئوية للقلويدات المتراكمة في الكالوس كما هو مبين في الجدول 18.

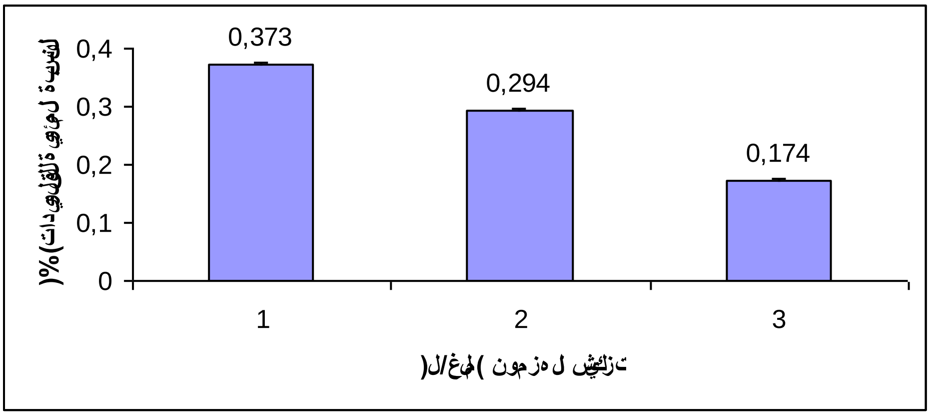
جدول-18- نتائج تحليل التباين لتأثير الهرمونات المستعملة و الوقت و التداخل بينهما على النسبة المئوية للقلويدات المتراكمة في كالوس نبات السكران الأبيض

	DDL	S C	M C	Test F	P
Phytohormones	2	0.102244	0.051122	1484.18	0.0000
Temps	3	0.24401	0.008134	236.14	0.0000
Phytoh x Temps	6	0.009802	0.001634	47.43	0.0000
Erreur	24	0.000827	0.000034		

باستعمال الاختبار المقارن Scheffé تبين وجود فروق معنوية واضحة لتأثير الهرمونات المستعملة على النسبة المئوية للقلويدات المتراكمة في الكالوس، إضافة إلى تأثير الوقت الذي أبدى هو أيضا وجود فروق معنوية واضحة عدا الأسبوع الثاني، أما بالنسبة للتداخل بين تأثير الهرمونات و الوقت فقد أوضح نفس الاختبار وجود حالات ليس للتداخل هرمونات x الوقت فروق معنوية على النسبة المئوية للقلويدات المتراكمة بالكالوس.

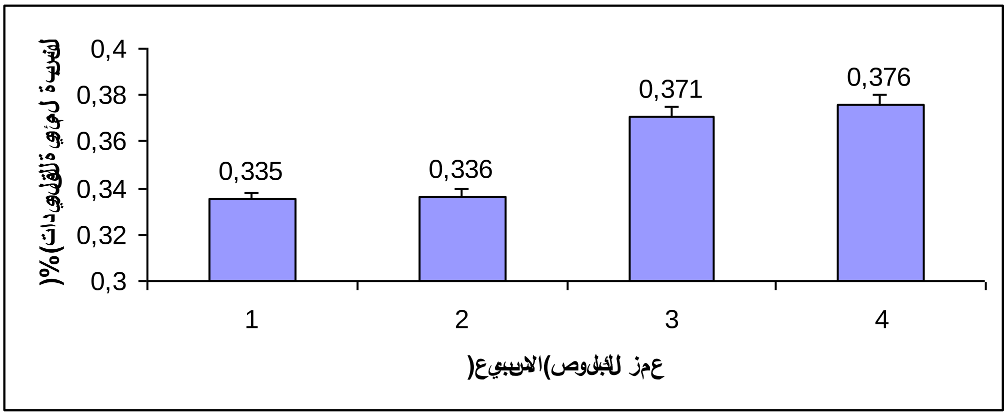
III-2-1- تأثير هرمون 2,4-D على النسبة المئوية للقلويدات في كالوس نبات السكران الأبيض

تبين النتائج المحصل عليها في الشكل 33، أن النسبة المئوية للقلويدات المتراكمة في كالوس نبات السكران الأبيض و الذي عمره شهر واحد، تتناقص مع زيادة تركيز هرمون 2,4-D، حيث سجلت أعلى نسبة لها 0.373%عند التركيز 1ملغ/ل بينما اقل نسبة 0.174% سجلت عند التركيز الأعلى 3ملغ/ل، و هو ما فندته أبحاث كل من Dodds and Roberts (1995) و Yoshimatsu et al. (1990) و اللذان أوضحا أن زيادة تركيز هرمون 2,4-D يثبط تراكم القلويدات.



شكل- 33- تأثير اختلاف تركيز هرمون 2,4-D على النسبة المئوية للقلويدات في كالوس نبات السكران الأبيض

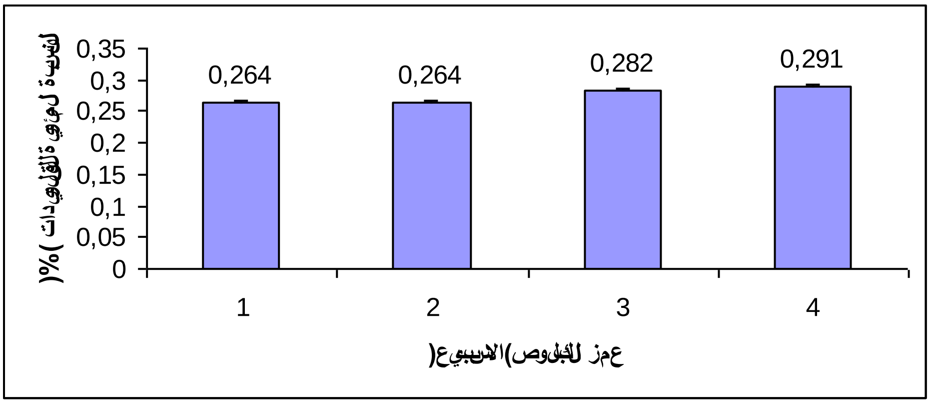
كما أن نتائج الشكل 34، توضح أن النسبة المئوية للقلويدات تزداد تدريجيا مع تقدم عمر الكالوس، حيث ارتفعت من 0.335% مسجلة في الأسبوع الأول لتصل إلى 0.376% عند بلوغه شهر من الزراعة و هي نسبة زيادة غير معتبرة، هذا لان الاوكسينات تحفز نمو جيد للكالوس عند زراعة جذور نباتات *Datura*، *Dubiosia*، *Atropa* و *H. niger* L. لكنها تثبط تخليق القلويدات فيه حسب ما أضافه Palazòn et al. (1995).



شكل – 34– تأثير 1 ملغ/ل من هرمون 2,4-D على النسبة المئوية للقلويدات في كالوس نبات السكران الأبيض

III-2-2– تأثير التداخل بين الــK والــ NAA على النسبة المئوية للقلويدات في كالوس نبات السكران الأبيض

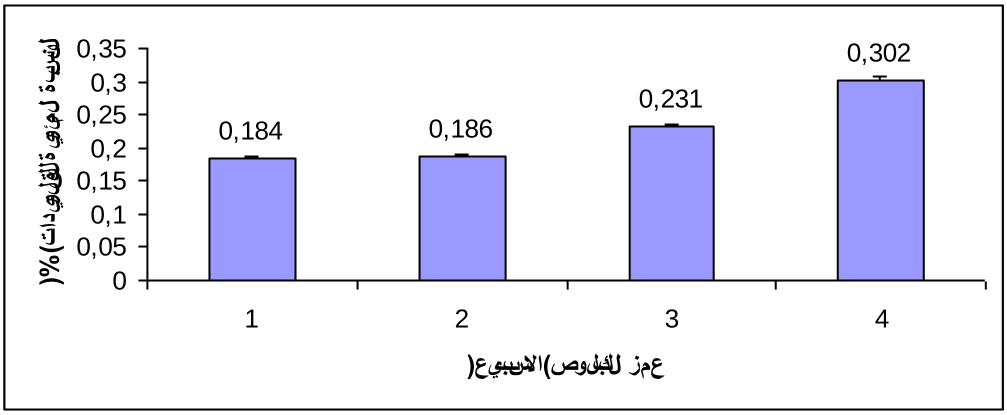
بينت النتائج المبينة في الشكل 35، انه عند استعمال الهرمونين الــNAA بتركيز 1ملغ/ل و الــ K بتركيز 0.5ملغ/ل، نلاحظ ارتفاع في النسبة المئوية للقلويدات، حيث بلغت في الأسبوعين الأول و الثاني 0.264%، بينما بعد مرور شهر من الزراعة وصلت إلى 0.291%، فقد ذكر Dodds and Roberts (1995) أن استعمال هرمون الــNAA يحفز تراكم القلويدات في نبات السكران، كما أضاف El-Bahr et al. (1997) أن استعمال 1ملغ/ل لكل من الــK و 2,4-D يعطي أعلى تراكم للقلويدات في زراعة كالوس نبات *H. muticus* L..



شكل –35– تأثير التداخل بين الــ K بتركيز 0.5ملغ/ل و الــ NAA بتركيز 1ملغ/ل على النسبة المئوية للقلويدات في كالوس نبات السكران الأبيض

III-2-3- تأثير التداخل بين الــ IAA و الــ K على النسبة المئوية للقلويدات في كالوس نبات السكران الأبيض

أوضحت النتائج المبينة في الشكل 36، وجود تأثير واضح بالزيادة على النسبة المئوية للقلويدات المتراكمة في كالوس نبات السكران الأبيض، حيث أن استعمال الهرمونين، الــ IAA بتركيز 2ملغ/ل و الــK بتركيز 1 ملغ/ل معا يؤدي إلى ارتفاع محسوس في النسبة المئوية للقلويدات و التي بلغت 0.184% في الأسبوع الأول و ارتفعت إلى 0.302% عند بلوغ شهر، و هي نسب ضئيلة مقارنة مع ما تحصل عليه عند زراعة النبات كاملا أين وصلت النسبة المئوية للقلويدات في جذور السكران عند معاملته بالــK و 2,4-D بتركيز 20ملغ/ل لكل منهما إلى 2.321%، فحسب كل من Moyano et al. (1999) و Jouhikainen et al. (1999) فان الكالوس يعطي كميات ضئيلة من القلويدات التروبانية ، بينما أكد Trease and Evans (1996) أن جنس السكران يعطي تراكم معتبر للقلويدات عند معاملته بالكينتين و أضاف Grewal et al. (1979) أن إضافة الكينتين متداخلا مع الــIAA و NAA بتركيز 10^{-5}M/L تنتج القلويدات في الزراعة المخبرية لنبات *H. muticus* ابتداء من الأسبوع الرابع، الخامس و السادس كما أن تمايز الكالوس و القدرة على إنتاج القلويدات يكون حسب المستوى الهرموني المستعمل.



