



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

الأكتار ألدقيق وأستحثاث ألكالس والكشف عن مركب
Physalin في نبات كرز الأرض *Physalis angulata* L.

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى وهي جزء من
متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

سارة مطشر حاتم

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

مثنى محمد إبراهيم

تشرين الاول 2016 م

محرم 1438 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَبَشِّرِ الَّذِينَ آمَنُوا وَعَمِلُوا الصَّالِحَاتِ أَنَّ لَهُمْ جَنَّاتٍ
تَجْرِي مِنْ تَحْتِهَا الْأَنْهَارُ كُلَّمَا رُزِقُوا مِنْهَا مِنْ ثَمَرَةٍ رِزْقًا
قَالُوا هَذَا الَّذِي رُزِقْنَا مِنْ قَبْلُ وَأُتُوا بِهِ مُتَشَابِهًا وَلَهُمْ فِيهَا
أَزْوَاجٌ مُطَهَّرَةٌ وَهُمْ فِيهَا خَالِدُونَ (25)

صدق الله العظيم

سورة البقرة الآية (25)

الشكر والتقدير

في البداية الشكر والحمد لله جل □ في علاه فالإله ينسب الفضل كله في إكمال هذا العمل وبعد فالحمد والشكر لله. أتقدم بوافر شكري وتقديري إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة لإتاحتهم الفرصة لأكمال دراستي العليا وماقدموه لي من العون والمساعدة.

وأتوجه إلى أستاذي الدكتور مثنى محمد إبراهيم المهداوي – المشرف على رسالتي – بالشكر والتقدير الذي لم تفيه أي كلمات حقاً فلولا دعمه الكبير ماتم هذا العمل، فجزاه الله تعالى ما هو أهله وبارك الله له في وقته وعمره وعملة وإلى مزيد من التميز والرقى والنجاح إن شاء الله .

من أي أبواب الثناء أدخل لمن غمرتني بحبها سأشكر ماحييت أمني انتي من تجرعتي كأس الشقاء مرا ليسقيني رحيق السعادة .. إلى من ضحت بالكثير من أجل أن أحياء.. ومهما وصفتك فلن أستطيع أن أكمل ليس تهاوناً ولكن شيء أعمق من ذلك.

شكري وتقديري إلى أبي الذي بذل كل ما بوسعه لأجلنا سنة تلو السنة ليرانا اليوم أمامه بعد أن كبرنا مهما شكرت فإنني أشعر بالقصور تجاهك أدامك الله ذخراً وعزاً لنا.

وأقدم بجزيل الشكر والتقدير إلى اخوتي (مها ومصطفى و بكر وعبد الرحمن وهبه) لما لهم من فضل ومسانده لي طيله مدة دراستي فقد غمروني بحبهم ومساعدتهم... لكم مني كل الحب والمودة.

شكري وتقديري إلى رفاق دربي والسحابه المعطاء إلى جميع صديقاتي وزملائي اللذين تحملوا الكثير من أجلي واسهموا في مساعدتي بدون مقابل : (هبه محمود أحمد ، نور عويد عودة ، بتول محمد علوان، نوفل محمد ، حيدر حاتم والشكر الموصول إلى عمي مروان حاتم علوان)

ومن باب الوفاء والإخلاص والاحترام أتقدم بشكري إلى من قدموا لي معروفا بكل نفس راقية وطيبة أسأتذتي: (ألدكتور محمد عبد الدايم صالح و الاستاذ قيس عباس حسين)

سارة مطشر حاتم



إلى من أضاء بعلمه عقل غيره .. صاحب الاسراء والمعراج ..إلى من كلله الله بالخلق العظيم
امام المرسلين.

(النبي محمد عليه الصلاة والسلام)

منك تعلمنا أن للنجاح قيمه ومعنى ..ومنك تعلمنا كيف يكون التفاني والإخلاص في العمل ..
ومنك أمنا ان لامستحيل في سبيل الإبداع والرقى "أستاذي الفاضل "

إلى من اشتروا لنا ليلاً أمنا بدمائهم الطاهرة ..

إلى أرواح في السماء ترزق عند الله " شهداء العراق "

إلى شمسا أذابت جمود قلبي وَفَجَرَتْ □ ينابيع الأمل ...ياقمرأ أضاء ظلام عقلي وأضاء لي
طريقا في الحياة ...إلى من غرست حب الله في فوادي " أمي الغالية "

إلى قدوتي الأولى ونبراسي الذي ينير دربي ... إلى من أعطاني ولم يزل يعطيني بلا حدود
...إلى من رفعت رأسي عاليا افتخارا به ...ادعوا الله ان يبيقك ذخرا لنا ولا يحرمانا حبك
وحنانك " أبي العزيز "

إلى الابتسامة اللطيفة التي شقت بجمال نورها ظلام قلبي فمسحت مابه من هموم ... إلى تلك
اللمسة الحانية التي فَجَرَتْ □ في قلبي ينبوعا من الأمل في هذه الحياة القاسية... " أخواني "

إليكم لروعة أخلاقكم وتميزكم الملحوظ وحضوركم الراقى والابتسامة الدائمة.... " زملائي "

الباحثة

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المشرف

نشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (الأكثر ألدقيق وأستحاث ألكالس والكشف عن مركب Physalin في نبات *Physalis angulata* L. التي قدمتها الطالبة ساره مطشر حاتم قد جرت تحت إشرافنا في كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى، وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة.

التوقيع:

المشرف : أ.م. د مثنى محمد ابراهيم

التاريخ : 22 / 9 / 2016 م

إقرار رئيس قسم علوم الحياة

بناء على التوصيات المتوافرة أرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع:

الاسم: أ.م. د عمار أحمد سلطان

رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : / / 2017 م

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (الأكتار الدقيق وأستحثاث ألكالس والكشف عن مركب Physalin في نبات *Physalis angulata* L.) التي قدمتها طالبة الماجستير سارة مطشر حاتم روجعت لغوياً وصُحِّحَ ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية، وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع :

الاسم: أ. د اياد عبد الودود عثمان الحمداني

التاريخ : / / 2017

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار الخبير العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (الأكتار الدقيق وأستحثات ألكالس والكشف عن مركب Physalin في نبات *Physalis angulata* L.) التي قدمتها طالبة الماجستير ساره مطشر حاتم قسم علوم الحياة قد تم مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع :

الاسم : أ. م. د. مصطفى طه محمد

التاريخ : / / 2017 م

اقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة، بأننا اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ (الأكتار الدقيق وأستحثاث ألكالس والكشف عن مركب Physalin في نبات *Physalis angulata* L.)، وقد ناقشنا الطالبة ساره مطشر حاتم في محتوياتها وفيما لها علاقة بها، ونعتقد بأنها جديرة بالقبول لنيل درجة ماجستير في علوم الحياة بتقدير (أمتياز).

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ. د. كاظم محمد أبراهيم

المرتبة العلمية :

التاريخ : / / 2017

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. أياد عاصي عبيد

المرتبة العلمية :

التاريخ : / / 2016

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.م. تلفان عناد احمد

المرتبة العلمية :

التاريخ : / / 2016

عضواً مشرفاً

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. مثنى محمد أبراهيم

المرتبة العلمية:

التاريخ : / / 2016

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع :

الاسم :

المرتبة العلمية :

الخلاصة

أُجريت الدراسة الحالية في مختبر زراعة الخلايا والأنسجة النباتية التابع لقسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصرفة بجامعة ديالى خلال المدة من تشرين الأول/2015 ولغاية أيار/2016، بهدف دراسة الأكتار النسيجي لنبات كرز الأرض *Physalis angulata* L. ذي الأهمية الطبية والصيدلانية، من خلال تضاعف أطراف الأفرع والعقد بعد زراعتها على وسط موراشيغ وسكوج (MS) المزود بتركيز مختلفة من Benzyl adenine (BA) و Kinetin (Kin)، ومن ثمة تجذير الأفرع الناتجة بعد التضاعف على نفس الوسط المزود بتركيز مختلفة من 3-Indole Butyric Acid (IBA) بالإضافة إلى استحثاث الكالس من زراعة السيقان تحت الفلقية لبادرات معقمة ناتجة من الزراعة النسيجية على وسط MS المزود بتركيز مختلفة من 2,4-Dichloro phenoxy Acetic Acid (2,4-D) ومن ثم تقدير مركب الفايسلين A و الفايسلين B في الكالس الناتج بعد 30 و 45 و 60 يوماً من الزراعة وتشير النتائج إلى الآتي :

1- أفضل تضاعف لأطراف الأفرع والبالغ 6.0 فرع. جزء¹⁻ نباتي تم الحصول عليه من زراعة العقد المفردة الأفرع على وسط MS المزود بـ 1.5 ملغم. لتر¹⁻ BA وذلك بعد ثمانية أسابيع من الزراعة . وان أفضل تضاعف من العقد المفردة بلغ 10.0 فرع. جزء¹⁻ نباتي.

2- تراوحت نسبة التجذير للأفرع الناتجة من التضاعف بين 60-100 % وسجلت الأفرع أعلى معدل لعدد الجذور بلغ 16.0 جذر. فرع¹⁻ من زراعتها على وسط التجذير MS المزود بـ 0.2 ملغم. لتر¹⁻ IBA في حين سجلت أعلى القيم المعنوية لصفة معدل طول الجذر والبالغة 9.8 سم في الأفرع المزروعة على وسط التجذير MS المزود بـ 0.1 ملغم. لتر¹⁻ IBA.

3- أفضل وزن طري للكالس بلغ 4.65 غم وزن طري تم الحصول عليه من زراعة أجزاء السيقان تحت الفلقية على وسط MS المزود 0.3 ملغم. لتر⁻¹ 2,4-D وذلك بعد أربعة أسابيع من الزراعة.

4- أظهرت البيانات وجود كل من مركب فايسلين A وفايسلين B في مزارع الكالس بدلالة قراءات الكروماتوغرافيا السائل العالي الكفاءة High Performance Liquid Chromatography والمقارنة مع العينة القياسية، وعموماً تراوحت نسبة تواجد فايسلين A وفايسلين B بين 7.60-18.77% و 12.25-250% على التوالي، في عينات الكالس للمراحل العمرية 30 و 45 و 60 يوماً. و إن أعلى وجود من فايسلين A وفايسلين B كان 18.77 و 250% على التوالي، تم الحصول عليها من الكالس في المرحلة العمرية 45 يوماً، وان نسبة تواجد المركبين ولجميع المراحل العمرية للكالس قد سجلت قيماً أعلى من نسب تواجد المركبين في اوراق النبات الطبيعية عند مرحلة الازهار. وعموماً تؤكد هذه الزيادات في مستويات الفايسلين A والفايسلين B في أنسجة الكالس إلى أن هذا قد يكون مؤشراً إلى أن المزارع النسيجية تعد مصادر مفضلة ومستديمة للحصول على النواتج الأيضية الثانوية وبديلاً مناسباً عن النباتات الاعتيادية .

الرقم	العنوان	الصفحة
	الخلاصة	أ
	ثبت المحتويات	ج
	ثبت الجداول	و
	ثبت الأشكال	ح
	ثبت المختصرات	ي
1	المقدمة	1
2	استعراض المراجع	3
1-2	المزارع النسيجية مصدراً لنواتج الايض الثانوية	3
2-2	نبات كرز الأرض <i>Physalis angulata</i> L.	6
3-2	الزراعة النسيجية للنوع النباتي <i>Physalis angulata</i> L.	9
4-2	استحثاث الكالس	13
5-2	محتوى نبات كرز الأرض من مركب Physalin	16
3	مواد العمل وطرائقه	20
1-3	تحضير الأوساط الغذائية: Preparation of nutrient media	20
2-3	تعقيم الأدوات المستعملة: Sterilization of Tools	22
3-3	إنتاج بادرات النبات <i>Physalis angulata</i> المعقمة	22
المحور الاول	الإكثار الدقيق لنبات <i>Physalis angulata</i>	23
4-3	الأجزاء النباتية	23
5-3	مرحلة النشوء والتضاعف	23
1-5-3	زراعة أطراف الأفرع والعقد:	24
6-3	مرحلة التجذير	24
7-3	مرحلة الأقامة: Acclimatization Stage	24
المحور الثاني	استحثاث الكالس من الأجزاء النباتية	25
8-3	إدامة مزارع الكالس وتقدير أوزانها الرطبة.	25
9-3	تمايز الكالس	26

27	التحليل الإحصائي Statistical Analysis	10-3
27	تقدير محتوى الفايسلين Physalin في مزارع الكالس .	المحور الثالث
27	تحضير العينات النباتية.	11-3
27	استخلاص وفصل الفايسلين.	1-11-3
28	التشخيص والتقدير الكمي للفايسلين باستخدام تقنية كروماتوغرافي السائل ذي الكفاءة العالية HPLC.	2-11-3
29	النتائج والمناقشة	4
29	مرحلة النشوء والتضاعف Initiation and Multiplication Stage	1-4
30	تأثير BA في نشوء وتضاعف أطراف الأفرع	1-1-4
31	تأثير BA في نشوء وتضاعف العقد	2-1-4
34	تأثير Kin في نشوء وتضاعف أطراف الأفرع	3-1-4
37	تأثير Kin في نشوء وتضاعف العقد	4-1-4
42	تأثير IBA على مرحلة التجذير	2-4
44	مرحلة الاقلمة	3-4
45	تأثير 2,4-D في استحثاث وتنمية مزارع الكالس	4-4
48	تمايز الكالس	5-4
48	التشخيص والتقدير الكمي لمركب الفايسلين	6-4
48	تشخيص Physalin A وتقدير نسبة وجوده في أوراق نبات كرز الأرض البذرية ومزارع الكالس بواسطة HPLC	1-6-4
49	تشخيص Physalin B وتقدير نسبة وجوده في أوراق نبات كرز الأرض البذرية ومزارع الكالس بواسطة HPLC	2-6-4
54	الاستنتاجات والتوصيات	5
55	ثبت المصادر	6
55	المصادر العربية	
57	المصادر الأجنبية	
A	SUMMARY	