شكل-36- تأثير التداخل بين الــ IAA والــ K على النسبة المئوية للقلويدات في كالوس نبات السكران الأبيض

الخـــلاصة

الخلاصـــة

نظرا للدور الهام والمكانة المهمة التي احتلتها النباتات والأعشاب الطبية في حياة الإنسان خاصة لاحتوائها على المواد الفعالة، ومن هذه الأعشاب نبات السكران الأبيض *Hyoscyamus albus* L. من العائلة الباذنجانية Solanaceae و المحتوي على القلويدات التروبانية الهامة منها الأتروبين و السكوبولامين المتواجدين به بنسبة معتبرة.

ونظرا لأهمية هذا النبات الذي ظل و لمئات السنين يستخدم كمضاد للمغص و موسع لحدقة العين و التحكم في إفرازات الجسم المختلفة، توجب علينا دراسة هذا النبات من نواحي عديدة و متكاملة، و منها دراسة مدى تأثير الهرمونات النباتية على نبات السكران الأبيض حيث أفضت نتائج الدراسة ما يلي:

1- الدراسة النباتية: التي شملت دراسة عينية و مجهرية لأعضاء النبات المختلفة ، حيث كان تأثير الهرمونات النباتية المستعملة (بالأخص المعاملة بـــ K و 2,4-D بتركيز 20ملغ/مل لكل منهما) واضحا و معنويا على كل من طول الساق، طول الجذر و مساحة الورقة ، بينما لم توثر على النبات من الناحية التشريحية، كما تبين أن نبات السكران الأبيض يختلف عن باقي الأنواع الأخرى من نفس جنسه و يتميز عنها بما يلي:

* انتشار الشعيرات الغدية و غير الغدية.
* وجود بلورات اكسلات الكالسيوم في الأنسجة البرانشيمية.
* خلايا البشرة مغطاة بالكيوتين.
* الخلايا الفلينية تتواجد في الجذر و الساق.
* الأوعية الخشبية في الساق و الجذر كبيرة و ذات تغلظ نقري بسيط أو حافي.
* وجود اللحاء الحافي في كل أجزاء النبات.

2- الدراسة الكيميائية: و تمثلت في تعيين النسبة المئوية للقلويدات الكلية بعد رش النبات بمختلف الهرمونات النباتية الاصطناعية منفردة و متزاوجة لمعرفة مدى تأثيرها على النبات، و كذا التقدير النوعي المتمثل في فصل القلويدات باستعمال الطرق الكروماتوغرافية (.C.C.M و.C.P.G)، إضافة إلى دراسة حركية القلويدات في المراحل المختلفة من حياة النبات، و أخضعت كل هذه النتائج إلى التحليل الإحصائي ببرنامج Statistica، إذ بينت النتائج ما يلي:

* ظهرت فوارق معنوية متباينة لتأثير الهرمونات النباتية المستعملة على النسبة المئوية للقلويدات الكلية للمجموعين الخضري و الجذري لنبات السكران الأبيض باستعمال تحليل التباين.

* عند استعمال اختبارات المقارنة، بين اختبار Dunett الخاص بمقارنة الشاهد مع بقية المعاملات الهرمونية انه يوجد تباين معنوي بين الشاهد و باقي المعاملات الهرمونية الأخرى، بينما بين اختبار Scheffé الخاص بمقارنة المعاملات بعضها ببعض، انه توجد حالات ليست بينها فوارق معنوية في كلا من المجموعين الخضري و الجذري، حيث أن تأثير الهرمونات النباتية كان واضحا وجليا على النسبة المئوية لقلويدات نبات السكران الأبيض من خلال الارتفاع المعتبر لها عند استعمال الهرمونات دون استثناء سيتوكنينات أو اوكسينات.

* يظهر تأثير الاوكسينات اكبر من تأثير السيتوكنينات في المجموع الجذري، إضافة إلى ارتباط الزيادة أو التأثير بارتفاع تركيز الهرمونات المستعملة أي من 0 إلى 10 إلى 20ملغ/ل.

* أما في المجموع الخضري فكان تأثير السيتوكنينات اكبر و أوضح من الاوكسينات أي عكس ما حدث في المجموع الجذري.

* بالنسبة لاستعمال الهرمونات منفردة، بلغت أعلى نسبة مئوية للقلويدات في المجموع الجذري عند المعاملة بالاوكسين IAA و بتركيز 20ملغ/ل حيث قدرت بـــ2.153% و هي تمثل تقريبا ثلاثة أضعاف النسبة المقدرة في الشاهد تقريبا الذي بلغت نسبته المئوية 0.873% و أعلى قيمة للنسبة المئوية للقلويدات سجلت في المجموع الخضري عند استعمال السيتوكنين K بتركيز 20ملغ/ل حيث كانت 1.103%، تمثل ضعفي النسبة المقدرة في الشاهد و الذي قدرت به النسبة بـــ0.505% .

* بالنسبة لاستعمال الهرمونات متزاوجة، فان أعلى نسبة للقلويدات في جميع الحالات (منفردة و متزاوجة) سجلت عند المعاملة بـــ K و 2,4-D متجمعين و بأعلى التراكيز حيث بلغت 2.321% في المجموع الجذري، أما المجموع الخضري فسجلت أعلى النسب عند المعاملة دائما بـــ k و 2,4-D متداخلين و لكن بتركيز 20 و10 ملغ/ل على الترتيب إذ بلغت 1.702%.

* تأثير الهرمونات المتداخلة يختلف من هرمون إلى آخر حسب نوع الاوكسين و السيتوكنين و التراكيز المستعملة، حيث يمكن أن تؤثر بالزيادة أو بالتراجع إذا ما قورنت المعاملات ببعضها البعض.

* بين التقدير النوعي أن نبات السكران الأبيض يحتوي على 06 قلويدات في مجموعيه الخضري و الجذري، و يعد كل من الاتروبين و السكوبولامين كقلويدين رئيسيين.

* بينت الدراسة الإحصائية لحركية القلويدات في المراحل الأربعة ما يلي:

– يوجد فرق معنوي واضح بين المراحل الأربعة من حيث تأثير الهرمونات على إنتاج القلويدات بالنبات.

– كان تأثير هرمون IAA (20ملغ/ل) واضحا و كبيرا على المجموع الجذري في المرحلة الرابعة، بينما اثر هرمون الــK (20ملغ/ل) على المجموع الجذري في المرحلة الثالثة، أما التداخل بين

الهرمونات Kx2,4-D (10x20ملغ/ل) كان تأثيره واضحا على المجموع الخضري في المرحلة الرابعة، و أخيرا أثرت الهرمونات BAP (20ملغ/ل) و Kx2,4-D 20x20ملغ/ل و 10x10IAAxKملغ/ل و IAAxK 20x10ملغ/ل على النسبة المئوية للمجموع الخضري في المرحلة الثالثة.

3- الزراعة المخبرية la culture *in vitro*: لتأكيد تأثير الهرمونات النباتية على خلايا نبات السكران الأبيض و أن التأثير يكون بزيادة تراكم القلويدات على مستوى الخلايا و ارتفاع الوزن الطازج، أجريت و لمدة شهر زراعة لنسيج جذور النبات بإضافة الهرمونات النباتية منفردة و متداخلة إلى بيئة الزرع، حيث بينت النتائج ما يلي:

* توجد فروق معنوية واضحة لتأثير كل من الهرمونات المستعملة و الوقت و التداخل بينهما على الوزن الطازج و النسبة المئوية للقلويدات المتراكمة بالكالوس.

* وصل الوزن الطازج للكالوس عند استعمال الهرمونين معا الــK بتركيز 1ملغ/ل و الــ IAA بتركيز 2ملغ/ل إلى 0.994غ، بينما النسبة المئوية للقلويدات وصلت إلى 0.302% عند بلوغ شهر من العمر.

* أفضل تركيز لهرمون الــ2,4-D هو 1ملغ/ل من اجل أحسن وزن طازج للكالوس و أحسن تراكم للقلويدات، إذ بلغ الوزن 0.318غ أما النسبة المئوية للقلويدات فقد بلغت 0.376% في عمر الشهر.

* عند استعمال الهرمونين معا الــNAA بتركيز 1ملغ/ل و الــK بتركيز 0.5ملغ/ل، بلغ الوزن الطازج للكالوس 2.235غ و هو اكبر وزن تحصل عليه لكالوس النبات عمره شهر، أما النسبة المئوية للقلويدات فبلغت 0.291%.

* تتناقص النسبة المئوية للقلويدات مع زيادة تركيز هرمون الــ2,4-D.

قــائمة المراجــع

المراجع باللغة العربية

أ

- **الحسيني م. ؛ المهدي ت. (1990).** النباتات الطبية. مكتبة ابن سينا. 227 ص ص.
- **الشحات ن. أ. ز. (1986).** النباتات والأعشاب الطبية. دار البحار بيروت. ص 67- 68.
- **الشحات ن. أ. ز. (2000).** الهرمونات النباتية والتطبيقات الزراعية. ط 2. الدار العربية للنشـــر والتوزيع. 781ص ص.

ب

- **برناردس م.؛ دونالد د. أ. (1966).** ترجمة : محمد ج. ع. ح.، محمد إ.ن.، إسماعيل ع. ن. محمد أ. أ. م. وأحمد إ. خ. مراجعة و تقويم : حسين س. فيسيولوجيا النبات. دار النهضة العربية القاهـــــرة. ص 770-773.
- **بلاك م. و. ؛ إيدلمان ج. (1980).** ترجمة عبد المطلب س. م. نمو النبات. دار الكتب للطباعة والنشـــر.ص 44-96.

ح

- **حسين ع.ا.؛ حسين ع. ا. ؛ طالب ع. ا. ؛ نجم ش. ك. (2006)** . أساسيات علم الأحياء. الطبعة العربية. دار اليازوري للنشر و التوزيع . 528 ص ص.

د

- **ديفلين ر.م.؛ ويذام ف.هـــ. (1992).** فيسيولوجيا النبات. الدار العربية للنشر والتوزيع. 922 ص ص.

ر

- **روبرت م. د.؛ فرانسيس هـــو. (1993).** ترجمة محمد م. ش.، عبد الهادي ج.، علي س. د. س.، و نادية ك. مراجعة محمد ف. ع. ح.، فيسيولوجيا النبات. الدار العربية للنشر والتوزيع . 740ص ص.

س

- **سعيد ز.م. (2001).** الكيمياء وأثرها في دراسة النباتات الطبية. مجلة علوم وتكنولوجيا –معهد الكويت للأبحاث العلمية- الكويت؛ **83**: 41-46.
- **سلامة ف. م. (1994).** مقدمة في تصنيف النباتات الزهرية. الدار الدوليـــة للنشـــر والتوزيـــع.ص 183-184.