الصفحة	العنوان	رقم الجدول
6	اهم المركبات ذات الأهمية الطبية التابعة لمجموعة الفلافونويدات المستخلصة من مزارع الأنسجة النباتية لبعض النباتات التابعة إلى العائلة الباذنجانية.	1
21	مكونات الوسط الغذائي MS: (Murashige و Skoog ، 1962)	2
26	المقياس النظري للكالس	3
28	ظروف تشخيص النموذج القياسي من الفايسلين والمركبات المفصولة من العينات المنتخبة.	4
30	تأثير تراكيز مختلفة من BA في نشوء وتضاعف أطراف أفرع نبات <i>P. angulata</i> المفصولة من بادرات معقمة من زراعتها على وسط M الصلب.	5
33	تأثير تراكيز مختلفة من BA في نشوء وتضاعف العقد لنبات كرز الأرض <i>P. angulata</i> المفصولة من بادرات معقمة من زراعتها على وسط MS الصلب.	6
36	تأثير تراكيز مختلفة من Kin في نشوء وتضاعف أطراف أفرع نبات كرز الأرض <i>P. angulata</i> المفصولة من بادرات معقمة من زراعتها على وسط MS الصلب	7

الصفحة	العنوان	رقم الجدول
39	تأثير تراكيز مختلفة من Kin في نشوء وتضاعف أطراف العقد نبات كرز الأرض <i>P.angulata</i> المفصولة من بادرات معقمة من زراعتها على وسط MS الصلب	8
43	تأثير IBA في تجذير اطراف الأفرع الناتجة من الزراعة النسيجية لنبات <i>Physalis angulata</i> بعد أربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS الصلب	9
46	نسبة استجابة قطع السويقة تحت الفلقية من نبات كرز الارض <i>P.angulata</i> لاستحثاث الكالس ومعدل الوزن الرطب على وسط MSالمجهز بتراكيز مختلفة من 2,4-D بعد أربعة اسابيع من الزراعة.	10
49	قيم زمن احتباس Physalin A المعزول ونسب وجوده في أوراق نبات <i>Physalis angulata</i> البذرية ومزارع الكالس بأعمارها المختلفة.	11
50	قيم زمن احتباس Physalin B المعزول ونسب وجوده في أوراق نبات <i>Physalis angulata</i> البذرية ومزارع الكالس بأعمارها المختلفة.	12

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
4	مسارات بناء الأنواع الرئيسة من نواتج الأيض الثانوي من مركبات الأيض الأولية.	1
8	نبات <i>P.angulata</i> البذري (A) وثمار النبات بعد النضج (B)	2
17	البنية الفراغية مركبات Physalin A و B المعزولة من نبات <i>Physalis alkekengi</i>	3
23	الاجزاء النباتية المستخدمة في الزراعة الجزء على اليمين يمثل طرف فرع والجزء الذي على اليسار يمثل عقدة مفردة.	4
31	اطراف افرع نبات كرز الأرض <i>P. angulata</i> مزروعة على وسط MS المجهز بـ BA بعد أربعة أسابيع من الزراعة (A) بتركيز 0.5 ملغم لتر ⁻¹ (B) بتركيز 2.0 ملغم لتر ⁻¹ وبعد ثمانية أسابيع من الزراعة (C) بتركيز 1.5 ملغم لتر ⁻¹ (D) بتركيز 0.0	5
34	عقد نبات كرز الأرض <i>P. angulata</i> مزروعة على وسط MS المجهز بـ BA بعد أربعة أسابيع (A) بتركيز 1.5 ملغم. لتر ⁻¹ (B) بتركيز 2.0 ملغم لتر ⁻¹ بعد ثمانية (C) بتركيز 1.5 ملغم. لتر ⁻¹ (D) بتركيز 1.0 ملغم. لتر ⁻¹ .	6
37	اطراف افرع نبات كرز الأرض <i>P. angulata</i> مزروعة على وسط MS المجهز بـ Kin بعد أربعة أسابيع (A) بتركيز 2.0 ملغم. لتر ⁻¹ (B) بتركيز 0.5 ملغم. لتر ⁻¹ بعد ثمانية أسابيع (C) بتركيز 2.0 ملغم. لتر ⁻¹ (D) بتركيز 0.5 ملغم. لتر ⁻¹ .	7

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
40	عقد نبات كرز الارض <i>P. angulata</i> مزروعة على وسط MS المجهز بKin بعد أربعة أسابيع (A) بتركيز 1.5 ملغم. لتر ⁻¹ (B) بتركيز 2.0 ملغم. لتر ⁻¹ بعد ثمانية اسابيع (C) بتركيز 2.0 ملغم. لتر ⁻¹ (D) بتركيز 0.5 ملغم. لتر ⁻¹ .	8
44	تأثير IBA (ملغم/لتر) في تجذير أطراف أفرع نبات كرز الارض <i>P. angulata</i> الناتجة من الزراعة النسيجية بعد أربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS كامل تركيز الأملاح . أعلى عدد عند تركيز 0.2 ملغم. لتر ⁻¹ واطول جذر عند التركيز 0.1 ملغم. لتر ⁻¹ .	9
45	مراحل اقلمة نبات <i>Physalis angulata</i> بعد تجذيرها مختبريا (A) النباتات بعد اسبوع (B) النبات بعد أربعة اسابيع (C) النبات في مرحلة الأزهار.	10
47	استحثاث الكالس من السيقان تحت الفلقية لنبات <i>Physalis angulata</i> (A) معاملة المقارنة (B) تركيز 0.1 ملغم. لتر ⁻¹ (C) تركيز 0.3 ملغم. لتر ⁻¹ (D) تركيز 0.5 ملغم. لتر ⁻¹ (E) تركيز 1.0 ملغم. لتر ⁻¹ (F) تركيز 0.3 ملغم. لتر ⁻¹ تمايز قطع الكالس بشكل مباشر.	11
52	منحنيات الفايسلين A و B للعينة القياسية (A) والمعزول من الاوراق (B) نبات <i>P. angulata</i> في مرحلة البلوغ بواسطة HPLC.	12
53	منحنيات الفايسلين A و B المعزول من كالس السيقان تحت الفلقية (A) بعمر 30 يوما، (B) 45 يوما، (C) 60 يوما المشتقة من نباتات <i>P. angulata</i> في بواسطة HPLC.	13

ثبت المختصرات

اسم المختصر	الاسم الكامل
BA	Benzyl adenine
Kin	Kinetin
2,4-D	2,4-Dichloro phenoxy Acetic Acid
GA ₃	Gibberellic acid
IAA	Indole Acetic Acid
IBA	3-Indol Butyric Acid
NAA	Naphthalene Acetic Acid
C.W.	Coconut water
MS	Murashige and Skoog Medium (1962)
mgL ⁻¹	Milligram/Liter
UV	Ultraviolet
pH	-Log 10(H) ⁺
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
TDZ	n-phenyl-N-1,2,3-thiadiazol-5-urea
isp	N ⁶ - isopentenylaminopurine

الفصل الأول

المقدمة

تعد تقانة الزراعة النسيجية إحدى التقانات الحيوية التي يوظفها الإنسان لخدمته، ولاسيما في مجال إكثار أنواع عديدة من النباتات لما تمتاز به هذه التقانة من ميزات لعل من أهمها الإكثار السلالي السريع الذي يعد من التطبيقات ذات الأهمية الكبيرة التي تتم بإتباع طرائق مختلفة للتمايز والتكوين الشكلي كتكوين البراعم العرضية أو تحفيز نمو البراعم الأبضية واستحثاث الأجنة اللاجنسية (الأجنة الجسمية)، للحصول على أعداد هائلة من النباتات الخالية من مسببات المرضية والمشباهة للنبات الأم في وقت قصير نسبياً وفي أي وقت من أوقات السنة، فضلاً عن استعمال هذه التقانة في مجالات بحثية وتطبيقية منها تربية وتحسين النبات، وإنتاج العقاقير الطبية والأدوية ودراسة الجوانب الأساسية لنمو وتطور النبات، والأيض الثانوي (Kasumi وآخرون، 2004 و Gupta و Ibaraki، 2006).

تعد النباتات الطبية مصدراً متجدداً للدواء والغذاء، وفي الوقت الحاضر هناك تناقص كبير في مصادر النباتات الطبية ناشئ عن تدخل الإنسان في البيئة الطبيعية، لذلك اتجه العلماء إلى طريقة جديدة للتغلب على هذه الصعوبة بالاستفادة من تقانة الزراعة النسيجية لإنتاج النباتات المهمة عن طريق تقانة الإكثار الدقيق للنباتات التي تقوم على مبدأ الطاقة الكامنة للخلية Sarin Totipotency (2005). تتميز النباتات الطبية عن غيرها باحتوائها مركبات وعناصر كيميائية ذات تأثير طبي وفلسجي نافع لجسم الإنسان في حالة المرض التي تستعمل بالمقادير المحددة علمياً والموصوفة طبياً والتي أغلبها مواد ايض ثانوي، وتصنف المواد الفعالة على أساس خصائصها الكيميائية وصفاتها الطبيعية إلى القلويدات والكلايكوسيدات والفينولات وغيرها (العرقاوي، 2009)، وازداد الاهتمام في انتاج المواد النباتية عالية القيمة بتقانة الزراعة النسيجية لما توفره من امكانية التغلب على العديد من المشاكل المرتبطة بإنتاج النباتات حقلياً أو مختبرياً، فضلاً عن دور المزارع النسيجية التي يمكن وصفها بأنها مصانع تحويل حيوي factories bioconversion من مركبات ذات قيمة واطئة إلى نواتج ذات قيمة عالية (Bhojwani و Razdan، 1996 و Yong وآخرون، 2008)

يعد نبات *Physalis alkekengi* أهم الانواع المنتشرة في مقاطعات معدودة من العراق (السامرائي، 1983) ويعود إلى العائلة الباذنجانية، في حين سجل النوع *Physalis angulata* L. قيد الدراسة لأول مرة ضمن الموسوعة النباتية العراقية من قبل (العلاق، 2006).

يشير اسم الجنس *Physalis* إلى الشكل المثاني المتضخم للكأس بينما يدل اسم الجنس *angulata* إلى سيقان النبات الزاوية ألمربعة الشكل وللنبات العديد من الأسماء الشائعة إذ يدعى Goosberry و Cutleaf Ground و Hogweed cherry و Ballon و Cherry (Janardhanan، 2003، ألعلاق، 2012).

يتجمع Physalin بصورة رئيسية في النبات في مرحلة البلوغ حيث يتركز المركب بشكل كبير في النباتات المثمرة والنباتات المزهرة، وتختلف الأنسجة من حيث تراكم Physalin اعتماداً على نوع مركب الفيسلين يتراكم Physalin A في الثمار الناضجة و Physalin B في الأوراق الناضجة وبراعم الأزهار و Physalin D في براعم الأزهار و Physalin F في الأوراق الناضجة (Azlan وآخرون، 2005).

هدف الدراسة :-

بناء على ما سبق من الأهمية الطبية للنبات

هدفت الدراسة الى :-

- 1- التوصل إلى أفضل الظروف لإكثار النبات بالزراعة النسيجية من حيث نوع الجزء النباتي ومنظمات النمو المدروسة.
- 2- دراسة تأثير بعض الاوكسينات من (D-2,4) في استحداث الكالس ونموه اللاحق.
- 3- الاستخلاص والكشف والتشخيص والتقدير الكيميائي لمركب Physalin في مزارع الكالس بأعمار مختلفة باستخدام تقنية HPLC.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

2-1: المزارع النسيجية مصدراً لنواتج الأيض الثانوية

على الرغم من التقدم الهائل للطب التقليدي، ومزاياه فما يزال طب الأعشاب لديه الكثير مما يقدمه، فنحن نميل إلى نسيان أن البشر اعتمدوا بشكل دائم طوال التاريخ (باستثناء الخمسين سنة الأخيرة أو نحو ذلك) على النباتات لمعالجة كافة الأمراض ذات العلل البسيطة (شوفالييه، 2010) ويطلق اليوم على النباتات التي تستخدم لأغراض علاجية بالنباتات الطبية لاحتوائها على نواتج الأيض الثانوية التي تعد المصدر الرئيسي لكثير من المواد الصيدلانية (Giri و Narasn، 2000)، التي لا تزال تشكل حوالي 30% من الأنواع النباتية المعروفة التي تتم الاستفادة منها في الطب البديل، إذ يعتمد أكثر من ثلاث أرباع سكان العالم على النباتات أو مستخلصاتها في وصفات الطب الشعبي (Joy وآخرون ، 1998). حيث تصنع الأعشاب الطبية في صيغ كثيرة ومتنوعة، إذ يستعمل مطحون المادة النباتية أو مستخلصها في إعداد النقايع والمغليات واللبخات والرفادات والمراهم والدهون اعتماداً على المادة الفعالة وتأثيرها الفسيولوجي (شوفالييه، 2010). وما يزال الطب التقليدي يعتمد على النباتات بدلاً من المختبرات في إنتاج 25% على الأقل من الأدوية التي تعدّ من بين أكثر الأدوية التقليدية، إذ يتطلب الحصول عليها الرجوع إلى مصادرها الطبيعية (Sarin ، 2005). فضلاً عن أن هذه المركبات لا يمكن تحضيرها بسهولة ولكلفتها العالية في حال تصنيعها (Dixon ، 1985) كمركب الكينين المضاد للملاريا أو دواء القلب الديجوكسين على سبيل المثال، وليس الحصر التي لا يمكن الاستغناء عنها من مصادرها النباتية (شوفالييه، 2010).

تعرف مجموعه العمليات التي يقوم بها النبات من خلال تحويله مصادر الطاقة والمواد الخام المجهزة في الوسط الذي يعيش فيه إلى مركبات أولية يُفاد منها في عملية النمو بالأيض Metabolism الذي يكون على نوعين: البناء Anabolism والهدم Catabolism (Mathews و Van Hold، 1991). وتدعى المواد التي ينتجها النبات بكميات كبيرة مثل الكربوهيدرات والبروتينات والدهون والأحماض الأمينية والانزيمات والاحماض النووية التي يستغلها النبات خلال نموه بنواتج الأيض الأولية Primary metabolism (Sarin ، 2005). في حين تدعى المواد التي هي نواتج جانبية لأيض المواد الأولية مثل الفينولات والقلويدات والفلافونويدات والستيرويدات وغيرها من نواتج الأيض الثانوية Secondary metabolism (الشكل 1) أن نواتج الأيض الثانوية أو كما تسمى بالمركبات الثانوية Secondary products

لا تمتلك نواتج الايض الثانوية دوراً مباشراً في عمليات التنفس أو البناء الضوئي أو تمثيل المغذيات أو نقل المحاليل أو تصنيع البروتينات والكربوهيدرات والدهون (Taiz و Zeiger، 2002) الا انها تمتلك دوراً في تفاعل النبات مع محيطه فقد يكون دورها دفاعياً ضد مسببات المرضية والآفات أو في حماية النبات من التعرض للأشعة فوق البنفسجية UV أو دورها في عملية التلقيح كصبغات أو زيوت عطرية لجذب الحشرات (Razdan، 2003).

تزايدت الحاجة الى المواد الصيدلانية والطبية والاصباغ في العقود الاخيرة (Mulabagal و Tsay، 2004)، مما دفع بالمنتجين إلى إيجاد بدائل عن الإنتاج الحقلية وتناقص النباتات البرية منها كالاستفادة من مزايا تقنيات الزراعة النسيجية كالإكثار السلاحي السريع وتربية النباتات وتوظيف مزارع الكالس أو المعلقات الخلوية كمزارع طبيعية أو بعد تحويرها وراثياً (Mantell وآخرون، 1985) في الحصول على النواتج الثانوية بدرجة نقاوة عالية بديلاً عن استخلاصها بالطرق التقليدية (Purohit، 1999). فضلاً عن إمكانية إنتاجها بكميات كبيرة وبصورة مستمرة بعيداً عن الظروف البيئية الخارجية وعدم تداخلها مع مواد نباتية أخرى. إن خلايا النبات التي تنمو في مزارع الأنسجة المختلفة والتي منها مزارع الكالس والمعلقات الخلوية تتميز بقابليتها على إنتاج وتراكم مركبات كيميائية تكون هذه المركبات مشابهة لتلك التي تنتجها نباتات الأم وهناك العديد من الدراسات العلمية التي تصف إنتاج مركبات الأيض الثانوية المختلفة مثل الانثوسيانين والمركبات القلويدية Carotenoids و Flavones و Coumarins و Saponins و Naphthaquinons و Tannins و Terpenoids و alkaloids و Sterols وغيرها (Ramawat، 2008). وقد تم عزل العديد من مركبات الايض الثانوية وأهم مركبات الفلافونويدات المعزولة من العائلة الباذنجانية التي نجحت زراعة أجزائها النباتية التي تم استخراجها منها نسيجياً كما في الجدول (1).

جدول (1): اهم المركبات ذات الأهمية الطبية التابعة لمجموعة الفلافونويدات المستخلصة من مزارع الأنسجة النباتية لبعض النباتات التابعة إلى العائلة الباذنجانية.

اسم النبات	المركب الطبي	الجزء النباتي	الاستعمال الطبي	المصدر
<i>Physalis angulate</i>	Physalin	السويقة تحت الفلقة	معالجة العديد من الأمراض منها الربو ومشاكل المسالك البولية والروماتزم والأورام.	Silva) وآخرون، (2005)
<i>Withania somnifera</i>	Withania A	الأوراق	معالجة حالات التعب والاجهاد	Siddique) وآخرون، (2004)
<i>Capsicum annum</i>	Caposaicine	الكالس	غني بفيتامين C و A	(الملاح والبيوزيكي، (2005)
<i>Datura innoxia</i>	Hyoscine & Hyoscyamine	الكالس	داء الكلب والجذام	الملاح ويونس، 2011

2-2: نبات كرز الأرض

ينتمي نبات كرز الأرض *Physalis angulata* L. إلى العائلة الباذنجانية (Solanaceae) التي تعد من العوائل واسعة الانتشار وتضم حوالي 90 جنس و 2000-3000 نوع تنتشر في مساحات واسعة من العالم ولكنها تكثر في استراليا وأمريكا الجنوبية، إذ

يوجد (40) جنس مستوطنا فيها (السعدي وآخرون، 2012). ويضم جنس *physalis* حوالي 90 نوع متوزعه في امريكا الشمالية والجنوبية وقد تمت زراعة بعض الأنواع من جنس *physalis* لأهميتها الغذائية للإنسان (Rodrigues وآخرون ، 2014). ولعل أكثر هذه الأنواع انتشاراً هي *Physalis angulata* و *P. peruviana* و *P. alkekengi* و *P. minima* و *P. divaricata* (العلاق، 2012). للنوع *Physalis angulata* العديد من الأسماء الانكليزية الشائعة حيث يسمى Kakange او Winter cherry او Chinies lanter او Husk cherries (Porika وآخرون، 2014) ويعرف في البرازيل باسم Camapu او Balaozinho (Santos وآخرون، 2008).

Botanical

ويصنف النبات علميا

Classificatio

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Viridaeplantae

Phylum: Tracheophyta

Class: Dicotyledons

Order: Solanales

Family: Solanaceae

Subfamily: Solanoideae

Tribe: Physaleae

Subtribe: physalinae

Genus: *physalis*

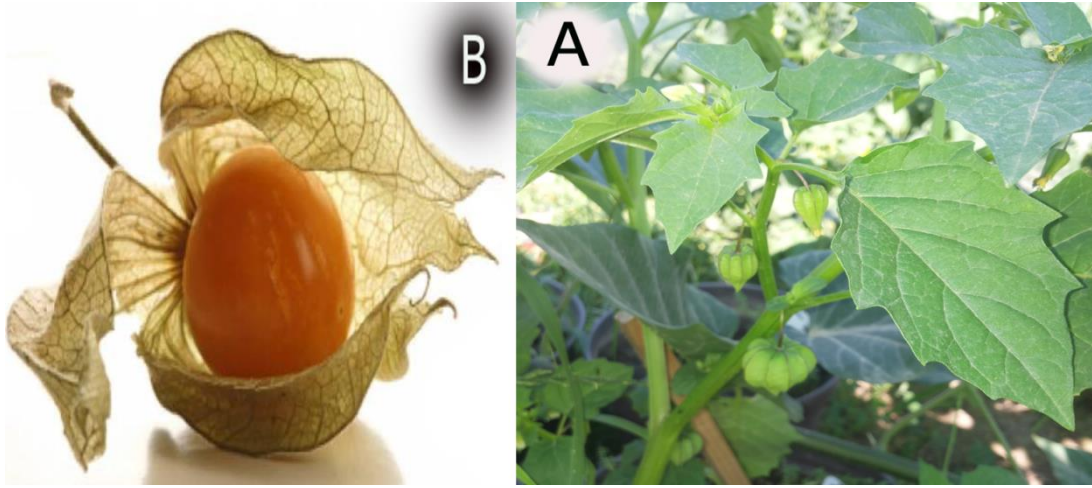
Specific epithet: *angulata* – L.

Botanical name: *Physalis angulata* L.

(Sharma وآخرون ، 2015)

والنبات عشبي حولي يوجد في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية من العالم (Donkor وآخرون، 2012). وينتشر في جوانب الطرق والغابات المفتوحة والمزارع (Hall وآخرون، 2003) تم دراسة بيئة وتوزيع هذا النوع *Physalis angulata* الذي تم تسجيله للمرة الأولى في البيئة العراقية اذ اظهرت النتائج ان افراد هذا النوع لا تنتشر بشكل مجاميع سكانيه وانما تكون بأشكال انفراديه على جوانب الطرق وفي المناطق الرطبة والبساتين والحدائق وفي اغلب الاحيان تكون بشكل متباعد وهذا يؤكد أن هذا النوع غير عراقي الأصل وإنما دخل العراق واستوطنه منذ مدة قليلة وقد لوحظ انتشار هذا النوع في مختلف الترب ويوجد في الترب الطينية والطينية الرملية والغرينية الطينية، أما التوزيع الجغرافي للنبات فينتشر في معظم المقاطعات العراقية الا انها تكون اكثر كثافة في مقاطعه السهول الرسوبية اذ ينتشر في محافظه بغداد وديالى وجنوب محافظة كركوك (العلاق ، 2012).

تمتاز نباتات كرز الارض بجذور وتديه ذات لون ابيض مصفر وتميزت جذور النباتات المعمرة بكونها ذات طبيعة خشبية، إذ يمكن للنباتات ان تحتفظ بجذورها وبمنطقة التاج من الساق بعد انتهاء فترة النمو والازهار والثمار لتعود الى نشاطها في الموسم اللاحق لتعطي مجموعه خضرية جديدة. ونبات هذا النوع عشبية له سيقان ملطاء وخضراء فاتحه (شكل A:2) ومنتصبه كما يمتاز المقطع العرضي في السيقان بشكلها الرباعي الزاوي وهذه الصفة يتميز بها افراد هذا النوع (Hall وآخرون، 2003). الأوراق تكون بسيطة متبادلة ذات سويق اسطواني. أما النصل الورقي فيتراوح شكله بين البيضوي إلى البيضوي المعيني، والثمار فتكون طرية غير متفتحة ذات شكل كروي لونها أخضر قبل النضج لكنها تصبح ذات لون أخضر مصفر الى البرتقالي بعد النضج تتميز بكونها ذات كاس ثمرية مستديمة ويتخذ الكاس شكل بيضوي أو بيضوي كروي (شكل B:2)، وبذور النبات مسطحة ذات شكل قرصي كلوي وذات زخرفه من النوع الشبكي او الشبكي المتموجة، ذات لون بني مصفر ويتراوح عددها من 45 - 50 بذرة. ثمرة¹، يزهر النبات من منتصف آيار الى بداية تموز (العلاق ، 2012).



شكل (2) نبات *Physalis angulata* البذري (A) وثمار النبات بعد النضج (B) (صورت من قبل الباحث).

وللجنس استعمالات واسعة في الطب البديل في معالجة العديد من الأمراض منها الربو ومشاكل المسالك البولية والروماتزم والاورام ومضاد للالتهابات ومضاد للتشنج (Silva وآخرون، 2005). ويستخدم عصير النبات في علاج وجع الاذن واليرقان (Osho وآخرون، 2010) فضلا عن علاج التهابات الحلق وخفض الحرارة ومكافحه التهاب الكبد وعنق الرحم (Nanumala وآخرون، 2012) ومضاد للجراثيم والخلايا السرطانية ومضاد للخلايا السامة وله دور في الأنشطة المناعية (Donkor وآخرون، 2012). وثمار النبات صالحة للأكل ولها من الأهمية الطبية إذ تستعمل في معالجة الدمامل والقروح أو الجروح والامساك ومشاكل الجهاز الهضمي (Osho وآخرون، 2010) وفي علاج الأمراض التي تنتقل عن طريق الاتصال الجنسي واضطرابات المعدة والأمعاء ومرض الجذام (Abo وLawal، 2013) وكذلك تستعمل الثمار في تعزيز امتصاص الخلايا للكلوكوز وتعزيز إفراز الأنسولين وتحفيز تأثيره ولعلاج داء السكري ومضاعفاته (Oladele وآخرون، 2013). كما تعتبر ثماره مصدراً غنياً بالبروتين وتحتوي نسبة 16% من البروتينات مما يجعله مصدر جيد للأشخاص الذين لديهم نقص في البروتينات وتعد مصدر غني بالفسفور والفيتامينات A و C ومجموعة فيتامين B التي تعمل على تقليل الشعور بالضغط وتقوية الذاكرة وإمداد الجسم بالطاقة وتحفيز عملية التمثيل الغذائي والحد من مخاطر الإصابة بأمراض القلب ومساعدة الجسم على حرق الدهون كذلك يحتوي النبات على مركب Bioflavonoids حيث اثبتت الدراسات انه مضاد للفايروسات والالتهابات والأكسدة، فضلا عن غناها بحامض الاسكوربيك بنسبه 77% والسكريات الكلية 26% ومن الكاروتينات 21 ملغم / 100 غم وزن رطب، وغلاف الثمار الخارجي يحوي على 11% من

البكتين، وهي بهذه الصفات تجعل هذا النبات يحسن من قدرة الجسم على امتصاص الحديد مما يقي من انخفاض الهيموكلوبين في الدم (www.almrsal.com).

2-3: الزراعة النسيجية للنوع النباتي

اكتسبت زراعة الأنسجة النباتية أهمية كبيرة إذ وظفت تقاناتها في التطبيقات على المستوى الصناعي والتجاري في مناطق كثيرة من العالم، فقد أدخل الإكثار الدقيق إلى المجال الصناعي منذ الثمانينات وتوسع طرديا خلال الفترة 1985-1999 إذ ازداد خلال هذه الفترة الناتج الإجمالي السنوي من 130-513 مليون نبات، ولهذه التقنية فوائد كثيرة مقارنة مع طرق الإكثار التقليدية حيث نحتاج إلى مساحة صغيرة لإنتاج أعداد كبيرة من النباتات في فترة زمنية قصيرة مع سهولة التعامل مع النباتات الناتجة وسهولة نقلها فضلا عن عدم خضوعها إلى قوانين الحجر الزراعي (Ramawat، 2008). للإكثار الدقيق مراحل متعددة بغض النظر عن الطريقة المستخدمة (التبرعم الأبوي أو تكوين الأجنة الجسمية) لأكثر الأنواع المختلفة من النباتات لكن يمكن إجراء بعض التعديلات في بعض الحالات الفردية لأجل تنظيم طرق العمل وهذه المراحل هي:

أولاً: مرحلة نشوء الزروعات:

إن الهدف من هذه المرحلة هو الحصول على مزارع نسيجية معقمة من النبات الأم تحتفظ بحيويتها ونشاطها لخلوها من الملوثات المرضية مما يسمح لها بالنمو والتطور في المراحل اللاحقة (Gray و Trigiano، 1999).