ق

- **قبيسي ح. (1999).** معجم الأعشاب والنباتات الطبية. دار الكتب العلمية بيروت. ص 378-379.
- **قطب ف. ط.** (**1979**). النباتات الطبية وزراعتها ومكوناتها. الدار العربيـــة للكتـــاب ليبيـــا. تونس. 227 ص ص.
- **قطب ف. ط.** (**2002**). النباتات الطبية والعطرية، كيمياؤها، إنتاجها وفوائدها، الطبعة الثانية. المعارف الإسكندرية. ص 12-25.

ك

- **كرامر ب. (1989).** العلاقات المائية للنباتات. مكتبة ليزر للطباعة العراق. ص 665-739.

م

- **محمد ع. ح.** ا. **(2002).** زراعة الخلايا النباتية- تجارب في زراعة الأنسجة-. دار الفكر للطباعة و النشر. 434ص ص.
- **مرسي م.** ع. ؛ **عبد الجواد ع.** ع. **(1972).** محاصيل الحقل (أساسيات إنتاج المحاصيل). مكتبة الأنجلو المصرية. 647 ص ص.

ه

- **هيكل م. س.؛ عبد الرزاق ع. (1988).** النباتات الطبية والعطرية. منشأة المعارف بالإسكندريـــة. 509 ص ص.
- **هيكل م.س.** ؛ **عمر ع.** ل. ع. ر. (**1993**). النباتات الطبية والعطرية (كيمياؤها-انتاجها-فوائدها).منشاة المعارف، مصر. 253 ص ص.

المراجع باللغات الأجنبية:

A

- **Arroo R.R. J.; Develi A.; Meijers Van de Westerlo E.; Kemp A.K.; Croes, A.F.; Wullens G.J.. (1995).** Effects of exogenous auxin on root morphology and secondary metabolism in *Tagetes patula* hairy roots cultures. *Phys. Plant.* **93**: 233-240.
- **Arroo R.; Woolley J.; Oksman K-M.. (2007).** *Henbane*, *Belladonna*, *Datura* and *Duboisia*. *Phys. Plant.***25**: 189-204.

B

- **Balbaa S. I.; Hilal S. H. ; Zaki A. Y.. (1976).** Medicinal plant constituent. 2[ed], Printing House. Cairo. 224 pp.
- **Balbaa S.I.; Hilal S.H.; Zaki A.Y.. (1981).** Medicinal plant constituent Egyptian. Dar-El-Kotob. p 424-437.
- **Baldwin I.T.; Prestin C.A.. (1999).** The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta*. **208**: 137-145.
- **Barnum S. R.. (1996).** Plant biotechnology (An introduction). Wardsworth publishing company. London. New York. Paris Tokyo. Toronto.540
- **Basu P.**; **Chand S.. (1998)**. Embryogenesis and plant regeneration from callus cultures derived from unpollinated ovaries of *H. muticus* L..*J. Plant Biochem. Biotech* **.7**: 302-305.
- **Beauchesne S.. (1970)**. L'indole et tryptophane "regulators" de croissance en culture "in *vitro*"pour les tessus de parenchyme médullaire de Tabac normaux te anormaux. *Physiol plant*. **23**:1101.
- **Bereznegovskaya L.; Smordium V.. (1973)**. In Uprovlyanie Skorast'yu I Napravlennost'yu biosinteze Urastenit-krasnoyarsk. USSR.
- **Bernard F. P.. (2001)**. B.S.C. (hons) (Macquarie) .M.A. (Wurzburg) beans and leaves a history of the chemical therapy of Parkinsonism. University, Warburg. p 59- 60.
- **Boitel-conti M.; Laberche J-C; Lanoue A.; Ducroca C.; Sangwan-Norreel B.S. (2000).** Influence of feeding precursors on tropane alkaloid production during an abiotic stress in *Datura innoxia* transformed roots. *Plant cell, tissue and organ culture*. **60**: 131-137.
- **Bonhomme, V., D. Laurain-Matter, and M. A. Fliniaux. (2000).** Effects of the rol C gene on hairy root: Induction development and tropane alkaloid production by Atropa belladonna. J. *Natural Prod*. **63**: 1249- 1252.
- **Bourgoud F.; Gravot A.; Milesi S.; Gontier E.. (2001)**. Production of plant secondary metabolites. A historical perspective. Plant Science. **161**: 839- 851.

- **Bown D.. (1995).** Encyclopaedia of herbs and their uses .Dorling Kindersley, London. ISBN0.**22**: 7513-12031.
- **Bruneton J.. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie plantes médicales. 2ed, tec. et doc. Lavoisier .Paris. p 648-666.
- **Bruneton. J.. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. tec. et doc. . Lavoisier. Paris. p 941-986.
- **Bunk G.J.. (1997).** Hormone influences on growth and secondary metabolite production in *A. annua.* M.S. Thesis. Worcester Polytechnic Institute, Worcester, MA.. USA. P 25-31.

C

- **Canel C. M. I.; Lopes-Cardoso S.; Whitmer L.; Van-der Fits G.; Pasquali R.; Van-Der Hejden J. H. C.; Hoge ; Verpoorte R.. (1998).** Effect of over expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *C. roseus*. *Planta*.**205**: 414-419.
- **Cardillo A. B.; Giwlutti A. M.; Meng C.; Zhu H. X.. (2005).** Analysis and sequencing of H6Hm RNA last enzyme in the tropane alkaloids pathway anthers and hairy root cultures of *Brugmansia candida* (Solanaceae).Electronic Journal of Biotechnology**. 9(3):** 195-198**.**
- **Cardillo A. B.; Talou J. R.; Giuliatti A. M.. (2008).** Expression of *Brugmansia candida* Hyoscyamine 6 β-hydroxlase gene in Saccharomyces cervisiae and its potential use as biocatalyst .Microbiol Cell Factories .**7:** 17.
- **Cary A. J.; Lui W.; Howell S. H.. (1995).** Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and rypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana seedling plant physiol., **107**: 1075-1082.
- **Celma R. C.; Palazón J.; Cusidó R. M.; Piñol M. T., Keil M.. (2001).** Decreased scopolamine yield in field-grown *Duboisia* plant regenerated from hairy roots.*Planta Medica* **67**: 249-253.
- **Ceyhan T.; Kartal M.; Altun M. L.; Tulemis F.; Cevheroglu S.. (2001).** LC determination of atropine sulfate and scopolamine hydrobromide in

pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* . **25**: 399-406.

- **Christen P.; Aoki T. ; Shimomura K.. (1992).** Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyoscyamus albus* L. hairy roots transformed with *Agrobacterium* rhizogenes A4. *Plant Cell Reports*.**11**: 297-600.
- **Chevallier A.. (1996).** The encyclopedia of medicinal plants dorling Kindersley. London, ISBN. **9**:280751-303148.
- **Croteau R.; Kutchan T.M.; Lewis N.G.. (2000).** Naturel products (secondary metabolites). 612 pp
- **Cusidó R.M.; Palazón J.; Piñol M. T.; Bonfill M.; Morales C.. (1999).** *Datura metel*: *in vitro* production of tropane alkaloids. *Planta Medica* .**65:** 144-148**.**

D

- **Davies P. J.. (1990).** The plant hormones: their role in plant growth and development. **24**:477.
- **Deikman J.; Hammer P.E.. (1995).** Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. **108**: 47-57
- **De luca V.; ST Pierre B.. (2000).** The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in plant science .vol* .**5**. No4.
- **Dhar A.K.; Bhat B. K.. (1982).** Ontogenic variability in alkaloid synthesis and other morphological characters in five genotypes of *Belladona*. J. Nat Prod. **45**: 525-531
- **Dodds J.H.; Roberts W.. (1995).** Expermints in plant tissue culture. Cambridge University press.3rd edition. 189 pp
- **Doerkschmitz K.; Witte K.; Alfermann A.W.. (1994)**. Tropane alkaloid patterns in plants and hairy roots of *Hyoscyamus albus*, *Phytochemistry* **.35:** 107–111.
- **Dolan L.. (2006)**. Pointing roots in the right direction: the role of auxine transport in response to gravity. *Genes ET development* **12:** 2091-2095.

- **Dräger B.. (2006**). Tropinone reductase, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism .*Phytochemistry*. **67:** 327-337.
- **Duke J. A.; Edwards S. A.. (1985).** Medicinal plants of China .Volume 1.Reference publications INC. 658 pp.

E

- **Eava M.; Salo J.-P.; Oksman-Caldentey K-J.. (1998).** Determination of the main tropane alkaloids from transformed *Hyoscyamus muticus* plants by capillary zone electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **.16:** 717-722.
- **El-Bahr M. K.; Ghanem S. A.; El-Missiry M. M.; El-Nasr M. M.S.. (1997)**. Production of tropane alkaloids in tessue cultures of *H. muticus* L. *Fitoterapia*, **68:** 423-428.
- **Elisabet M.; Jouhikainen K.; Tammela P.; Palazón J.; Rosa M.; Cusidó R.M.; Piñol M. T.; Teeri T. H. ; Oksman-Caldentey K. M.. (2003).** Effect of *pmt* gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. J. Exp.Botany.p203-211.
- **Elisabet M.; Palazón J.; Mercedes B.; Lidia O.; Cusidó R.M.; Oksman-Caldentey K. M.; Piñol M. T.. (2007).** Biotransformation of Hyoscyamine into scopolamine in transgenic *Tobacco* cell cultures. J. Plant physiology.V.**164:** 521-524.
- **Elizabet M.; Sarah E- O'connor.. (2009).** Opportunities in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production. *Natural products from plant cell cultures*. p 292- 300.

F

- **Facchini P.J.; Bird D.A.; St-Pierre B.. (2004).** Can Arabidopsis make complex alkaloids .*Trends in Plant Science .Vol.***9** No.3.
- **Farnsworth N. R.; Akerele O.; Bingel A. S.; Soejarto D. D. ; Guo Z.. (1985).** Medical plants in therapy. *Bull. World Health Organization*. **63:** 965-981.

- **Fouché J. G.; Marquet A.; Hambuckers A.. (2001).** Les plantes médicinales, de la plante au medicaments. Sart-Tilman B7. B-4000, Liége. **3**. p 25.
- **Foukarids G. N., Muntigh G.L., Osuch E.. (1994).** Application of diode array detection for the identification of poisoning by traditional medicines. J. Ethnopharmacol, **41:** 135-146.
- **Frank P.; Rene A.. (2008). Natural** compounds as drugs. Volume1. Bikhäuser. 350 pp.
- **Fujita Y.; Hara Y.; Suga C.; Morimoto J.. (1981)**. Production of shkonin derivatives by cell suspension cultures of *Leptospermum erythrohizon*. II. A new medium for the production of shikonin derivatives. *Plant cell Rep*. **1:** 61-63.