هنالك العديد من العوامل التي تؤثر بشكل فعال في نجاح تقنية زراعة الأنسجة النباتية والتي تعتمد أساساً على تعدد المصادر المستخدمة من الأجزاء النباتية للإكثار على مستوى الخلية أو النسيج أو العضو النباتي (جندية، 2003) ولعل أولها اختيار الجزء النباتي الذي يجب أن يتم بدقة وإتقان بسبب القابلية المختلفة لهذه الأجزاء النباتية في استجابتها للنمو (محمّد ومبشر، 1990). ولمنظمات النمو تأثيراً مهماً أيضاً في عمليات النمو والتطور للنبات من خلال تحفيزها أو تثبيطها أو تحويلها للعمليات الحيوية الفسلجية في أنسجة النبات (Davies، 1995)، إذ يعد إضافة منظمات النمو النباتية من المتطلبات الأساسية لنجاح الزراعة خارج الجسم الحي وعادة تضاف الساييتوكاينينات إلى الأوساط الغذائية في مراحل النشوء وذلك لتحفيز انقسام الخلايا وتشجيع تفتح البراعم الابضية ونموها لتعطي فروعاً جديدة بعد القضاء على ظاهرة السيادة القمية (Razdan، 2003 وجندية، 2003). ومن الساييتوكاينينات الأكثر استعمالاً لهذا

الغرض هي BA و isp و Kin و TDZ و Zeatin و 6-furfuryladenine (Hartmann وآخرون، 2002).

حيث اشار Ramar وآخرون (2014) عند زراعة عقد وسلاميات وأوراق نبات *Physalis peruviana* نسيجيا على وسط MS المدعم بفيتامين الوسط B5 وبتراكيز متداخلة من منظمات النمو تمثلت BAP بتركيز 0.5 - 1.0 ملغم.لتر⁻¹ لوحدة أو بتركيز 1.5 ، 2.0 ، 2.5 ، 3.0 ، 3.5 ، 4.0 متداخلا مع GA₃ بتركيز 0.5 ، 1.0 ، 1.5 ، 2.0 ، 2.5 ملغم.لتر⁻¹ و 2,4-D بتركيز 0.5 ، 1.0 ملغم.لتر⁻¹، ان اكبر عدد للأفرع المتضاعفة والذي بلغ 15.4 فرع. جزء نباتي⁻¹ سجل بعد اربعة اسابيع من الزراعة لقطع العقد والسلاميات المزروعة قد سجل على وسط MS + 2.0 ملغم. لتر⁻¹ BAP + 1.0 ملغم. لتر⁻¹ GA₃ + 1.0 ملغم. لتر⁻¹ 2,4-D ، في حين بلغ 15.3 فرع. جزء نباتي⁻¹ بالنسبة للأوراق على الوسط MS + 3.0 ملغم. لتر⁻¹ BAP + 1.0 ملغم. لتر⁻¹ GA₃ + 1.0 ملغم. لتر⁻¹ 2,4-D وللمدة ذاتها.

وفي دراسة قام بها Afroz وآخرون (2009) لإعادة تشكّل نبات *P. minima* نسيجيا من خلال زراعة العقد والقمة النامية على وسط MS الصلب المدعم بتركيز مختلفة من BA (0.1 ، 0.5 ، 1.0 ، 1.5 ، 2.0) او بتركيز 1.0 ملغم. لتر⁻¹ متداخلا مع ماء جوز الهند بتركيز 5 او 10%، ان اكبر عدد للأفرع المتشكلة على قطع العقد والقمة النامية بلغت 32 ، 29 فرع. جزء نباتي⁻¹ في الاجزاء النباتية المزروعة على التوالي على وسط MS المدعم بتركيز 1.0 ملغم. لتر⁻¹ BA لوحدة بالرغم من ان التداخل بين BA بتركيز 1.0 ملغم. لتر⁻¹ مع كل من تركيزي جوز الهند المستخدمة ادى الى زيادة في نسبة عدد الأفرع المتميزة.

وأوضح Otroshy وآخرون (2013) أن منظمات النمو تؤثر بشكل كبير في استجابة قطع الأجزاء النباتية للأوراق والعقد لإعادة تكون الأفرع منها، فعند زيادة تركيز الساييتوكاينين الى 4 ملغم. لتر⁻¹ تزداد وبشكل ملحوظ قابلية التشكل فقد أشارت نتائج زراعة قطع الأوراق لنبات *P. peruviana* على وسط MS المدعم بتركيز متداخلة من BA بتركيز 0 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4 ملغم. لتر⁻¹ والكاينتين Kin بتركيز 0.5 ، 1.0 ملغم. لتر⁻¹ إلى أن اكبر نسبة تضاعف في كل من الاجزاء النباتية للأوراق والعقد كان واضحاً في التراكيز العالية من BA و Kin إذ سجلت قيمة بلغت 98.7 %، وان أعلى نسبة للكالس المستحث والبالغة 100% سجلت في قطع الأجزاء النباتية للعقد في التراكيز المنخفضة من الساييتوكاينين وبوجود IBA.

ثانيا: مرحلة التضاعف:

تعد هذه المرحلة من مراحل الإكثار المهمة والحرجة، إذ يتقرر في ضوءها نجاح أو فشل عملية الإكثار كما يعتمد عليها عدد النباتات الكلية الناتجة ونوعيتها (سلمان، 1988) أذ يحدث تضاعف سريع للجزء النباتي من أجل الحصول على أكبر عدد من الأفرع ويتحقق ذلك عن طريق امثلة عوامل الوسط والنسيج النباتي من خلال التجربة وتستعمل الأفرع المتكونة خارج الجسم الحي كاجزاء نباتية للحصول على عدد كبير من الأفرع عادة بنفس الوسط في المرحلتين الأولى والثانية، وقد تجري بعض التعديلات البسيطة في تراكيز الساييتوكاينينات أو النتروجين من أجل زيادة معدل تضاعف الأفرع (Ramawat، 2008).

إن مجموعة الساييتوكاينينات في الأصل من مشتقات الأدنين وهي من منظمات النمو المهمة في مزارع الأنسجة النباتية إذ تساعد في أنقسام الخلايا وتشجيع نمو الأفرع الجانبية ويساعد في زيادة اعدادها (الرفاعي والشوكي، 2002) وإن التوازن بين الأوكسين والساييتوكاينين يؤثر في تكوين وتطوير الأعضاء عند زراعتها خارج الجسم الحي ويحفز التداخل بين الاوكسينات والساييتوكاينينات تضاعف الأفرع ويحسن استطالتها ومن ثم يجعلها بالطول المناسب الذي يهيئها للانتقال الى مرحلة التجذير (المزوري، 2007 وعبيد، 2009).

وقد اشار Intzaar وآخرون (2013) عند زراعة قطع العقد لنبات *P. minima* المفصولة من نباتات نامية في الحقل على وسط MS المدعم ب BA أو Kin بتركيز 0.1 ، 0.5 ، 1.0 ، 2.0، 3.0 ، 4.0 ، 8.0 مايكرومول كلا على حدة أو تداخلهما مع IBA بتركيز 0.5 ، 1.0 ، 2.0 مايكرومول أن أعلى نسبة للأفرع المتكونة على العقد بلغت 78.3% وبمتوسط عدد افرع بلغ 6 فرع. عقدة¹⁻ وطول افرع بلغ 3.3 سم عند زراعة العقد على وسط MS المدعم ب BA بتركيز 0.5 مايكرومول بعد مرور 10 أيام من الزراعة بينما بلغت نسبة الأفرع المتكونة 74% وبمتوسط عدد بلغ 1.9 فرع. عقدة¹⁻ وطول افرع بلغ 3.5 سم عند استخدام Kin لوحدة بتركيز 3 مايكرومول في حين سجل التداخل بين Kin بتركيز 2.0 مايكرومول + IBA بتركيز 1.0 مايكرومول نسبة تضاعف بلغت 66.6% وبمتوسط عدد 2.9 فرع. عقدة¹⁻ وطول 2.7 سم. كما وأشارت تجربة مستقلة اخرى قام بها الفريق إلى اعادة زراعة القمة النامية للأفرع الناتجة من الزراعة النسيجية على وسط MS السائل المدعم بتركيز BA ذاتها متاخلا مع IBA بتركيز 1.0 ، 2.0 مايكرومول بتوظيف اوعية الزراعة، ان أكبر عدد للأفرع المتضاعفة والبالغ 40 فرعاً. جزء نباتي¹⁻ والبالغة اطوالها 6.1 سم قد سجل في القمم

النامية المزروعة على وسط MS والمدعم بتداخل BA بتركيز 4.0 مايكرومول + IBA بتركيز 2.0 مايكرومول بعد 20 يوما من الزراعة.

ثالثا: مرحلة التجذير

تهدف هذه المرحلة إلى تحسن نشوء الجذور العرضية على قواعد الأفرع الخضرية التي تكونت في مرحلة التضاعف من خلال نقلها إلى أوساط حث التجذير التي يكون التوجه فيها الى تغيير مستويات منظمات النمو بتقليل او عدم إضافة الساييتوكاينينات الى الوسط وزيادة تركيز الاوكسين (Hartmann وآخرون، 2002). وأشار (Otroshy وآخرون، 2013) ان عملية التجذير تتأثر بشكل كبير بالنوع النباتي وتركيز ونوع منظمات النمو النباتية المستخدمة. وتستخدم انواع مختلفة من الاوكسينات لتجذير اطراف الافرع واكثرها شيوعا IBA و IAA و NAA. فقد أشار Afroze وآخرون (2009) عند دراسة تجذير الأفرع الخضرية الناتجة من تضاعف المزارع النسيجية لنبات *P. minima* إلى أن أعلى معدل لعدد الجذور المتكونة لكل فرع قد سجل 37.50 جذر. فرع⁻¹ عند زراعتها على وسط MS بنصف قوة الاملاح والمدعم بتركيز 0.3 ملغم. لتر⁻¹ من NAA بعد 15 يوم من الزراعة.

وقد نجح Intzaar وآخرون (2013) عند دراسة تجذير أطراف الأفرع الناتجة من تضاعف المزارع النسيجية مختبريا لإجزاء العقد لنبات *P. minima* باختبار تراكيز مختلفة من منظمات النمو 0.1 ، 0.2 ، 0.5 ، 1.0 ملغم. لتر⁻¹ من IBA و NAA و IAA كل على انفراد. فقد لاحظ ان اعلى نسبة للتجذير والبالغة 95% وان اعلى معدل لعدد الجذور 80 جذر. فرع⁻¹ قد سجلت في اطراف الافرع عند زراعتها على اوساط التجذير MS والمدعم بتركيز 0.2 مايكرومول بعد 15 يوم من الزراعة.

وأوضح Mahadev وآخرون (2014) عند اختبارهم لدور NAA و IBA و IAA بتركيز 0.5 - 2.0 ملغم. لتر⁻¹ في تجذير أفرع نبات *Solanum viarum* (Dunal) المزروعة على وسط MS أن حث الجذور العرضية استغرق مدة 8-10 ايام وان اعلى نسبة للتجذير 96 % مع اعلى معدل لعدد الجذور والبالغ 18.3 جذر. فرع⁻¹ سجل عند اضافة 1.0 ملغم. لتر⁻¹ IBA في حين سجل اعلى معدل لطول الجذور 4.3 سم عند اضافة IBA بتركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹.

وأشار Osman وآخرون (2010) بأنه تم تجذير افرع نبات *Lycopersicon esculentum* Mill,c.v. omdurman بسهولة عند نقلها الى وسط التجذير MS بنصف قوّة التركيبية

وسجلت أكبر القيم لعدد الجذور على وسط MS المدعم ب IAA بتركيز 1.0 ملغم. لتر⁻¹ في حين سجلت أعلى قيم للجذور في الافرع المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 2.0 ملغم. لتر⁻¹ من IBA.

2-4: استحثاث الكالس

يطلق على الخلايا البرنكيميية غير منتظمة الشكل والسائبة التي تنشأ من الخلايا المرستيمية للانسجة النباتية مصطلح كالس Callus. يعتمد استحثاث الكالس بدرجة كبيرة على الظروف المتبعة في زراعته بالإضافة الى نوع قطع النبات Explant ومصدرها وكذلك الظروف الخاصة مثل درجة الحرارة والضوء والمواد الغذائية ومنظمات النمو وتختلف حيوية الكالس المستحث اعتمادا على القطعة النباتية المستعملة في استحثاثه ويمكن للكالس المستحث من الأجزاء المختلفة ان يتخصص مكونا الأعضاء أو الأجنة معتمدة على الظروف البيئية المستخدمة في الزراعة ومكونات الوسط الغذائي (محمد ومبشر، 1990).