G

- **Gaillard Y.; Cheze M.; Pépin G.. (2001).** Intoxication Humaines par les végétaux supérieurs :Revue de la littérature. Ann. Bio. Clinique. **6:** 764-765.
- **Gareth T.. (1996).** Chemistry for pharmacy and the life sciences. Printice Hall. 407 pp.
- **Garland T.; Cathrine A. B..(2001).** Toxic plants and other natural toxicants. ABE. 523 pp.
- **Gaussen H.; Leroy J. F.; Ozenda P.. (1982).** Précis de botanique. Imprimerie Hongrie. 362 pp.
- **Gautheret R. J.. (1969).** In cell differentiation and morphogenesis. Amsterdam. J.Bot. **54:** 55.
- **Giri A.; Narasu M. L.. (2000).** Transgenic hairy roots: Recent trends and applications. *Biotechnol*. Adv. **18:** 1- 22
- **Grewal S.; Koul S.; Ahuja.A. C.K.. (1979)**. *Ind.J. Exp. Biol.***17**. 558 pp.
- **Grieve A.. (1984).** Modern herbal .Penguin .ISBN0-14-046-440-9.
- **Guignard J. L.. (1996).** Biochimie végétale, Masson, Paris. 255 pp.
- **Guignard J. L.. (2000).** Biologie Végétale. © Dunod, Paris. 202 pp.

H

- **Hall R. D.. (1999).** Plant cell culture protocols: Methods in molecular biology. Humana press .Totowa. New Jersey.Vol.**111.** 260 pp**.**
- **Hashimoto T.; Yukimune Y.; Yamada Y.J.. (1986).** Tropane alkaloid production in Hyoscyamus roots cultures. *Plant Physiol*.**124:** 61-75.
- **Hashimoto T.; Hayashi A.; Amano Y.; Kohmo J.; Iwanari H.; Usuda S.; Yamada Y.. (1991).** Hyoscyamine 6β-hydroxylase ,an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis ,is localised at the pericycle of the root.Vol.**256**,No.**7:** 4643-4653.
- **Heller R.. (1985).** Physiologie végétale, développement. 3ed. Masson, Paris, p 85-135.
- **Heller R.; Esnault R.; Lance C.. (1995).** Physiologie végétale, développement. 5[ed] Dunod, Paris. **2** .p 180-183.
- **Heller R.; Esnault R. ; Lance C.. (2000).** Physiologie végétale, nutrition. 6[ed] Dunod Paris. **1**. p 760.
- **Hesse M.. (2002).** Alkaloids: nature's curse or blessing. Verlag helvetica chimica acta and wiley –VCH: Zurich. p 293.
- **Hibi N.; fujita T.; Hatano M.; Hashimoto T.; Yamada Y.. (1992).** Putrescine N-methyltransferase in cultured roots of *Hyoscyamus albus. Plant Physiol*.**100:** 826-835.
- **Hilton, M. G.; Rhodes M. J. C.. (1990).** Growth and hyoscyamine production of hairy root cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. **33:** 132- 138
- **Hodges C.C.; Raport H.. (1982).** Morphinan alkaloids in callus cultures of *Papaver somnifeurm*.J. Nat. Products., **45:** 482-485.
- **Hopkins W. G.. (2003)**. Physiologie végétale. 1[ere] édition. Bruxelles ISBN 2-7445-0022-4. p 310-311.
- **Hopkins W. G.. (1995).** Introduction to Plant physiology. Wiley & Sous, New York. 4464 pp.

I

- **Ibrahim R. K.; Edgar D.. (1976).** Phenolic synthesis in Perilla cell suspension cultures. *Phytochem*. **15:** 129-131.
- **Ibrahim A.; Abd El Kawi M.; Nower A.; Abd Motaal A.; Abd Aal A.. (2009).** Alkaloid production and organogenesis from callus of Hyoscyamus muticus L. in vitro. J. of Applied sciences research. **5** (1) **:** 82-92.
- **Ikuta A.; Sgono K.; Furuya T.. (1989)**. Alkaloids in plants regenerated from Coptis callus cultures. *Pytochem*. **14:** 1209-1210.
- **Ionkova I.; Witte L.; Alfermann A. W.. (1994)**. Spectrum of tropane alkaloids in transformed roots of Datura innoxia and Hyoscyamus xgnorffy cultivated in *vitro*. *Planta Med*.**60:** 382.
- **Iserin P.. (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales, Identification, préparations, soins. Masson, Paris. p 220-221.

J

- **Jouhikainen K.; Lindgren L.; Jokelainen T.; Hiltunen R.; Teeri T.H.; Oksman-Caldentey K-M.. (1999).** Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering. *Planta*. **208:** 545-551.

K

- **Kadi K.**; **Yahia A.. (2007)**. « Effect of phyto-hormones 2.4-D and Kinitin, applications on alkaloids accumulation in *Hyoscyamus albus* L. »Sciences et Technologie. Université Mentouri Constantine C-N°25, juin 2007. p 13-17.
- **Kamimura S.; Akutsu M.; Nishikawa M.. (1976).** Formtion of the Baines in suspension culture of *Papaver somniferum. Agr. Biol. Chem*. **40:** 915-919.
- **Kaminek M.; Mak D.W.S.; Zazimolowa E.. (1992).** Physiology and biochemistry of cytokinins in plants. S.P.B. Academic publishing la Hague, 507 pp.
- **Kang Y. M.; Min J. Y.; Moon H. S.; Karigar C. S.; Prasad D. T.; Lee C. H.; Choi M. S.. (2004).** Rapid in vitro adventitious shoot propagation of

Scopolia parviflora through rhizome cultures for enhanced production of tropane alkaloids. *Plant Cell Reports* **.23:** 128- 133

- **Khanam N.; Khoo C.; Close R.; Khan Q. G.. (2001).** Effects of cytokinin /auxin combinations on organogenesis, shoot regeneration and tropane alkaloiod production in *Duboisia Myoporoides.* Plant Cell, Tissue and Organ culture, **62** (2)**:** 125- 133.
- **Kim .Y; E.Wyslouzie, B.; J.Weathers P.. (2002).** Secondary metabolism of hairy root cultures bioreactors *in vitro cell .dev.biol-plant* .**38:** 1-10.
- **Kim B. S.; Jeong S. I.; Cho S. W.; Nikolovski J.; Mooney D. J.; Lee S. H.; Jeon O.; Kim T. W.; Lim S. H.; Hong Y. S.; Choi C. Y.; Lee Y. M.; Kim S. H.; Kim Y. H..(2003).** Tissue engineering of smooth muscle under a mechanically dynamic condition. J. Microbiol. Biotechnol. **13:** 881- 891.
- **Kitamura Y.; Shigehiro M.; Ikenaga T.. (1996)**. Tropic acid moiety of atropine may recycled in *Duboisia.Phytochemistry, Vol.**42**,* No.5**:** 1331-1334.
- **Kodja H.; Liu D.; Merillon J. M. M.; Rideau M.. (1989).** Stimulation par les cytokinines de la production d'alcaloides indoliques dans les suspensions cellulaiers de *Catharanthus roseus.* Don.C. R. Acad. Sci. Paris**. (III).** p 453-458.
- **Koul S.; Ahuja A.; Grewal S.. (1983).** Growth and alkaloid production in suspension cultures of *Hyoscyamus muticus* as influenced by various cultural parameters. *Planta Medica*, **47:** 11-16.
- **Kukreja A.K.; Mathur A.k.; Ahuja P. S.. (1975).** Tissue culture studies in *Duboisia myoporoides*; 1. Plant regeneration and colonel propagation by stem node cultures. *Planta Med*., **51:** 93-96.

L

- **Lanoue A.; Boital-Conti M.; Portais J-C; Laberche J-C; Barbotin J. N.; Christen P.; Sangwan-N .B.. (2002).** Kinetic study of littorine rearrangement in *Datura innoxia* hairy roots by ^{13}C-NMR Spectroscopy. *J.Nat.Prod*, **65:** 1131-1135.

- **Launert E.. (1981)**. Edible and medicinal plants. ISBN 0-600-37216-2.
- **Lee M. R.. (2006)**. Sol anaceae III: henbane, hags and Hawley Harvey grippen. J.R coll physician's edinb. **36:** 100-200.
- **Leete E..** (**1990).** Recent Developments in the biosynthesis of the tropane alkaloids .*Planta Medica*.**56:** 339-352.
- **Lei Z.; Bin Y.; Beibei L.; Guoyin N.; Zinan W.; Yang X.; Ruxian D.; Hanming Z.; Xiaofen S.; Wansheng C.; Kexuan T. (2007).** Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures over-expressing Putrescine *N*-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. *Planta* **.225:** 887–896.
- **Leikin J.B.; Paloucek D. F. P.; Pharm D.. (1998).** Poisoning & Toxicology Compendium With Symptoms index. Lexi-Comp. 1042 pp.
- **Lin H.; Kwok K.H.; Doran P.M.. (2003).** Development of *Linum flavum* hairy root cultures for production of coniferin. *Biotechnol. Lett*.. **521:** 521-525.
- **Loyola-Vargas V. M.; Mendez-zeel M.; Monforte-Gonzalez M.; De lourdes M. M.. (1992).** Serpentine accumulation durig greenig in normal and tumor tissue of *Catharanthus roseus .J. plant physiol*. **140:** 213-217.
- **Liu T., Zhu P.; Cheng K. D.; Meng C.; Zhu H. X.. (2005).** Molecular cloning and expression of putrexine *N*-methyltransferase from the hairy roots of Anisodus tranguticus. *Planta Med*.**. 71(10) :** 987-989.
- **Luckner M.. (1990).** Secondary metabolism in microorganisms: Plants and Animals. 3rd Edition .
- **Lüttge U.; Kluge M.; Bauer G.. (1994).** Traité fondamental de botanique. Paris, tec. et doc. p 365-385.
- **Lüttge U.; Kluge M. ; Bauer G.. (1997).** Botanique. 2ed. Lavoisier, Paris, p 490-499.