وقد وضح Ramawat (2008) ان الانسجة الفتية هي الأكثر احتمالا لإنتاج الكالس وقد تم الحصول على الأخير من البادرات والافرع الفتية حديثة التكوين او البراعم وقمم الجذور وغيرها ويمكن استعمال أي نسيج نباتي حي كجزء نباتي لتنشئه مزارع الكالس ويمكن تحفيز خلايا الجزء النباتي تحت تأثير منظمات النمو لكي تنقسم وتكون كتلة من الخلايا. ووجد Mungole وآخرون (2011) عند دراستهم حث الكالس على قطع الاوراق الطرفية والعقد والجذور لنبات *Physalia minima* L. عند زراعتها على وسط MS المدعم بتركيز 0.1 ، 0.2 ، 0.3 ، 0.4 ملغم. لتر⁻¹ من 2,4-D او Kin او BAP كل على حدة او التداخل بين الاوكسين والساييتوكاينين أن افضل نسبة للاستجابة تم الحصول عليها لاستحثاث الكالس بلغت 90% بعد 12 يوم على قطع الاوراق الطرفية عند زراعتها على وسط 2,4-D بتركيز 0.4 ملغم. لتر⁻¹ وامتاز الكالس بلونه الاخضر المصفر وقوامه الهش في حين بلغت نسبة الاستجابة 30% بعد 18 يوم في قطع العقد عند التركيز ذاته من 2,4-D ولم تظهر هناك استجابة لقطع الجذور الا للتركيز 0.2 ملغم. لتر⁻¹ من 2,4-D اذ بلغت نسبة الاستجابة 20% بعد 20 يوما من الزراعة على وسط MS وكانت اعلى نسبة استجابة 65% بعد 14 يوما في قطع الأوراق الطرفية عند زراعتها على وسط MS المدعم بتركيز 0.4 ملغم. لتر⁻¹ من 2,4-D و Kin في حين بلغت الاستجابة 30% عند تداخل 2,4-D و BAP بتركيز 0.4 ملغم. لتر⁻¹ لكل منهما في قطع الاوراق الطرفية المزروعة على وسط MS بعد 24 يوما. ولم تكن هناك استجابة من قطع العقد المزروعة على وسط MS بالتداخلات ما بين 2,4-D و Kin عندما يكون 2,4-D

بتركيز 2.0 ملغم. لتر⁻¹ مندمجا مع تركيز 0.1 ، 0.2 ، 0.3 ملغم. لتر⁻¹ من Kin وكذلك لم يلاحظ استجابة عند استخدام 2,4-D بتركيز 2.0 ملغم. لتر⁻¹ مع تركيز 0.1 ، 0.2 ، 0.3 ملغم لتر⁻¹ من BAP في حين سجلت قطع الجذور المزروعة على وسط MS المدعم بكل من Kin و 2,4-D بتركيز 0.4 ملغم. لتر⁻¹ أعلى نسبة استجابة بلغت 70% بعد 11 يوماً. وفي تجربة أخرى قام بها الفريق لحث الكالس على التمايز على اوساط MS المدعمة بتركيز مختلفة من Kin و BAP وكانت 0.1 ، 0.2 ، 0.3 ، 0.4 ، 2.0 ، 2.5 ، 3.0 ، 3.5 ملغم. لتر⁻¹ وأشارت النتائج إلى أن أكبر عدد للفرع بلغ 6 فرع. معاملة⁻¹ بأطوال بلغت 7.7 سم سجلت في قطع الكالس المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 0.4 ملغم. لتر⁻¹ من Kin و 3.5 ملغم. لتر⁻¹ من BAP.

وجد Sheeba وآخرون (2013) أن بالإمكان حث قطع أوراق نبات *Physalis minima* L. على استحثاث الكالس عند زراعتها على وسط MS المدعم بتركيز مختلفة من منظمات النمو اشتملت على NAA و 2,4-D بتركيز 0.5 – 3.0 ملغم. لتر⁻¹ لوحدها او من خلال تداخل تراكيز NAA السابقة مع BA بتركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹ او IAA بتركيز 0.5–3.0 ملغم. لتر⁻¹ مع Kin بتركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹. اذ اشارت النتائج الى ان اعلى نسبة للكالس المستحث بلغت 80.67% في الأوراق المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 3.0 ملغم. لتر⁻¹ من NAA بعد 20 يوم وكان اعلى وزن رطب للكالس في القطع المزروعة على وسط MS المدعم 2.0 ملغم. لتر⁻¹ من IAA متداخلا مع BA بتركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹ وادى نقل الكالس الى اوساط التمايز الى تمايز الافرع من الكالس المعاد زراعتة على وسط MS المدعم بتركيز 2.0 ملغم. لتر⁻¹ من BA متداخلا مع IAA بتركيز 0.25 ملغم. لتر⁻¹ بعد 24 يوما اذ بلغت نسبة التمايز 46.28%.

وأشارت دراسة قام بها Ayyadurai و Ramar (2016) إلى إمكانية حث نسيج الكالس من نبات *P. minima* من زراعة الاجزاء النباتية الورقة والسلاميات على وسط MS المدعم بفيتامينات وسط B5 بتركيز مختلفة ومتداخلة مع BAP بتركيز 1 ، 2، 3 و IAA بتركيز 0.5 ، 1.0 ، 1.5 و NAA بتركيز 0.5 ، 1.0 و 2,4-D بتركيز 0.5 ، 1.0 ، 2.0 ، 3.0 وبينت النتائج ان اعلى نسبة لاستحثاث الكالس كانت 87.5 % في قطع السلامة المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 3.0 ملغم. لتر⁻¹ BA + 1.0 ملغم. لتر⁻¹ 2,4-D في حين بلغت 86.3 في قطع الاوراق عند زراعتها على وسط MS المدعم بتركيز 3.0 ملغم. لتر⁻¹ BA + 2.0 ملغم. لتر⁻¹ NAA .

ونجح Osman وآخرون (2010) عند دراسة حث الكالس من زراعة السيقان تحت الفلقية والفلقات لنبات *Lycopersicon esculentum* Mill, c.v. omdurman على وسط MS المدعم بتركيز مختلفة من NAA و 2,4-D و TDZ و BA لوحدها أو من خلال تداخلها في حث الكالس بعد 7 - 10 ايام من الزراعة، فقد سجلت السيقان تحت الفلقية أعلى نسبة للاستجابة لاستحثاث الكالس المعتمدة في الدراسة إذ بلغت 86.6% عند زراعتها على وسط MS المدعم بتركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹ من NAA وجاءت بعدها عينات السوقية تحت الفلقية المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 0.1 ملغم. لتر⁻¹ من NAA + 0.5 ملغم. لتر⁻¹ من BA فقد بلغت نسبة الاستجابة 100% في حين سجلت أعلى نسبة للاستجابة لاستحثاث الكالس للأوراق الفلقية قيمة بلغت 75% في الأجزاء المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 2.0 و 3.0 ملغم. لتر⁻¹ NAA بعد 8 اسابيع من زراعتها وان افضل نسبة تشكل للأفرع بلغت 93% كان من الكالس المشتق من الأوراق الفلقية عند إعادة زراعته على وسط MS المدعم بتداخل TDZ و BA بتركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹ لكل منهما.

وأشار Rashid وآخرون (2012) إلى أن أعلى نسبة استجابة لاستحثاث الكالس من الاجزاء النباتية السوقية تحت الفلقية والفلقات والاوراق لنبات *Solanum lycopersicum* كانت على وسط MS المدعم بتركيز 3.0 ملغم. لتر⁻¹ BA و 1.0 ملغم. لتر⁻¹ NAA.

وتمكن Elnour وآخرون (2012) من حث الكالس من اوراق نبات *Datura stramonium* من زراعتها على وسط MS مدعم بانواع مختلفة من منظمات النمو 2,4-D مدمج مع Kin بتركيز 0.025 - 0.05 ملغم. لتر⁻¹. إذ أشارت النتائج إلى حث الكالس بعد ثلاثة أسابيع من الزراعة وان أعلى نسبة لاستحثاث الكالس كان في الأجزاء النباتية المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 2 ملغم. لتر⁻¹ 2,4-D وان افضل تركيز لحث الكالس من الأوراق يتم باضافة 0.05 ملغم. لتر⁻¹ 2,4-D + 0.025 ملغم. لتر⁻¹ Kin اذ تعتبر التركيزات المندمجة افضل من اضافة 0.05 ملغم. لتر⁻¹ 2,4-D لوحده.

وضح Adhikari و Pant (2013) إمكانية حث قطع السيقان لنبات *Withania somnifera* L. Dunal على وسط MS المدعم بتركيز مختلفة من منظمات النمو النباتية BA و NAA و 2,4-D و Kin كل على حده او من تداخلاتها. وأشار إلى أن افضل وسط لنمو الكالس كان على وسط MS المدعم بتركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹ BA + 1.5 ملغم. لتر⁻¹ من NAA.

ووصف Chandra وآخرون (2013) بروتوكول للاكثار الدقيق خارج الجسم الحي لنبات *Solanum lycopersicum* من خلال استحثاث الكالس من الأجزاء النباتية للسويقة تحت الفلقية والأجزاء الفلقية على وسط MS الحاوي على تراكيز 1.0 ، 2.0 ، 3.0 من BA أو 2,4-D اذ سجلت نسبة حث للكالس بعد 3 اسابيع من الزراعة وظهر الكالس بلون اخضر مصفر وبني مصفر عند التراكيز المختلفة من BAP في حين ظهر بلون ابيض وقوام هش وبلون بني واصفر عند التراكيز المختلفة من 2,4-D.

وفي الدراسة التي قام بها Mahadev وآخرون (2014) للوصول إلى بروتوكول عن دراسة سرعة استحثاث الكالس وإعادة تشكل نبات *Solanum viarum* Dunal من الأوراق الفتية والعقد من خلال اختيار تراكيز مختلفة من الاوكسين IAA و NAA و 2,4-D متداخلة مع الساييتوكاينين مثل BAP و Kin وجد ان اعلى نسبة للاستحثاث من الكالس كان من العقد المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 3.0 ملغم. لتر⁻¹ NAA متداخلا مع 0.5 ملغم. لتر⁻¹ BA وتمايز هذا الكالس الى افرع مباشرةً ونسبة 96% وبمعدل 16.2 فرع. جزء نباتي⁻¹ عند اعادة زراعة الكالس على وسط MS المدعم بتركيز 2.0 ملغم. لتر⁻¹ BA + 0.5 ملغم. لتر⁻¹ NAA¹.

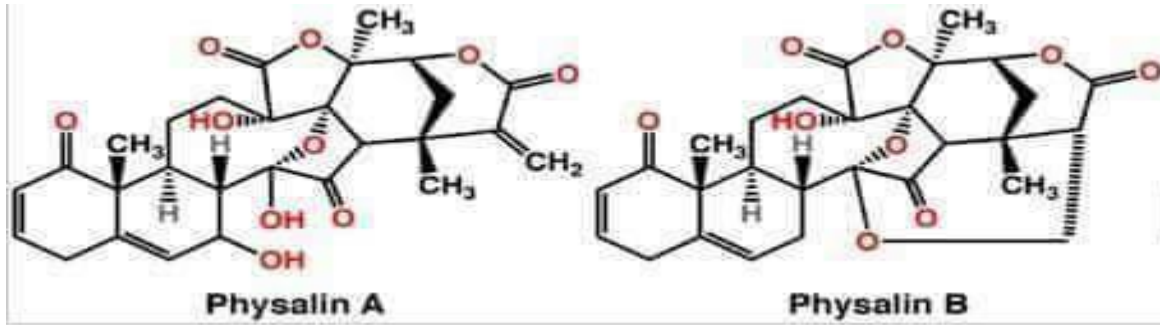
قيم Shah وآخرون (2015) تاثير منظمات نمو نباتية مختلفة لثلاثة اصناف من الباذنجان *lycopersicum* Mill وإعادة تشكيل الأفرع منه، فقد أشارت النتائج إلى أن اعلى نسبة للقطع المستجيبة لاستحثاث الكالس سجلت في قطع السويقة تحت الفلقية للصنف Rio اذ بلغت 67.48% والصنف Roma بنسبة 62% والصنف Moneymaker بنسبة 58.23% على وسط MS المدعم بتركيز 2.5 ملغم. لتر⁻¹ من BA + 2.0 ملغم. لتر⁻¹ من IAA.

وأشار Ayyadurai و Ramar (2016) إلى سرعة حث الكالس من نبات *Solanum pubescend* Willd مختبريا من العقد والسلاميات والأوراق عندما زرعت على وسط MS مدعم بتركيز مختلفة ومتداخلة من منظمات النمو BAP و NAA و 2,4-D و GA₃ أذ كانت اعلى نسبة لعدد القطع المستجيبة سجلت في العقد والسلاميات على وسط MS المدعم بتركيز 1.5 ملغم. لتر⁻¹ BAP + 1.0 ملغم. لتر⁻¹ NAA + 0.5 ملغم. لتر⁻¹ 2,4-D في حين استجابت قطع الاوراق لحث الكالس على وسط MS المدعم بتركيز 3.0 ملغم. لتر⁻¹ BAP + 1.0 ملغم. لتر⁻¹ NAA + 0.5 ملغم. لتر⁻¹ GA₃ إذ بلغت نسبة القطع المستجيبة 86.3%.

2-5: محتوى نبات كرز الأرض من مركب Physalin

يعتبر مركب Physalin Steroids 16- 24-cyclo -13,14-seco-ergostane. احد الانواع المميزه لنبات *Physalis alkekengi* يعود هذا المركب الى مجموعه الستيرويدات (Xu وآخرون، 2013). وتعود الستيرويدات إلى مجموعة كبيرة من المركبات تسمى Terpenoids او Isoprenoids وتتكون Terpenes عن طريق بلمرة وحدات Isoprene و Steroids وهي Triterpenes و Triterpenoids ويشير المصطلح Terpene الى مجموعه من النواتج الطبيعية التي تحتوي على (30) ذرة كاربون تشتق من (6) وحدات من Isoprene ويمكن ضم المركبات الحاويه على اقل من (30) ذره كاربون الى مجموعه Steroids التي تكونت من (6) وحدات من Isoprene (Ramawat ، 2008).