M

- **Majlat P.. (1982).** Chromatography of alkaloids, part 2: guas-liquid chromatography and high- performance Chromatography liquid**.** *J Chromatogr*.**241:** 399.
- **Majewski M.; Lazny R.. (1995).** Synthesis of tropane alkaloid via enantioselective deprotonation of tropinone.*J.Org.Chem*.**60:** 582-5830.
- **Mann J.. (1978).** Secondary metabolism. Oxford chemistry series, Clarenda press, oxford. 322 pp.
- **Mann J.. (1987).** Secondary metabolism. *Clarendon press*. 2nd ed. p 353-366.
- **Mann. J.; Magie. (1992)**. Medicine. Oxford University Press, New York. 350 pp.
- **Mann J.. (1996).** Secondary metabolism. Oxford chemistry series, *Clarenda press*, oxford. 260 -300 pp.
- **Manske R. A. F.. (1968).** The Alkaloids: chemistry and physiology. Volume X. *Academic Press*. 543 pp.
- **Manske R. A. F.; Holmes H. L.. (1950).** The Alkaloids: chemistry and physiology. Volume I. Academic Press INC. p 361-366.
- **Mantell S. H.; Matthews J. A.; McKee R. A.. (1985).** Principles of plant biotechnology .Blackwell scientific publications. Oxford, London Edinburgh,Boston paloalto Melbourne.**91:** 228.
- **Masanaru M.. (1994).** Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolite .ISBN 92-5-103391-9.Toronto Canada.
- **Mateus L.; Cherkaoui S.; Christen P.; Veuthey J-L.. (2000).** Enantioseparation of atropine by capillary electrophoresis using sulfated β-cyclodextrin: application to a plant extract. *Journal of Chromatography* A, **868:** 285-294.

- **Mateus L.; Cherkaoui S.; Christen P.; Oksman-Caldentey K- M.. (2000).** Simultaneous determination of scopolamine, hyoscyamine and littorine in plants and different hairy root clones of *hyoscyamus muticus* by miceller electrokinetic chromatography.*Phytochemistry*.**54:** 517-523.
- **Mattocks A. R.. (1986).** Chemistry and toxicology of pyrolizidine alkaloids. Academic Press. 369 pp.
- **Matsuda J.; Okabe S.; Hashimoto T.; Yamada Y.. (1998).** Molecular cloning of hioscyamine 6β-hydroxylase a 2.Oxyglutarate-dependent dioxygenase from cultured roots of *hyoscyamus niger*.*J. Biol. Chem* **.78:** 9464.
- **Mazliak P.. (1982).** Physiologie végétale, Croissance et developpement, Hermann, Paris. **2**. p 15-88.
- **Mazliak P.. (1997).** Physiologie végétale. 2 vol., Hermann, Paris.
- **Michael H.; Joanne B.; Simon G.; Elizabeth M. W.. (2004).** Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. Churchill Livingstone. 309 pp.
- **Miguel M. G.; Barroso J. G.. (1994).** Accumulation of stress metabolites in cell suspension cultures of *Hyoscyamus albus*. *Phytochemistry*.**35:** 371.
- **Miller C. O.; Skoog F.; Saltza M. H.; Von String F. F.. (1956).** Kinetin, a cell division factors from dozy ribonucleic acid. J. Amer. Chem. Soc. **77:** 1329-1334.
- **Milcent R.. (2003)**. Chemie organique Hétérocyclique .ISBN:2-86883-583-X. p 728,733-779.
- **Moyano E.; Fornalé S.; Palazón J.; Cusidó R.M.; Bonfill M.; Morales C.; Piñol M. T.. (1999).** Effect of *Agrobacterium rizogenes* T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. *Phytochemisty* **.52:** 1287-1292.
- **Murashiage T.; Skoog F.. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*.**, 15:** 473-497.

N

- **Nabil J-V; Celedonio G.; Angel G.R.; Rafael Z.. (2009).** Cloning characterization and analysis of expression prophils of a cDNA encoding a

hyoscyamine 6β-hydroxylase (H6H) from *Atropa baetica Willk. Plant physiology and biochemistry*.V.**47:** 20-25.

- **Nakagawa K.; Kangi A.; Fukui H.; Tabata M.. (1984).** Release and crystallisation of berberine in liquide medium of *Thalictrum minus* cell suspension cultures .Plant cell, Rep. **3:** 254-257.
- **Nobel B. J.; Naylar A. W.. (1968).** *Am. J. Bot*. 55.**38:** 118-119.
- **Nultsch. W.. (1998).** Botanique générale. © De boech université S.A, paris bruxelles. ISBN 2-7445-0022-4, p 460-461-465.

O

- **Oksman-Caldentey K. M.. (2007).** Tropane and nicotine alkaloid biosynthesis-novel approaches towards biotechnological production of plant-derived.Pharmaceuticals, *Curr Pharm.Biotechnol* **.8:** 203-210.
- **Oksman-Caldentey K-M; Arroo R.. (2000)**. Regulation of tropane alkaloid metabolism in plants and plant cell cultures. In: Verpoorte R.; Alfermann A.W. (eds) Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Kluwer, Dordrecht, p 253–281.
- **Oxenberg L.. (1995).** The tropane alkaloids of deadly night skade, Henbane and Mandrake. From the wiches brew. Organic Chemistry. p 1-8.
- **Oztekin-Mat A.. (1994).** Les intoxications d'origine végétal en Turquie. Ann. Pharm. Francaises. **52:** 260-265.

P

- **Palazón J.; Altabella T.; Cusidó R.M.; Ribó M., Piñol M. T.. (1995).** Growth and tropane alkaloid production in *Agrobacterium* transformed roots and derived callus of *Datura Biologia Plantarum***. 37:** 161-168.
- **Paris R. R.; Moyse H.. (1971).** Précis de matière médicinale. Libraires de l'académie de médicine 120.Boul. Saint-Germain. Paris. p 64-81.
- **Pelletier S. W.. (1970)**. Introduction: Chemistry of the alkaloids; Van Nostrand Reimhold Comapany.New York. P 1-10.

- **Pelletier S. W.. (1983).** Alkaloids: chemical and biologic perspectives. (New York: Wiley-Interscience.
- **Pelt J.M.; Younos CH.; Hayon J-C.. (1967).** Sur la constitution alcaloïdique de quelques solanasées d'Afghanistan. (Constitution des feuilles et valeur des espèces examinées : *Datura et Jusquiames*).*Annales pharmaceutiques françaises*. p 59-68.
- **Piatti t.; Boller T.; Brodelius P. E.. (1991).** Induction of ethylene biosynthesis is correlated with but not required for induction of alkaloid accumulation in elicitor-trated *Eschscholtzia* cells. *Phytochem*.**30:** 2151-2154.
- **Pierik ; Steegmans.(1975).** *Physiol.Veg*.34**:** 14**.**
- **Piñol M. T.; Palazón J.; Cusidó R.M.; Ribó M.. (1999).** Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura strmonium* hairy roots**.** *Plant Science***. 141:** 41-49.
- **Prat R.. (1994).** l' expérimentation en physiologie végétale, Herman, Paris, p 238- 261.
- **Pudersell K.. (2006).** Tropane alkaloid production and riboflavin excretion in the field and tissue cultures /press of henbane (*hyoscyamus albusL*), p 15-16.

R

- **Rafael Z.; Nabil E. J-V.; Braulia M.; Angel G.R.. (2006).** Tailoring tropane alkaloid accumulation in transgenic hairy roots of *Atropa baetica* by over-expressing the gene encoding H6H.Springer Netherlands. p 1271-1277.
- **Rahman A.U.. (1985).** Natural product chemistry. Samim printing press(Karachi). 498 pp**.**
- **Rahman A.U.; Philip W.L.Q.. (1986).** New trends in natural product chemistry.Samim printing press(Karachi). 671 pp.
- **Rathbone D.A.; Bruce N.C.. (2002).** Microbiol transformation of alkaloids. *Curr Opin Microbiol*. **5(3) :** 274-281.
- **Reinert J.; Yeoman M.M.. (1973)**. Plant cell and tissue culture. Springer-verlag.Berlin. Heidelberg. New York.

- **Richter G.. (1993).** Métabolisme de végétaux, physiologie et biochimie. Lausanne, Presses Polytechniques et universitaires Romandes. p 431-454.
- **Robert D. ; Catesson A-M.. (1990).** Biologie végétal. Vol 2 : organisation végétative. Paris, Doin. 450 pp.
- **Robert D.; Rolland J. C.. (1999).** Biologie cellulaire. Vol. 1: organisation végétative. Paris, Doin. 521 pp.
- **Robbers J. E.; Speedie M. K.; Tyler V. E.. (1996).** pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. Williams & Wilkins, A Waverly Company, Baltimore, Philadelphia, London, Paris ,Sydney,Tokyo. 149 pp.
- **Roberts M. F.; Wink M.. (1998).** Alkaloids: Biochemistry, Ecology and medicinal applications .Plenum Press, New York.
- **Rocha P.; Stemzel O.; Parr A.; Walton N.; Christon P.; Drager B.; Leech M.J.. (2002).** Functional expression of tropinone reductase 1 (*trl*)and Hyoscyamine 6-β-hydroxylase H6H from H. niger in *Nicotiana Tabacum.Plant Sci*.**162:** 905-913.
- **Roddick James G.. (1991).** The importance of the Solanaceae in medicine and drug therapy. In “Solanaceae 111: Taxon-omy, Chemistry, Evolution”. Hawkes, J., Lester, R., Nee, M. and Estrada, N., eds. Royal Botanic Gardens Kew and Linnean Society of London. London. p 7-23.

S

- **Sachan N.. (2004)**. Identification of signalling factors involved in the regulation of alkaloid metabolism in *tabacum*. Thèse of doctorat. university of Kentucky.
- **Sairam R. V.; Parani M.; Franklin G.; Lifeng Z.; Smith B.; Abed A. Berry K.; Genome R.. (2003).** Shoot meristem: An ideal explant for *Zea mays L*. transformqtion.**46:** 323-329.
- **Sandrine L.. (2004).** Diversité structurale et d'activité biologique des albumines entomotoxiques de type 1b des graines de légumineuses .Institut National des sciences appliquées de Lyon. p 28-29.

- **Satish G.. (1984).** The short text book of medical microbiology. MD 2nd edition JPB. 381 pp.
- **Sauerwein M.; Shinomura K.. (1992).** Influence of light and phytohormones of alkaloid production in transformed root cultures of *hyoscyamus albus. J. Plant Physiol.* **140:** 147-152.
- **Scalla R.. (1991).** Les herbicides, Mode d'action et principes d'utilisation. INRA. Paris, 450 pp.
- **Seibert D.. (1975).** *Plant physio*.**56:** 130.
- **Seigler D. S.. (1999).** Plant Secondary Metabolism .Kluwer Academic Publishers, New York.
- **Sevon N.; Hiltunen R.; Oksman-Caldenty K-M.. (1998).** Somaclonal variation in transformed root cultures and protoplast-derived hairy root cultures *Hyoscyamus muticus.Plant Media* .**64:** 37-41.
- **Shah R. R.; Subbaiah K. V.; Mehta A. R.. (1976).** Hormonal effect on polyphenol accumulation in Cssiea tissue cultured *in vitro*. Can. J. Bot. **54:** 1240-1245.
- **Shiio T.; Ohta A.. (1973).** Nicotine production by tobacoo calus tissue and effect of plant growth regulators .*Agr. Biol. Chem*.**37:** 1857-1964.

T

- **Tackholm V.. (1974).** Student's Flora of Egypt. Cairo University. The Cooperative Printing company.2nd Edition. p 64.
- **Taha, H. S.; Bekheet S. A.; El-Bahr M. K.; El- Habba E.. (2002).** Production of tropane alkaloids in cell cultures of Egyptian henbane (*H. muticus* L.). Annals of agriculture science Cairo, **47**(1) **:** 55-69.
- **Tayeb A. H.. (1994)**. Agronomie moderne. Hatier -aupelf- UREF. pp 134-135.
- **Teuschler E.. (1965).** *Phytochem*. **4:** 341.
- **Tolonen A.. (2003).** Analysis of secondary metabolites in plant and cell culture tissue of *Hypericum perforatum L* and *Rhodiola rosea* L. p 15-17.

- **Torres, K. C..(1989).** Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. Van Nostrand Reinhold. New York. p78-84
- **Trease G. T.; Evans W. C.. (1978).** Text Book of pharmacognosy. Bailleere.Tindall and Cox, London. 11th ed. 536 pp.
- **Trease G.; Evans W. C.. (1996).** Trease and Evans Pharmacognosy.14th Edition.WB Saunders Company Ltd.London, Philadelphia.Toronto, Sydney. Tokyo.

U

- **Ute R.; Grit R.; Qune-Katrin F.; Bettina R.; Birgit D.. (2009).** Overexpression reductase alters alkaloid composition in Atropa Belladonna root culture.Exp. Botany Oxford journals. P 645-652.

V

- **Verpoorte R.; Heijden R.D.; Schripsema Q.. (1993).** Plant cell biotechnology for the production of ajkaloids: present status prospects. Journal of Products.**56:** 186-207.
- **Verpoorte R. ; Memelink J.. (2002)**. "Engineering secondary metabolite production in plants." Current Opinion In Biotechnology. **13**(2) **:** 181-187.
- **Vilain M.. (1987).** La production végétale, les composantes de la production. Lavoisier. Paris (301-304) 416 pp.
- **Vogel A. I.. (1966).** Text Book of pratical Organic Chemistry. Longman, Green and Co. London, 3rd .Ed.

W

- **Weiner N.. (1987).** Atropine, Scopolamine, and related antimuscarinic drugs in goodman.and mailman's the pharmacological .basis of therapeutics 7eme ed. (Gilman.alfred G). The tropane alkaloids of deadly nightshade, henbane, and mandrake.Organic chemistry. 265 pp.
- **Werner T.; Oxenberg L.; Motyka V.; Strnad M.; Schmulling T.. (2001)**. Regulation of plant growth by cytokinin .PNAS .Vol.**98**.No.**18:** 10487-10492.

- **Wethrell D. F.. (1982).** Avery's plant tissue culture series: Introduction to *in vitro* progation .Avery publisher Group INC.Wayne New Jersey.
- **Woo S. H.; Prak J. M.; Yang J-W.. (1996).** Induction of branch roots by cutting method in *Hyoscyamus niger* root culture. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* , **17**(9) **:** 921-926.

X

- **Xu A., Havel J.; Linderholm K.; Husle J.. (1995).** Development and validation of an LC /MS / MS methode for the determination of L-Hyoscyamine in human plasma. J. Pharm. Biomed. Ann. **14:** 33-42.

Y

- **Yahia A.; Kevers C.; Gaspers C.; Chénieux J-C.; Rideau M.; Crèche J.. (1998).** Cytokinins and ethylene stimulate indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *catharanthus roseus* by two distinct mechanisms *.Plant Science.***133:** 9-15.
- **Yeoman M.; Macleod A.. (1977).** Tissue (callus) cultures-techniques. In plant tissue and cell culture.Oxford: Blackwell Scientific publications. 2d Ed**.** **31:** 211-214.
- **Yamada Y. ; Kuboi T.. (1976).** Signification of caffeic-o-methyl transferase in lignification of cultured tabacco cell. *Physiol*. **15:** 395-396.
- **Yoshimatsu K.; Hatano T.; Katayama M.; Marumo S.; Kamada H.; Shimomura K.. (1990).** Tropane alkaloids in the adventitious and hairy root cultures of Solanaceous plants. *Phytochemistry*. **29 :** 3525.

Z

- **Zaid R.. (2001)**. Alkaloid metabolism in root cultures and transformed root cultures of *Hyoscyamus aureus* and *Peganum harmala*. Ph. D. Thesis. Heidelberg, Germany University.240 pp.
- **Zank M. H.; El Shagi H. ; Schulte U.. (1975).** Anthraquinone production by suspentions cultures of Morinda citriifolia. Planta Media. Supp., **1:** 79-101.

- **Zayed R.; Wink M.. (2004).** Induction of Tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). *Z.Naturforsch*.**59c:** 863-867.
- **Zayed, R.; Winkb M.; El-Shamy H.. (2006).** *In vitro* organogenesis and alkaloid accumulation in *Datura innoxia*. Z. Naturforsch, **61c:** 560-564.
- **Zhao, J., Zhu W.; Hu H.. (2000).** Enhanced ajmalcine production in *C.roseus* cell cultures by combined elicitor treatment from shaker to 20 L air lift bioreactor. Biotechnology Letters, **22:** 509-514.
- **Zhang L.; DingR. ; Chai Y.; Bonfill M.; Moyano E.; Oksman-Caldentey K.; Xu. T., Pi. Y.; Wang Z.; Zhang H.; Kai G.; Liao Z.; Sun X.; Tang. K.. (2004).** Engineering tropane biosynthetic pathway in *hyoscyamus Niger* hairy root cultures. *PNAS;* **101:** 6786-6791.

الملحق

نَبتئحانذرلت الإحصبوئيتتأثٍزانهزيىبَبث ليبُبتٍت عهاهُس بتانَئ تُ رقٌقه ىُذا ث فـَـبيبثانتكل زا ّ الأبِض:

Test Dunnett ; variable %R (DONNEESPHYT)
Probabilités des Tests Post-Hoc (bilatéral)
Erreur : MC Inter = ,00002, dl = 50,000

témoin	
k10mg/l	0,000005
K20mg/l	0,000005
BAP10mg/l	0,000005
BAP20mg/l	0,000005
2,4-D10mg/l	0,000005
2,4-D20mg/l	0,000005
IAA10mg/l	0,000005
IAA20mg/l	0,000005
Kx2,4-D10x10mg/l	0,000005
Kx2,4-D10x20mg/l	0,000005
Kx2,4-D20x10mg/l	0,000005
Kx2,4-D20x20mg/l	0,000005
IAAxK10x10mg/l	0,000005
IAAxK10x20mg/l	0,000005
IAAxK20x10mg/l	0,000005
IAAxK20x20mg/l	0,000005
BAPxIAA10x10mg/l	0,000005
BAPxIAA10x20mg/l	0,000005
BAPxIAA20x10mg/l	0,000005
BAPxIAA20x20mg/l	0,000005
BAPx2,4-D10x10mg/l	0,000005
BAPx2,4-D10x20mg/l	0,000005
BAPx2,4-D20x10mg/l	0,000005
BAPx2,4-D20x20mg/l	0,000005

Test Dunnett ; variable %T (DONNEESPHYT)
Probabilités des Tests Post-Hoc (bilatéral)
Erreur : MC Inter = ,00002, dl = 50,000

témoin	
k10mg/l	0,000005
K20mg/l	0,000005
BAP10mg/l	0,000005
BAP20mg/l	0,000005
2,4-D10mg/l	0,000005
2,4-D20mg/l	0,000005
IAA10mg/l	0,000005
IAA20mg/l	0,000005
Kx2,4-D10x10mg/l	0,000005
Kx2,4-D10x20mg/l	0,000005
Kx2,4-D20x10mg/l	0,000005
Kx2,4-D20x20mg/l	0,000005
IAAxK10x10mg/l	0,000005
IAAxK10x20mg/l	0,000005
IAAxK20x10mg/l	0,000005
IAAxK20x20mg/l	0,000005

BAPxIAA10x10mg/l	0,000005
BAPxIAA10x20mg/l	0,000005
BAPxIAA20x10mg/l	0,000005
BAPxIAA20x20mg/l	0,000005
BAPx2,4-D10x10mg/l	0,000005
BAPx2,4-D10x20mg/l	0,000005
BAPx2,4-D20x10mg/l	0,000005
BAPx2,4-D20x20mg/l	0,000005

Modèle linéaire généralisé : %r; %t; ... en fonction de phytohormones

```
Facteur      Type Niveaux  Valeurs
phytohor     fixe      25  2,4-D10mg/l         2,4-D20mg/l
                           BAP10mg/l           BAP20mg/l
                           BAPx2,4-D10x10mg/l  BAPx2,4-D10x20mg/l
                           BAPx2,4-D20x10mg/l  BAPx2,4-D20x20mg/l
                           BAPxIAA10x10mg/l    BAPxIAA10x20mg/l
                           BAPxIAA20x10mg/l    BAPxIAA20x20mg/l
                           IAA10mg/l           IAA20mg/l
                           IAAxK10x10mg/l      IAAxK10x20mg/l
                           IAAxK20x10mg/l      IAAxK20x20mg/l
                           k10mg/l             K20mg/l
                           Kx2,4-D10x10mg/l    Kx2,4-D10x20mg/l
                           Kx2,4-D20x10mg/l    Kx2,4-D20x20mg/l
                           témoin

Analyse de la variance pour %r, en utilisant la SC ajustée pour les tests

Source     DL     SC séq   SC ajust   CM ajust       F      P
phytohor   24   12,01174   12,01174    0,50049 2,9E+04  0,000
Erreur     50    0,00085    0,00085    0,00002
Total      74   12,01259

Observations aberrantes pour %r

Obs        %r      Ajust       Er-T ajust Val résid  Val résid norm
 11   1,22100    1,21300          0,00238   0,00800        2,38R
 29   1,34900    1,35800          0,00238  -0,00900       -2,67R
 61   1,20100    1,21300          0,00238  -0,01200       -3,57R

R indique une observation avec une valeur résiduelle normalisée importante.

Analyse de la variance pour %t, en utilisant la SC ajustée pour les tests

Source     DL     SC séq   SC ajust   CM ajust       F      P
phytohor   24    8,21250    8,21250    0,34219 3,8E+04  0,000
Erreur     50    0,00045    0,00045    0,00001
Total      74    8,21294

Observations aberrantes pour %t

Obs        %t      Ajust       Er-T ajust Val résid  Val résid norm
  6   0,78300    0,77800          0,00173   0,00500        2,05R
 11   0,91600    0,91100          0,00173   0,00500        2,05R
 20   0,59700    0,59200          0,00173   0,00500        2,05R
 54   0,85200    0,84567          0,00173   0,00633        2,59R

R indique une observation avec une valeur résiduelle normalisée importante.
```