حتى الان هنالك أكثر من 50 نوعاً من Physalin ومركبات neophysalin التي يمكن تحويلها الى physalin من خلال تفاعلات اعادة الترتيب وتم تشخيصها من *P. angulata* و *P. lancifolia* و *P. alkekengi* و *P. minima* ولعل من أهمها Physalin A و B التي تظهر بنيتهما الفراغية في (الشكل 3) التي تم عزلها من نبات *Physalis alkekengi* (Xu وآخرون، 2013).



شكل (3): البنية الفراغية لمركبات Physalin A و B المعزولة من نبات *Physalis alkekengi* (Xu وآخرون، 2013).

ولمركب physalin أهمية طبية في معالجة العديد من الأمراض حيث أشار (Pietro وآخرون 2000) إلى أن المركب له فعالية مضادة لبكتريا *Mycobacterium tuberculosis* و *M. avium* و *M. kansasii* و *M. malmoense* و *M. intracellulare*، كما اشارت الدراسات الى ان لكل نوع من انواع الفايسلين اهمية خاصة به حيث يمتلك النوع B و F امكانيه كبيرة لمعالجه الاورام (Azlan وآخرون، 2005). بينما يعالج physalin E الحالات الحاده والمزمنة

من التهاب الجلد حيث يعتبر قوي وفعال موضعياً (Pinto وآخرون، 2010) بينما يمتلك النوع neophysalin فعالية حياتية (بايولوجية) كمضاد للورم ومضاد للمايكروبات ومضاد للملاريا ومضاد للالتهابات ومضاد للخلايا السامة (Xu وآخرون، 2013) ويلاحظ أن خليط من أنواع الفايسلين يكون أكثر فاعلية فقد استخدم

Physalin B و D و F ضد *Lishmania amazonensis* و *L. major* وهو من المثبطات القوية لنشاط الخلايا البلعمية (Guimaraes وآخرون، 2009).

وأشار Azlan وآخرون (2005) إلى أن التراكم الرئيسي لمركب Physalin يكون في النبات في مرحلة النضج، وأن مستويات التراكم العالية للمركب كانت عند مرحلة الاثمار ثم مرحلة الازهار وتنحدر في مرحلة القنوة للنباتات إلى أدناها. كما أن الأنسجة نفسها تتباين في محتواها من مركب الفايسلين إذ تحتوي الثمار الفتية على نسبة عالية من Physalin A بينما يتراكم Physalin B في الأوراق الحديثة والبراعم الزهرية والتي بدورها تحتوي على نسبة عالية من Physalin D بينما ثمار الأوراق البالغة على محتواها العالي من Physalin F وعموماً فإن محتوى أنسجة النبات الكامل تتراوح ما بين 0.07 – 9.89 ملغم. وزن طري. وقد أجريت العديد من الدراسة بغية عزل وتشخيص مركبات Physalin.

وقام Azlan وآخرون (2002) بالمقارنة بين الجذور الطبيعية لنبات *Physalis minima* والجذور الشعرية المحولة وراثياً والمستحثة بواسطة التلقيح بـ *Agrobacter rhizogens* السلالة LBA 940Z والنامية على أوساط غذائية مختلفة في ظروف الضوء والظلام في محتواها من مركب Physalin ان أعلى محتوى لكل من Physalin B و Physalin F سجل في مزارع الجذور الشعرية النامية على وسط B5 إذ بلغت قيمتها 1.82 و 4.15 ملغم. غم وزن طري على التوالي عند نموها في ظروف الظلام في حين سجلت مزارع الجذور الطبيعية قيم تراوحت بين 1.60 – 1.62 ملغم. غم وزناً طرياً لمركب Physalin B وقيم تراوحت بين 3.30 – 3.75 ملغم. غم وزن طري لمركب Physalin F وعند نفس الظروف من الزراعة.

وأشار Azlan وآخرون (2005) إلى أن محتوى الفايسلين الكلي في مزارع الكالس ومزارع الخلايا المعلقة يكون أقل مما موجود في النبات الكامل بمعدل 2.17 – 44.48 ملغم. غم وزناً رطباً وعلى التوالي، وأن أعلى محتوى لمادة الفايسلين والبالغ 1.33 ملغم. غم وزناً رطباً قد سجل

في مزارع الكالس المستحثة على قطع الجذور وتلاها في محتوى كالس الاوراق والسيقان اذ سجلت قيم بلغت 1.17 - 0.73 ملغم. غم وزناً طرياً وعلى التوالي في حين سجلت أعلى القيم المعنوية لمحتوى الفايسلين الكلي في مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان والبالغ 1.77 ملغم. غم وزن رطب والذي لم يختلف معنوياً عن قيم محتوى الفايسلين الكلي في المزارع الخلوية المشتقة من كالس الأوراق البالغ 1.50 ملغم. غم وزناً رطباً وسجلت مزارع خلايا الجذور قيمة بلغت 1.24 ملغم. غم وزناً رطباً.

وأشارت الدراسة إلى أن محتوى مزارع الكالس المشتق من الاوراق والسيقان والجذور من مركب الفايسلين نوع B لم تختلف معنوياً عن نظيراتها من مزارع المعلقات الخلوية المشتقة منها. وان أعلى القيم لمركب Physalin B والبالغة 0.68 ملغم. غم وزن رطب قد سجلت في الكالس المستحث من الأوراق في حين زادت معدلات محتوى المعلقات الخلوية من Physalin F بمعدل 1.2 - 4.0 ملغم. غم وزن رطب عن نظيراتها من مزارع الكالس فقد سجلت مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان قيمة بلغت 1.32 ملغم. غم وزن رطب في حين بلغت أعلى القيم لمركب Physalin F في مزارع الكالس المستحث من قطع الجذور، اذ سجلت قيمة بلغت 0.78 ملغم. غم وزن رطب.

الفصل الثالث

مواد العمل وطرائقه

نفذت كافة تجارب زراعة الانسجة في مختبر زراعة الخلايا والأنسجة النباتية / قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى، فقد اجريت كافة الاختبارات والتجارب في ظروف تعقيم خالية من الملوثات داخل منضدة النقل ذات الجو المعقم (Laminar airflow Cabinet) وحفظت العينات في غرفة النمو (Culture chamber) بدرجة حرارة 25 ± 2 وفي نظام الضوء والظلام المتعاقب (16 ساعة ضوء / 8 ساعة ظلام) وشدة اضاءة 2000 لوكس.

3-1: تحضير الأوساط الغذائية:

استعمل الوسط الغذائي MS الموصوف من قبل موراشيج وسكوك MS (Murashige و Skoog، 1962) (الجدول 2) المتوفر في المختبر في زراعة البذور، وفي استحثاث الكالس وإدامته، فضلا عن استعماله كوسط لتمايز الكالس وتكوين النباتات الكاملة بعد تدعيمه بمنظمات النمو المناسبة. ولتحضير لتر واحد من الأوساط المدروسة تمت إذابة 6 غم آكار (Agar-agar) في 500 مل من الماء المقطر عند درجة الغليان باستعمال جهاز الهزاز المغناطيسي ذي الصفيحة الساخنة (Hot plate magnetic stirrer)، ثم أضيفت العناصر الغذائية الكبرى والسكريز والمايوانوسيتول myo-inositol بشكل مسحوق إلى محلول الأكار وحسب الأوزان المطلوبة لكل منها أما العناصر الغذائية الصغرى والكلايسين والفيتامينات ومنظمات النمو فقد أضيفت من محاليل قياسية تم تحضيرها مسبقاً بعد أن خففت إلى التراكيز المطلوبة لتحضير 1 لتر من الوسط الغذائي. بعدها أكمل حجم محلول الوسط الغذائي إلى 1 لتر بإضافة ماء مقطر إلى خليط مكونات كل وسط. تم ضبط رقم الدالة الهيدروجينية pH ما بين (5.7-5.8) بوساطة محلول 1 عياري من هيدروكسيد الصوديوم NaOH أو حامض الهيدروكلوريك المخفف HCl. بعد الانتهاء من تحضير الوسط الغذائي تم توزيعه على قناني

زجاجية سعة 125 مل وبواقع 20 مل لكل قنينة. ثم غطيت القناني بورق الألمنيوم المقاوم للحرارة، وعقمت في جهاز المعقم بالبخار Autoclave (المؤصدة) على درجة حرارة 121°م وضغط 1.04 كغم/سم³ لمدة 15 دقيقة (المهداوي، 2013).

الجدول: (2) مكونات الوسط الغذائي MS: (Murashige و Skoog ، 1962)

ت	المادة	الصيغة	التركيز (ملغم.لتر ⁻¹)
أ-	العناصر الغذائية الكبرى		
1-	نترات الامونيوم	NH ₄ NO ₃	1650
2-	نترات البوتاسيوم	KNO ₃	1900
3-	كلوريد الكالسيوم المائي	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
4-	كبريتات المغنيسيوم المائية	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
5-	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	KH ₂ PO ₄	170
ب-	العناصر الغذائية الصغرى		
1-	حامض البوريك	H ₃ BO ₃	6.2
2-	كبريتات المنغنيز المائية	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
3-	كبريتات الخارصين المائية	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
4-	مولبيدات الصوديوم المائية	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
5-	أبيد البوتاسيوم	KI	0.83
6-	كبريتات النحاس المائية	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0.025
7-	كلوريد الكوبلت المائي	CoCl ₂ .6 H ₂ O	0.025
8-	كبريتات الحديدوز المائية	FeSO ₄ .7 H ₂ O	27.8
9-	اثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض ألكليك ثنائي أملاح الصوديوم	Na ₂ EDTA	37.25
ج-	الفيتامينات والأحماض الامينية		
1-	ثايمين حامض الهيدروكلوريك	(Thiamine-HCl)	0.1
2-	حامض النيكوتينيك	(Nicotinic acid)	0.5
3-	بايروكسين حامض الهيدروكلوريك	(Pyridoxine-HCl)	0.5
4-	كلايسين	Glycine	2
5-	مايو اينوسيتول	Myo – Inositol	100
د-	سكروز	Sucrose	30000
هـ-	آكار	Agar – Agar	6000

و-	الرقم الهيدروجيني	pH	5.8 - 5.7
ز-	مُنظّمات النمو (وفق الهدف من الدراسة) .		
ح-	ماء مقطر (ما يكفي لتكملة حجم الوسط الغذائي إلى واحد لتر) .	H ₂ O	

3-2: تعقيم الأدوات المستعملة

عُقِّمَتْ جميع أدوات ولوازم الزراعة (ملاقط ومشارط بعد لفها بورق الألمنيوم المقاوم للحرارة وأطباق البتري الزجاجية بوضعها داخل أكياس نايلون) باستخدام جهاز المعقم الحراري البخار Autoclave على درجة حرارة 121°م وضغط 1.04 كغم/سم² لمدة 25 دقيقة فضلاً عن استخدام الكحول الأيثيلي بتركيز 95% مع الحرق في تعقيم الشفرات والملاقط و70% لتعقيم الأيدي، ومنضدة انسياب الهواء الطبقي Laminar-Air Flow Cabinet خلال فترة العمل.

3-3: إنتاج بادرَات النبات *Physalis angulata* المعقمة

جمعت بذور نبات *Physalis angulata* من نباتات نامية في البيت النباتي لقسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة، بدأت عملية تعقيم البذور بغسلها بمحلول مسحوق الغسيل لمدة خمس دقائق لإزالة المواد العالقة بها ثم تركت تحت الماء الجاري لمدة 15 دقيقة، بعدئذٍ عقت البذور تعقيماً سطحياً بغمرها في محلول هايپوكلوريت الصوديوم NaOCl (القاصر في الاسواق المحلي) بتركيز 6% بنسبة 1 حجم مادة معقمة: 2 حجم ماء معقم لمدة خمس دقائق، ومن ثم غسّلت البذور بالماء المعقم ثلاث مرات بمعدل خمس دقائق/ مرة لإزالة آثار المادة المعقمة وضعت البذور المعقمة على أوراق ترشيح معقمة لإزالة الماء العالق بها. زرعت البذور المعقمة بوضعها على سطح 20 مل من وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو في قنّان زجاجية حجم 250 مل وبمعدل خمس بذور/ قنينة. حفظت العينات في الظلام لمدة ثلاثة أيام (المهداوي، 2013) وحين إنباتها نقلت إلى الظروف المشار إليها مسبقاً حتى بلوغ البادرَات من العمر 21 يوماً لاستعمالها في التجارب كما سيرد ذكرها لاحقاً.

المحور الأول: الإكثار الدقيق لنبات *Physalis angulata*

4-3: الأجزاء النباتية

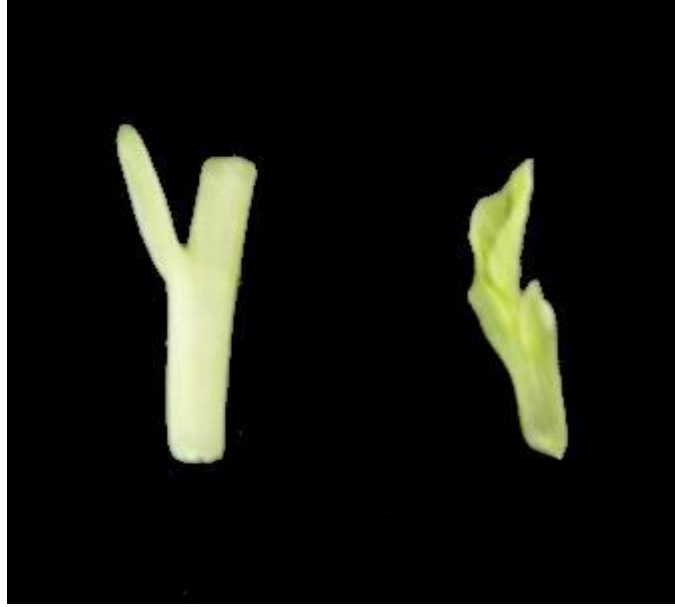
بعد إنبات البذور وبلوغها عمر 3-4 أسابيع فصلت منها الأجزاء النباتية الآتية الشكل

(4):

أ- أطراف الأفرع Shoot tips، بطول 0.5 - 1.0 سم.