Statistiques descriptives : %r; %t par phytohormones

```
Variable   phytohor          N    Moyenne    Médiane Moyenne TR   EcarType
%r         2,4-D10m          3     1,6070     1,6080     1,6070     0,0056
```

	2,4-D20m	3	1,9870	1,9880	1,9870	0,0046
	BAP10mg/	3	1,3580	1,3620	1,3580	0,0078
	BAP20mg/	3	1,8910	1,8920	1,8910	0,0026
	BAPx2,4-	3	0,94267	0,94300	0,94267	0,00153
	BAPx2,4-	3	1,3153	1,3160	1,3153	0,0021
	BAPx2,4-	3	1,1040	1,1050	1,1040	0,0026
	BAPx2,4-	3	1,0870	1,0860	1,0870	0,0036
	BAPxIAA1	3	1,5310	1,5310	1,5310	0,0020
	BAPxIAA1	3	0,98400	0,98500	0,98400	0,00458
	BAPxIAA2	3	0,91100	0,90900	0,91100	0,00346
	BAPxIAA2	3	1,1570	1,1580	1,1570	0,0026
	IAA10mg/	3	1,8730	1,8720	1,8730	0,0026
	IAA20mg/	3	2,1530	2,1530	2,1530	0,0020
	IAAxK10x	3	1,0450	1,0460	1,0450	0,0036
	IAAxK10x	3	1,4310	1,4320	1,4310	0,0026
	IAAxK20x	3	1,5340	1,5350	1,5340	0,0017
	IAAxK20x	3	1,4130	1,4120	1,4130	0,0026
	k10mg/l	3	1,1150	1,1150	1,1150	0,0020
	K20mg/l	3	1,7360	1,7380	1,7360	0,0035
	Kx2,4-D1	3	1,5030	1,5050	1,5030	0,0053
	Kx2,4-D1	3	1,2130	1,2170	1,2130	0,0106
	Kx2,4-D2	3	1,8670	1,8680	1,8670	0,0046
	Kx2,4-D2	3	2,3210	2,3210	2,3210	0,0030
	témoin	3	0,87300	0,87200	0,87300	0,00265
%t	2,4-D10m	3	0,77800	0,77600	0,77800	0,00436
	2,4-D20m	3	0,91200	0,91300	0,91200	0,00265
	BAP10mg/	3	0,84567	0,84300	0,84567	0,00551
	BAP20mg/	3	0,97800	0,97800	0,97800	0,00100
	BAPx2,4-	3	0,61133	0,61200	0,61133	0,00208
	BAPx2,4-	3	0,91600	0,91700	0,91600	0,00265
	BAPx2,4-	3	0,73300	0,73400	0,73300	0,00361
	BAPx2,4-	3	0,64500	0,64700	0,64500	0,00346
	BAPxIAA1	3	0,53500	0,53600	0,53500	0,00361
	BAPxIAA1	3	0,56267	0,56300	0,56267	0,00153
	BAPxIAA2	3	0,59200	0,59100	0,59200	0,00458
	BAPxIAA2	3	0,61400	0,61400	0,61400	0,00200
	IAA10mg/	3	0,74333	0,74400	0,74333	0,00208
	IAA20mg/	3	0,91433	0,91400	0,91433	0,00058
	IAAxK10x	3	1,5470	1,5480	1,5470	0,0017
	IAAxK10x	3	1,3140	1,3130	1,3140	0,0036
	IAAxK20x	3	0,64067	0,64100	0,64067	0,00351
	IAAxK20x	3	0,67400	0,67500	0,67400	0,00265
	k10mg/l	3	0,98900	0,98800	0,98900	0,00265
	K20mg/l	3	1,1030	1,1040	1,1030	0,0017
	Kx2,4-D1	3	0,68700	0,68700	0,68700	0,00200
	Kx2,4-D1	3	0,91100	0,90900	0,91100	0,00436
	Kx2,4-D2	3	1,7020	1,7020	1,7020	0,0010
	Kx2,4-D2	3	1,6030	1,6040	1,6030	0,0017
	témoin	3	0,50500	0,50400	0,50500	0,00361

Modèle linéaire généralisé : ALCR en fonction de les phytohormone; Stade

Facteur	Type	Niveaux	Valeurs	
les phyt	fixe	25	2,4-D10mg/l	2,4-D20mg/l
			BAP10mg/l	BAP20mg/l
			BAPx2,4-D10x10mg/l	BAPx2,4-D10x20mg/l
			BAPx2,4-D20x10mg/l	BAPx2,4-D20x20mg/l
			BAPxIAA10x10mg/l	BAPxIAA10x20mg/l
			BAPxIAA20x10mg/l	BAPxIAA20x20mg/l
			IAA10mg/l	IAA20mg/l
			IAAxK10x10mg/l	IAAxK10x20mg/l

```
                         IAAxK20x10mg/l     IAAxK20x20mg/l
                         k10mg/l            K20mg/l
                         Kx2,4-D10x10mg/l   Kx2,4-D10x20mg/l
                         Kx2,4-D20x10mg/l   Kx2,4-D20x20mg/l
                         témoin
Stade   aléatoire       4  1 2 3 4
```

Analyse de la variance pour ALCR, en utilisant la SC ajustée pour les tests

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
les phyt	24	6,0237	6,0237	0,2510	7,03	0,000
Stade	3	80,5415	80,5415	26,8472	751,74	0,000
Erreur	272	9,7140	9,7140	0,0357		
Total	299	96,2793				

Modèle linéaire généralisé : ALCT en fonction de les phytohormone; Stade

```
Facteur      Type Niveaux  Valeurs
les phyt     fixe      25  2,4-D10mg/l        2,4-D20mg/l
                           BAP10mg/l          BAP20mg/l
                           BAPx2,4-D10x10mg/l BAPx2,4-D10x20mg/l
                           BAPx2,4-D20x10mg/l BAPx2,4-D20x20mg/l
                           BAPxIAA10x10mg/l   BAPxIAA10x20mg/l
                           BAPxIAA20x10mg/l   BAPxIAA20x20mg/l
                           IAA10mg/l          IAA20mg/l
                           IAAxK10x10mg/l     IAAxK10x20mg/l
                           IAAxK20x10mg/l     IAAxK20x20mg/l
                           k10mg/l            K20mg/l
                           Kx2,4-D10x10mg/l   Kx2,4-D10x20mg/l
                           Kx2,4-D20x10mg/l   Kx2,4-D20x20mg/l
                           témoin
Stade   aléatoire       4  1 2 3 4
```

Analyse de la variance pour ALCT, en utilisant la SC ajustée pour les tests

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
les phyt	24	4,5498	4,5498	0,1896	8,44	0,000
Stade	3	34,5003	34,5003	11,5001	512,06	0,000
Erreur	272	6,1087	6,1087	0,0225		
Total	299	45,1588				

Tests de simultanéité de Tukey
Variable de réponse ALCT
Toutes comparaisons deux à deux entre niveaux de Stade

Stade = 1 soustraites de :

Niveau Stade	Différence des moyennes	Er-T de la différence	Valeur de T	Valeur ajustée de P
2	0,05503	0,02447	2,249	0,1104
3	0,51427	0,02447	21,014	0,0000
4	0,82279	0,02447	33,621	0,0000

Stade = 2 soustraites de :

Niveau Stade	Différence des moyennes	Er-T de la différence	Valeur de T	Valeur ajustée de P
3	0,4592	0,02447	18,77	0,0000
4	0,7678	0,02447	31,37	0,0000

Stade = 3 soustraites de :

Niveau Stade	Différence des moyennes	Er-T de la différence	Valeur de T	Valeur ajustée de P
4	0,3085	0,02447	12,61	0,0000

```
Tests de simultanéité de Tukey
Variable de réponse ALCR
Toutes comparaisons deux à deux entre niveaux de Stade

Stade = 1 soustraites de :

Niveau        Différence         Er-T de      Valeur   Valeur ajustée
Stade        des moyennes   la différence      de T             de P
2                  0,1532         0,03086      4,963           0,0000
3                  0,7855         0,03086     25,453           0,0000
4                  1,2975         0,03086     42,045           0,0000

Stade = 2 soustraites de :

Niveau        Différence         Er-T de      Valeur   Valeur ajustée
Stade        des moyennes   la différence      de T             de P
3                  0,6323         0,03086      20,49           0,0000
4                  1,1443         0,03086      37,08           0,0000

Stade = 3 soustraites de :

Niveau        Différence         Er-T de      Valeur   Valeur ajustée
Stade        des moyennes   la différence      de T             de P
4                  0,5120         0,03086      16,59           0,0000
```

بَتئىحانذرسلت الإحصبوئِتنشراعت اخٍَبزٌت:

Test de Scheffé ; variable PFR (Feuille de donnée
Probabilités des Tests Post-Hoc
Erreur : MC Inter = ,00792, dl = 24,000

N°Cellule	PhytoH	{1} ,93117	{2} ,79658	{3} ,19100
1	NAAxK		0,004401	0,000000
2	IAAxK	0,004401		0,000000
3	2,4-D	0,000000	0,000000	

Test de Scheffé ; variable PFR (Feuille de données17)
Probabilités des Tests Post-Hoc
Erreur : MC Inter = ,00792, dl = 24,000

N°Cellule	TempsS	{1} ,25000	{2} ,44611	{3} ,67944	{4} 1,1828
1	S1		0,001225	0,000000	0,000000
2	S2	0,001225		0,000150	0,000000
3	S3	0,000000	0,000150		0,000000
4	S4	0,000000	0,000000	0,000000	

Tests Univariés de Significativité de PFR (Feuille de données17)
Paramétrisation sigma-restreint
Décomposition de l'hypothèse efficace

Effet	SC	Degré de Liberté	MC	F	p
Ord.Orig.	14,72641	1	14,72641	1859,316	0,000000
PhytoH	3,73076	2	1,86538	235,518	0,000000
TempsS	4,37270	3	1,45757	184,029	0,000000
PhytoH*TempsS	3,83010	6	0,63835	80,596	0,000000
Erreur	0,19009	24	0,00792		

Test de Scheffé ; variable PFR (Feuille de données17)
Probabilités des Tests Post-Hoc
Erreur : MC Inter = ,00792, dl = 24,000