ب- عقدة مفردة single node، بطول 1.0 – 1.25 سم.

أجريت عمليات الزراعة في منضدة أنسياب الهواء الطبقي المزودة بمصدر للأشعة فوق البنفسجية UV Light، إذ تم تشغيل مصدر الأشعة قبل نصف ساعة من بدء الزراعة، ورشت المنضدة بالكحول الأيثلي 70٪ قبل البدء بعملية الزراعة لتهيئة جو خالٍ من مسببات التلوث المختلفة.



شكل (4): الأجزاء النباتية المستعملة في الزراعة الجزء على اليمين يمثل طرف فرع

والجزء

الذي على اليسار يمثل عقدة مفردة لنبات كرز الأرض *Physalis*

angulata

5-3: مرحلتي النشوء والتضاعف

عدت الزراعة للأسابيع الأربعة الأولى مرحلة نشوء تم فيها زراعة الأجزاء النباتية (أطراف الأفرع والعقد) على وسط MS المجهز بتركيز مختلف من منظمات النمو، وأعيدت زراعة هذه الأجزاء Reculture لأسابيع إضافية على الأوساط السابقة نفسها وفي الظروف نفسها وعدت مرحلة تضاعف.

1-5-3 زراعة أطراف الأفرع والعقد

1-1-5-3 تأثير BA

فصلت أطراف الأفرع والعقد من البادرات الناتجة من المزارع النسيجية وزرعت على وسط MS الصلب المزود بـ BA عند التراكيز 0.5 ، 1.0 ، 1.5 ، 2.0 ملغم. لتر⁻¹ فضلاً عن معاملة المقارنة الخالية من منظمات النمو والأجزاء المذكورة أعيدت زراعتها بعد أربعة أسابيع على نفس الوسط وسجلت البيانات بعد كل مرحلة من مراحل الزراعة.

2-1-5-3 تأثير Kin.

فصلت أطراف الأفرع والعقد من البادرات الناتجة من المزارع النسيجية وزرعت على وسط MS الصلب المزود بـ Kin. بالتراكيز 1.0 ، 1.5 ، 2.0 ، 2.5 ملغم. لتر⁻¹ فضلاً عن معاملة المقارنة الخالية من منظمات النمو، والأجزاء المذكورة أعيدت زراعتها بعد أربعة أسابيع ، وسجلت البيانات بعد كل مرحلة من مراحل الزراعة. سجلت البيانات لمرحلة النشوء والتضاعف لصفة معدل عدد الأفرع ومعدل طول أطول فرع ومعدل عدد الأوراق .

6-3: مرحلة التجذير

نقلت أطراف الأفرع الناتجة من تجارب التضاعف بطول 1 – 2 سم عليها 2-3 ورقة الى وسط MS بكامل القوة التركيبية للأملاح والمزود بـ IBA او بالتراكيز 0.1 ، 0.2 ، 0.5 ، 1.0 ملغم. لتر⁻¹ فضلاً عن معاملة المقارنة الخالية من منظمات النمو، وسجلت بياناتها عن النسبة المئوية للتجذير ومعدل عدد الجذور ومعدل طول الجذور (سم) .

7-3: مرحلة الأقلمة

أُجريت أقلمة النبيتات (Plantlets) الناتجة من مرحلة التجذير بعد غسل جذورها بشكل جيد بماء الحنفية الجاري لإزالة بقايا الآكار الملتصقة بها ثم غمرت بمحلول مبيد البينوميل الفطري بتركيز 1غم. لتر⁻¹ ولمدة 5 دقائق لوقايتها من الإصابات الفطرية. ثم زرعت النبيتات في سنادين بقطر 15 سم تحوي وسط البتموس الزراعي المعقم مسبقاً في المؤصدة وبنفس

الأسلوب المستعمل لتعقيم الأوساط الغذائية، وبعد زراعة النبيتات حضنت في نفس ظروف التحضين عند نشوء الزروعات وتضاعفها مع مراعاة سقي أوساط النبيتات حسب الحاجة خلال مرحلة الأقلمة. تم تغطية النبيتات خلال الأسبوعين الأولى بأكياس البولي اثلين الشفافة للمحافظة على مستوى عالي من الرطوبة حول النبيتات ومع بداية الأسبوع الثالث تم ثقب الغطاء تدريجياً حتى أزيل بالكامل مع نهاية الأسبوع الثالث ومن ثم نقلت النباتات إلى البيت البلاستيكي إذ أصبحت جاهزة للنمو في مثل هذه الظروف.

المحور الثاني: استحثاث الكالس من الأجزاء النباتية

فصلت السيقان تحت الفلقية Hypocotyl من البادرات المعقمة بعمر ثلاثة أسابيع ونقلت إلى قناني زجاجية حجم 100 مل تحوي 20 مل من وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو كمعاملة مقارنة، فضلاً عن أوساط الاستحثاث التي أعدت لدراسة تأثير 2,4-D بتركيز 0.1 ، 0.3 ، 0.5 ، 1.0 ملغم. لتر⁻¹ متاخلاً مع BA بتركيز 0.25 ملغم. لتر⁻¹ في طبيعة استجابة الزروعات لاستحثاث الكالس، سجلت النتائج بعد مرور 4 أسابيع من الزراعة. حفظت العينات بالظروف المشار إليها سابقاً وتمت متابعة التغيرات الحاصلة في الجزء النباتي لحين اختفاء شكله وتكوين الكالس.

3-8: إدامة مزارع الكالس وتقدير أوزانها الطرية

استعمل وسط استحثاث الكالس نفسه في إدامته وتشجيع نموه وحددت المدة اللازمة لإدامة الكالس عند بدء تغير لون الكالس وظهور البقع البنية عليه مقترناً بنشقق الوسط. وخلالها تزال البقع الميتة من الكالس ويُسمّ المتبقي إلى قطع بوزن 1.0 غم. قطعة⁻¹. نقلت إلى قناني زجاجية وحفظت العينات تحت نفس ظروف الاستحثاث المشار إليها سابقاً. حسب الوزن الطري للكالس من حساب فرق وزن القناني الزجاجية ومحتوياتها قبل وبعد الزراعة الثانوية للكالس على وسط الاستحثاث ذاته.

وحددت نسبة الاستجابة وشدة الاستجابة لاستحثاث الكالس باعتماد المقياس النظري (جدول 3) الذي يقسم الكالس نظرياً إلى عدة مستويات (- ، + ، ++ ، +++) إذ يعطي الكالس القيم ثم تجمع وتقسم على التكرار للحصول على شدة الاستجابة (Saritha وآخرون، 2002).

كما تم تسجيل الملاحظات عن لون الكالس وقوامه خلال مده نموه البالغة 30 يوماً.

جدول (3): المقياس النظري للكالس

الأشارة النظرية للكالس	ماتشير الية الإشارة
-	عدم استجابة
+	استجابة ضعيفة ونشوء الكالس في أطراف القطع
++	استجابة متوسطة تصل إلى 50%
+++	استجابة عالية تفقد القطع شكلها وتتحول إلى قطع كالس بالكامل

3-9: تمايز الكالس

تضمنت عملية تمايز الكالس وضع قطعة الكالس بوزن 1.0 غم. قطعة¹⁻ من الكالس المشتقة من السيقان تحت الفلقية على وسط MS المدعم بمنظمات النمو

- NAA 0.5 + CW %15
- NAA 0.5 + BA 2.0
- TDZ بتركيز 0.5 ملغم. لتر¹⁻ منفرداً او مع 0.5 ملغم. لتر¹⁻ IBA
- Kin بتركيز 3.0 ملغم. لتر¹⁻ منفرداً او مع 1.0 ملغم. لتر¹⁻ NAA
- 2,4-D 0.5 + BA 2.0
- CW %10
- BA بتركيز 2 و3 و4 ملغم. لتر¹⁻
- TDZ بتركيز 0.5 ملغم. لتر¹⁻
- Kin بتركيز 3.0 ملغم. لتر¹⁻
- 0.5 ملغم. لتر¹⁻ Kin + 3.0 ملغم. لتر¹⁻ BA + 0.5 ملغم. لتر¹⁻ GA₃
- 0.5 ملغم. لتر¹⁻ Kin + 4.0 ملغم. لتر¹⁻ BA + 0.5 ملغم. لتر¹⁻ GA₃

3-10: التصميم التجريبي التحليل الإحصائي

نفذت جميع التجارب بوصفها تجارب بسيطة بالتصميم العشوائي الكامل CRD بعشر مكررات لكل معاملة، وتمت المقارنة بين المتوسطات باستخدام اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5% لكافة المعاملات قيد الدراسة (الراوي وخلف، 1980) وأجري التحليل الإحصائي بتوظيف الحاسوب عن طريق تحليلها ببرنامج SAS (V. 9) (SAS، 2004).

المحور الثالث: تقدير محتوى الفايسلين Physalin في مزارع الكالس

3-11: تحضير العينات النباتية

قدرت مستويات الفايسلين في مستخلصات أنسجة الكالس المشتق من السويقة تحت الفلقية بعمر 30 و 45 و 60 يوماً، فظلاً عن أنسجة أوراق النباتات البذرية النامية في الحقل عند مرحلة الأزهار. جُففت العينات اعلاه جميعها لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 60° م، ومن ثم سَحقت بهاون خزفي.

3-11-1: استخلاص وفصل الفايسلين

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Chiang وآخرون (1992) مع بعض التعديلات التي أشار إليها Azlan وآخرون (2002) في عزل الفايسلين إذ نقع 2 غرام من مسحوق العينة الجافة في 250 مل من الميثانول لمدة اسبوعين في درجة حرارة المختبر وظروف تظلم ثم رشح المستخلص من خلال أمراره خلال طبقة من ورق الترشيح (Whatman No.1) لفصل المستخلص عن بقايا العينة رُكز المستخلص حتى 50 مل من خلال تبخيره بالمبخر الدوار Rotary evaporator ثم خفف المستخلص بقليل من الماء المقطر ونقل المستخلص إلى قمع فصل حجم 250 مل وفصل الفايسلين بإضافة Hexane (30 مل × 2) لمدة خمس دقائق لكل مرة للتخلص من صبغة الكلوروفيل والصبغات الأخرى والحوامض الدهنية غسلت بعدها مستخلصات الكحولية بالكلوروفورم $CHCl_3$ (30 مل × 2) لمدة خمس دقائق لكل مرة رُكز مستخلص الكلوروفورم الحاوي على الفايسلين والمشتقات الأخرى حتى الجفاف التام من خلال تبخيره بالمبخر الدوار Rotary evaporator (RE-52A) عند 40° م، أذيب الراسب في 1.0 مل من الميثانول عندها أصبحت العينة جاهزة لعملية تشخيص وتقدير محتواها من الفايسلين.

3-11-2: التشخيص والتقدير الكمي للفايسلين بتقنية كروماتوغرافي السائل ذي الكفاءة

HPLC العالية

أجريت عملية الفصل والتشخيص لمركب الفايسلين المستخلصة من العينات المنتخبة (الفقرة 3-8) باستعمال جهاز كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي (HPLC). وقد أجريت عملية التشخيص على وفق ظروف التشخيص المناسبة لكل مركب قيد الدراسة كما سترد لاحقاً. استعمل جهاز HPLC نوع (Shimadzu 10AV-LC Japan) بعمود فصل column معدني ذي المواصفات:

الطور الثابت..... Phenomenex C-8 طول العمود 50 ملم
القطر الداخلي للعمود 2.0 ملم قطر حبيبات الحشوة..... 3 مايكرومتر
وأجريت عملية التشخيص على وفق الظروف المحددة للمركب (الجدول 4).

الجدول (4): ظروف تشخيص النموذج القياسي من الفايسلين والمركبات المفصولة من العينات المنتخبة.

الظروف	مركب الفايسلين
الطور المتحرك (v:v)	90% اسيتونتريل و 10% ماء مزال الايونات
سرعة جريان الطور المتحرك	1.1 مل/ دقيقة
حجم العينة المحقونة	20 مايكروليتر
درجة حرارة الفصل	35 م
نوع الكاشف	UV –Vis 10A –SPD spectrophotometer عند الطول الموجي 230 نانوميتر
حسب المصدر	(Azlan وآخرون، 2002)

نفذت عملية تشخيص الفايسلين للعينات قيد الدراسة اعتماداً على النماذج القياسية بإذابة 0.02 ملغم من مسحوق الفايسلين القياسي المجهز من (وزارة العلوم والتكنولوجيا) في 10 مل من الميثانول إذابة تامة.

تسجل القراءات المناسبة متضمنة مساحة المنحني وزمن الاحتباس Retention time ومن خلالها يمكن تشخيص المركب المعزول من العينات مقارنةً مع زمن احتباس العينة القياسية وحساب نسبته المئوية:

$$\text{النسبة المئوية للمركب} = 100 \times \frac{T}{S}$$

حيث T : تمثل مساحة المنحني للمركب المعزول من العينات المختبرة.

S : تمثل مساحة المنحني للمركب القياسي (المقارنة).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

4-1 مرحلة النشوء والتضاعف

زرع جزئين نباتيين تمثلا بأطراف الأفرع والعقد على أوساط غذائية تحتوي على تراكيز مختلفة من BA و Kin لبيان تأثيرهما في نشوء وتضاعف هذه الأجزاء.