N°Cellule	PhytoH	TempsS	{1} ,08467	{2} ,51800	{3} ,88633	{4} 2,2357	{5} ,58433	{6} ,69333	{7} ,91433	{8} ,99433	{9} ,08100	{10} ,12700	{11} ,23767	{1: ,318
1	NAAxK	S1		0,007850	0,000001	0,000000	0,001371	0,000077	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000	0,940864	0,52
2	NAAxK	S2	0,007850		0,039898	0,000000	0,999958	0,864211	0,020130	0,002545	0,007138	0,022983	0,257032	0,73
3	NAAxK	S3	0,000001	0,039898		0,000000	0,171422	0,776412	1,000000	0,995889	0,000001	0,000002	0,000027	0,00
4	NAAxK	S4	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00
5	IAAxK	S1	0,001371	0,999958	0,171422	0,000000		0,995552	0,095894	0,014275	0,001244	0,004198	0,066155	0,32
6	IAAxK	S2	0,000077	0,864211	0,776412	0,000000	0,995552		0,603910	0,174817	0,000070	0,000234	0,004386	0,03
7	IAAxK	S3	0,000000	0,020130	1,000000	0,000000	0,095894	0,603910		0,999734	0,000000	0,000001	0,000014	0,00
8	IAAxK	S4	0,000000	0,002545	0,995889	0,000000	0,014275	0,174817	0,999734		0,000000	0,000000	0,000002	0,00
9	2,4-D	S1	1,000000	0,007138	0,000001	0,000000	0,001244	0,000070	0,000000	0,000000		0,999999	0,930999	0,49
10	2,4-D	S2	1,000000	0,022983	0,000002	0,000000	0,004198	0,000234	0,000001	0,000000	0,999999		0,994941	0,78
11	2,4-D	S3	0,940864	0,257032	0,000027	0,000000	0,066155	0,004386	0,000014	0,000002	0,930999	0,994941		0,99
12	2,4-D	S4	0,521331	0,738116	0,000224	0,000000	0,327737	0,033996	0,000107	0,000014	0,497718	0,785594	0,999712	

Tests Univariés de Significativité de %Alcaloide (Feuille de données17)
Paramétrisation sigma-restreint
Décomposition de l'hypothèse efficace

Effet	SC	Degré de Liberté	MC	F	p
Ord.Orig.	2,935511	1	2,935511	85224,52	0,000000
PhytoH	0,102244	2	0,051122	1484,18	0,000000
TempsS	0,024401	3	0,008134	236,14	0,000000
PhytoH*TempsS	0,009802	6	0,001634	47,43	0,000000
Erreur	0,000827	24	0,000034		

Test de Scheffé ; variable %Alcaloide (Feuille de données17)
Probabilités des Tests Post-Hoc
Erreur : MC Inter = ,00003, dl = 24,000

N°Cellule	PhytoH	{1} ,27533	{2} ,22600	{3} ,35533
1	NAAxK		0,000000	0,00
2	IAAxK	0,000000		0,00
3	2,4-D	0,000000	0,000000	

Test de Scheffé ; variable %Alcaloide (Feuille de données17)
Probabilités des Tests Post-Hoc
Erreur : MC Inter = ,00003, dl = 24,000

N°Cellule	TempsS	{1} ,26067	{2} ,26233	{3} ,29556	{4} ,32367
1	S1		0,946860	0,000000	0,000000
2	S2	0,946860		0,000000	0,000000
3	S3	0,000000	0,000000		0,000000
4	S4	0,000000	0,000000	0,000000	

Test de Scheffé ; variable %Alcaloide (Feuille de données17)
Probabilités des Tests Post-Hoc
Erreur : MC Inter = ,00003, dl = 24,000

N°Cellule	PhytoH	TempsS	{1} ,26300	{2} ,26467	{3} ,28200	{4} ,29167	{5} ,18400	{6} ,18600	{7} ,23133	{8} ,30267	{9} ,33500	{10} ,33633	{11} ,37333	{1 ,376
1	NAAxK	S1		1,000000	0,223336	0,007577	0,000000	0,000000	0,002298	0,000093	0,000000	0,000000	0,000000	0,00
2	NAAxK	S2	1,000000		0,344759	0,014483	0,000000	0,000000	0,001175	0,000180	0,000000	0,000000	0,000000	0,00
3	NAAxK	S3	0,223336	0,344759		0,955701	0,000000	0,000000	0,000001	0,136319	0,000001	0,000000	0,000000	0,00
4	NAAxK	S4	0,007577	0,014483	0,955701		0,000000	0,000000	0,000000	0,898204	0,000022	0,000013	0,000000	0,00
5	IAAxK	S1	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		1,000000	0,000005	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00
6	IAAxK	S2	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000		0,000010	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00
7	IAAxK	S3	0,002298	0,001175	0,000001	0,000000	0,000005	0,000010		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00
8	IAAxK	S4	0,000093	0,000180	0,136319	0,898204	0,000000	0,000000	0,000000		0,001758	0,001028	0,000000	0,00
9	2,4-D	S1	0,000000	0,000000	0,000001	0,000022	0,000000	0,000000	0,000000	0,001758		1,000000	0,000158	0,00
10	2,4-D	S2	0,000000	0,000000	0,000000	0,000013	0,000000	0,000000	0,000000	0,001028	1,000000		0,000269	0,00
11	2,4-D	S3	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000158	0,000269		0,99
12	2,4-D	S4	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000042	0,000071	0,999997	

مـــلـــخـــــص

السكران الأبيض (.*Hyoscyamus albus* L) واحد من أهم نباتات العائلة الباذنجانية Solanaceae، الغني بالقلويدات التروبانية ذات الأهمية الطبية الهامة و الكبيرة.

تمت دراسة تأثير الهرمونات النباتية: K، 2,4-D، BAP و IAA منفردة و متداخلة،على محتوى النبات القلويدي. بينت الدراسة النباتية أن نبات السكران الأبيض له خصائص و مميزات مورفولوجية تأثرت بالمعاملات الهرمونية (خاصة بالـــ k و 2,4-D بتركيز 20ملغ/ل لكل منهما) و مميزات تشريحية تميزه عن باقي أنواع جنسه و التي لم تتغير عند استعمال الهرمونات النباتية. بينت الدراسة الكيميائية أن أعلى تراكم للقلويدات بالمجموع الجذري يكون بمعالجة النبات بالـــK و الـــ2,4-D متداخلين بتركيز 20ملغ/ل لكل منهما، (2.321%) و (1.702%) بالمجموع الخضري بنفس المعالجة و لكن بتركيز 20و10ملغ/ل على الترتيب. كما بينت الدراسة الكروماتوغرافية بالطبقة الرقيقة و الغازية أن النبات يحتوي على 06 قلويدات منها الاتروبين و السكوبولامين كقلويدين رئيسيين؛ و أخيرا و لتأكيد عمل الهرمونات على مستوى الخلايا و الأنسجة النباتية، بينت النتائج أن أفضل وزن طازج لكالوس ناتج عن زراعة المخبرية لنسيج جذور السكران الأبيض عمره أربع أسابيع هو 2.235غ عند إضافة هرموني الـــ NAA بتركيز 1ملغ/ل و الـــ K بتركيز 0.5ملغ/ل لوسط الزرع، في حين يعد تركيز 1ملغ/ل لهرمون 2,4-D التركيز الأمثل لتراكم اكبر للقلويدات (0.376%) في كالوس عمره أربع أسابيع.

الكلمات المفتاحية: السكران الأبيض ، هرمونات نباتية، قلويدات تروبانية، زراعة مخبرية.

Résumé

La jusquiame blanche (Hyoscyamus albus L.) est l'un des membres de la famille Solanacées, très riche en alcaloïdes tropaniques d'une grande importance thérapeutique.

L'effet promouvoir des phyto-hormones: K, 2,4-D, BAP et IAA utilisées séparément et en combinaison sur le contenu en alcaloïdes de cette plante a été étudié. Les résultats de l'étude botanique de la plante ont montré que les caractéristiques morphologiques ont étés influencés par le traitement avec les phytohormones (surtout K x 2,4-D 20x20mg/l), car ils n'ont changé en rien les caractéristiques anatomique, caractérisant cette espèce des autre appartenant au même genre. D'autre part, l'analyse chimique a montré un effet promouvoir maximum sur le contenu en alcaloïdes (2.321% dans les racines) notamment par le traitement combiné (K x 2,4-D) à la dose de 20mg/l pour chacun, et (1.702% dans pousses) par le même traitement mais à la dose de 20mg/l pour la K et 10mg/l pour le 2,4-D. Bien que six (06) alcaloïdes fussent identifiés par l'analyse chromatographique (C.C.M. et C.P.G.) effectue sur l'extrait alcaloïdique de la plante, l'atropine et la scopolamine constituent les types majeurs. Enfin l'effet promouvoir des phytohormones à l'échelle cellulaire et tissulaire fut vérifié par l'étude de la croissance des cals obtenus par la culture *in vitro* des racines de *H. albus*. Les résultats montrent un effet maximum après 4 semaines de croissance (poids frais de 2.235g) dans le cas ou le milieu de culture contient NAA (1mg/l) et K (0.5mg/l), car la meilleure dose induisant le maximum d'accumulation des alcaloïdes (0.376%) a été bien celle de 1mg/l de 2,4-D.

Mots clés : *Hyoscyamus albus L.*, phytohormones, alcaloïde tropanique, culture *in vitro*.

Abstract

White henbane (*Hyoscyamus albus L.*) is one of the members of Solanaceae family rich mainly in tropan alkaloids witch have a great therapeutic importance.

The promoting effect of phytohormones (k, 2,4-D, BAP and IAA) used separately and in combainison on the plant alkaloids content has been studied. The results of botanical study showed that the plant has morphological and anatomical properties and characters to identify it from hyoscyamus species, when treatment with phytohormones (in particular k x 2,4-D 20x20mg/l) affect on morphological properties. On the other hand, chemical analysis showed a promoting effect on the maximum content of alkaloids (2.321% in root) especially the combined treatment (K x 2,4-D) at 20mg/l for each and (1.702% in shoot) also with K (20mg/l) but 2,4-D (10mg/l). Although six (06) alkaloids have been identified by chromatographic analysis (T.L.C. and G.C.) of plant extracts, when the atropine and scopolamine were the major. Finally the effect of promoting phytohormones at the cellular and tissue levels has been verified by studying the growth of callus obtained by *in vitro* culture of root of *H. albus*. The results showed that the maximum effect was recorded after 4 weeks of growth (2.235g fresh weight of callus) on media containing NAA (1mg/l) and K (0.5 mg/l), but the best dose inducing the maximum accumulation of alkaloids (0.376%) was 1mg/l of 2,4-D.

Key words: *Hyoscyamus albus* L., phytohormones, tropan alkaloids, *in vitro* culture.