4-1-1 تأثير BA في نشوء وتضاعف أطراف الأفرع

يبين الجدول (5) تأثير BA في نشوء وتضاعف أطراف أفرع نبات كرز الأرض، أذ عدت الأسابيع الأربع الأولى مرحلة لنشوء المزارع النسيجية اذ تشير نتائجها الى عدم وجود اختلافات معنوية بين المعاملات لصفة معدل عدد الأفرع إلا أن أعلى قيمة لهذه الصفة وباللغة 2.8 فرع. جزء نباتي¹⁻ قد سجلت في الأجزاء النباتية المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 0.5 ملغم. لتر¹⁻ BA (شكل 5:A) وانخفضت هذه القيمة الى أدناها اذ بلغت 1.7 فرع. جزء نباتي¹⁻ (شكل 5:B) في اطراف الافرع المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 2.0 ملغم لتر¹⁻ BA، بينما سجلت المعاملة 0.5 ملغم. لتر¹⁻ أعلى قيمة لطول أطول فرع وباللغة 6.1 سم متفوقة بذلك على جميع المعاملات الأخرى في حين سجلت هذه الصفة أدنى القيم 2.5 سم عند معاملة المقارنة والمعاملة 1.5 ملغم. لتر¹⁻ أما لصفة معدل عدد الاوراق فقد سجلت أعلى القيم وباللغة 3.9 ورقة. فرع¹⁻ عند المعاملة 1.5 ملغم. لتر¹⁻ BA والتي لم تختلف معنويا عن باقي المعاملات، الا انها تفوقت معنويا عن المعاملة 1.0 ملغم لتر¹⁻ التي انحدرت بها القيمة إلى أدناها إذ سجلت قيمة بلغت 1.8 ورقة. فرع¹⁻.

وعند تسجيل بيانات هذه الصفات بعد ثمانية أسابيع بوصفها مرحلة التضاعف، فقد سجلت صفة معدل عدد الأفرع المتضاعفة قيمة بلغت 6.0 فرع. جزء نباتي¹⁻ عند التركيز 1.5 ملغم لتر¹⁻ (شكل 5:C) وانخفضت هذه القيمة إلى أدناها عند معاملة المقارنة (شكل 5:D)، إذ سجلت قيمة بلغت 3.2 فرع. جزء نباتي¹⁻ وسجلت المعاملة 2.0 ملغم لتر¹⁻ BA أعلى القيم لصفة معدل طول أطول فرع بلغ 6.1 سم بالمقارنة بقيمة 2.5 سم التي سجلتها افرع معاملة المقارنة وجاءت نتائج صفة معدل عدد الاوراق مماثلة لاتجاه صفة اطول فرع فقد سجلت المعاملة 2.0 ملغم. لتر¹⁻ BA أعلى القيم المعنوية وباللغة 6.7 ورقة. فرع¹⁻ التي لم تختلف معنويا عن المعاملة 0.5 ملغم لتر¹⁻ BA وقد سجلت قيمة بلغت 5.2 ورقة. فرع¹⁻ وسجلت اقل القيم المعنوية عند معاملة المقارنة وباللغة 3.2 ورقة. فرع¹⁻.

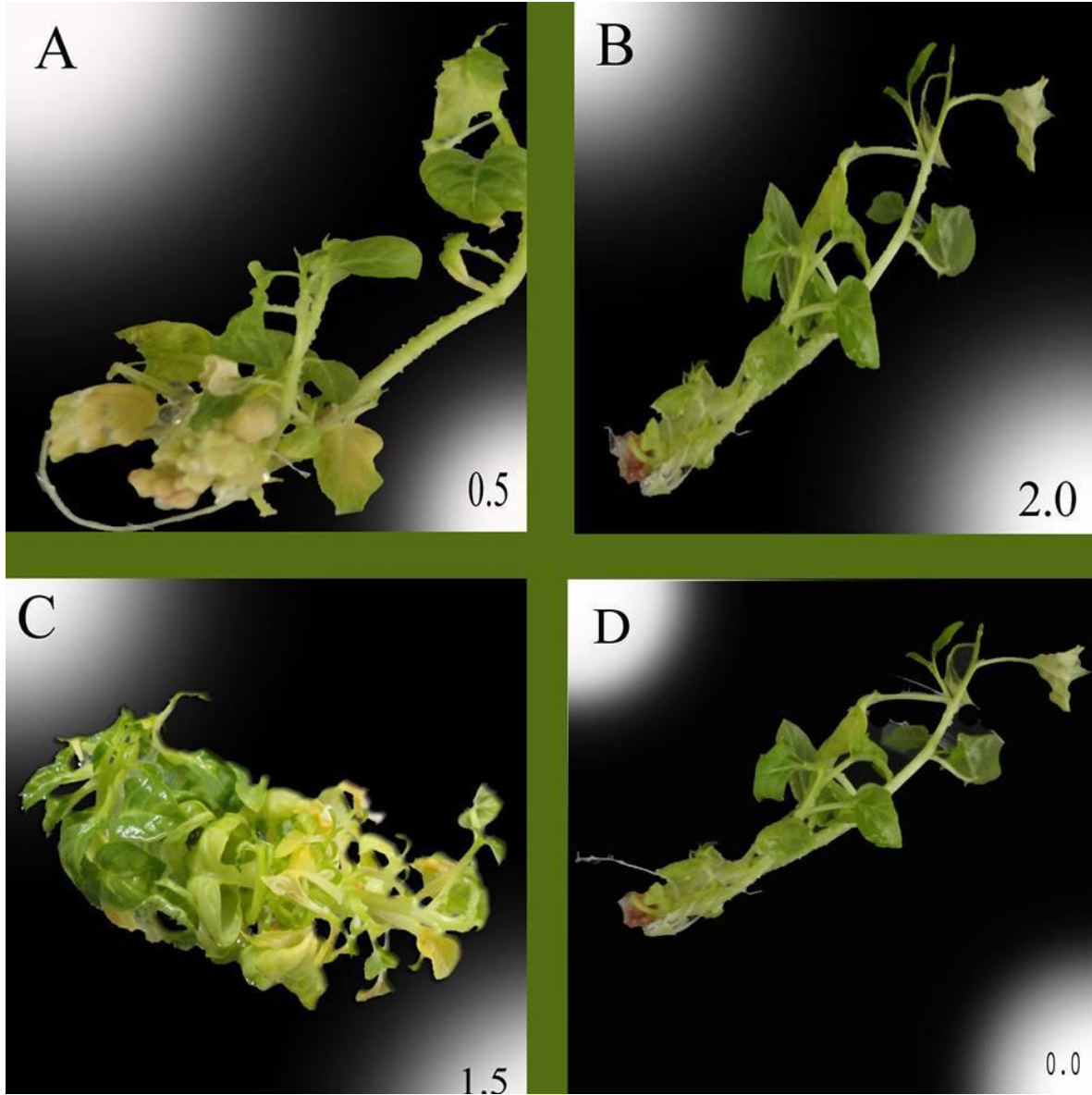
الجدول(5): تأثير تراكيز مختلفة من BA في نشوء وتضاعف أطراف أفرع نبات *P. angulata*

المفصولة من بادرات معقمة من زراعتها على وسط MS الصلب.

(مرحلة التضاعف) بعد 8 أسابيع			(مرحلة النشوء) بعد 4 أسابيع			تركيز BA ملغم .لتر ⁻¹
عدد الاوراق (ورقة.فرع ⁻¹)	طول اطول فرع (سم)	عدد الافرع (فرع. جزء نباتي ⁻¹)	عدد الاوراق (ورقة. فرع ⁻¹)	طول اطول فرع (سم)	عدد الافرع (فرع. جزء نباتي ⁻¹)	
3.2 ج	2.5 ب	3.2 ب	2.5 أ ب	4.0 أ ب	2.1 أ	0.0
5.2 أ ب	5.0 أ	4.0 أ ب	3.1 أ ب	6.1 أ	2.8 أ	0.5
3.9 ب ج	2.7 ب	3.8 أ ب	1.8 ب	5.0 أ ب	1.8 أ	1.0
4.8 ب ج	4.0 أ ب	6.0 أ	3.9 أ	2.5 ب	2.7 أ	1.5
6.7 أ	6.1 أ	4.8 أ ب	3.7 أ ب	2.7 ب	1.7 أ	2.0

الأرقام ذات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنويًا فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى

احتمال 0.05



شكل (5): أطراف أفرع نبات كرز الأرض *P. angulata* مزروعة على وسط MS المجهز بـ BA بعد أربعة أسابيع من الزراعة (A) بتركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹ (B) بتركيز 2.0 ملغم. لتر⁻¹ وبعد ثمانية أسابيع من الزراعة (C) بتركيز 1.5 ملغم. لتر⁻¹ (D) بتركيز 0.0

4-1-2 تأثير BA في نشوء وتضاعف الأفرع من العقد

يبين الجدول (6) تأثير BA في نشوء وتضاعف الأفرع من عقد نبات كرز الأرض، عدت الأربع أسابيع الأولى مرحلة لنشوء المزارع النسيجية، تشير نتائج مرحلة النشوء إلى وجود اختلافات معنوية بين المعاملات لصفة معدل عدد الأفرع، فقد سُجلت أعلى قيمة لهذه الصفة والبالغة 4.7 أفرع. جزء نباتي⁻¹ في الأجزاء النباتية المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز

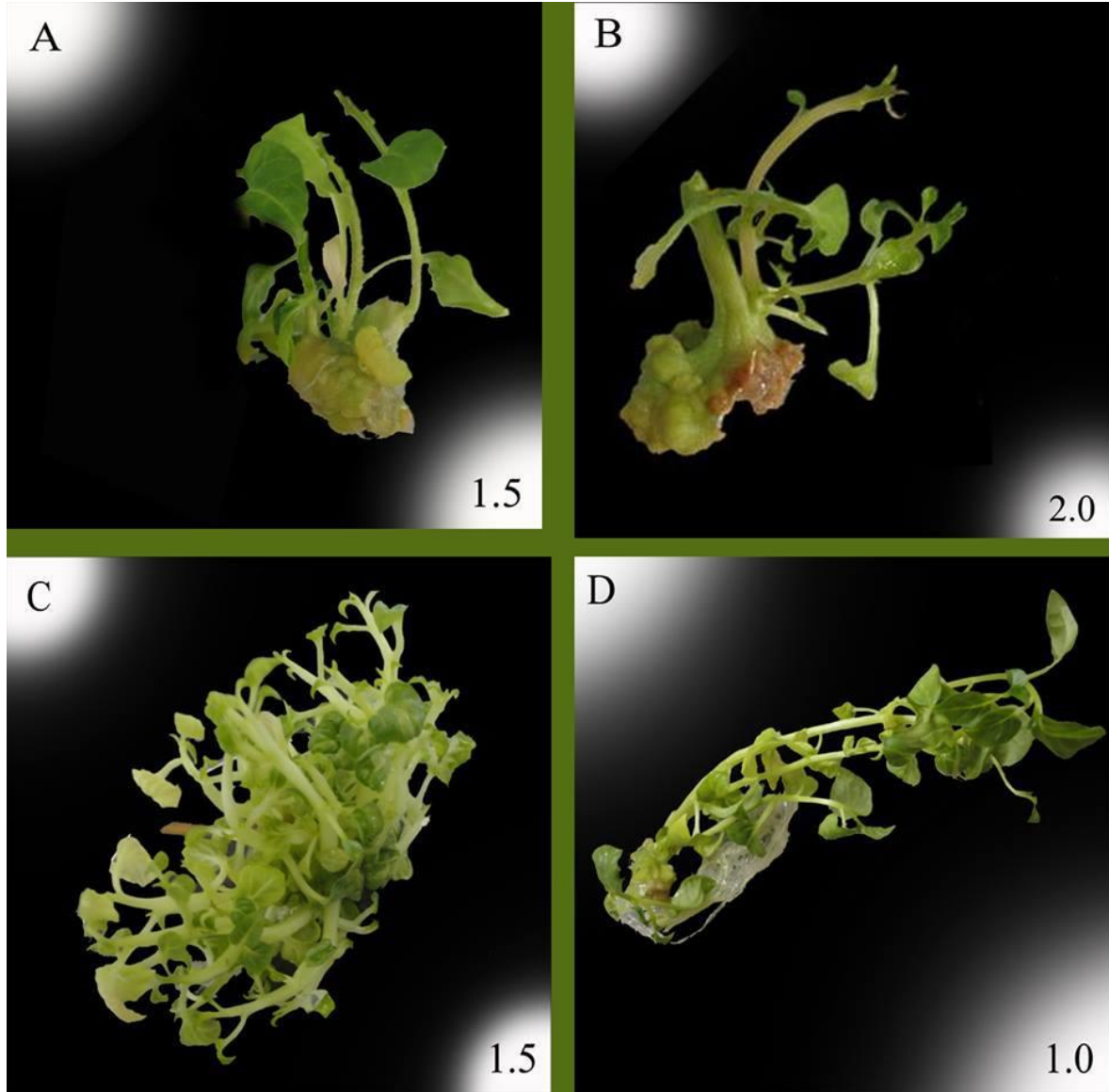
1.5 ملغم. لتر⁻¹ BA (شكل 6: A) وانحدرت هذه القيمة الى ادناه اذ بلغت 2.0 فرع. جزء نباتي¹ (شكل 6: B) في العقد المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹ BA. وقد سجلت معاملة المقارنة اعلى قيمة لطول اطول فرع والبالغه 3.5 سم متفوقه بذلك معنويا على جميع المعاملات الأخرى في حين سجلت هذه الصفة ادنى القيم 1.0 سم عند المعاملة 2.0 ملغم. لتر⁻¹ اما لصفة معدل عدد الأوراق فقد سجلت أعلى القيم والبالغة 4.1 ورقة. فرع¹ عند معاملة المقارنة والمعاملة 1.5 ملغم. لتر⁻¹ BA والتي لم تختلف معنويا عن باقي المعاملات الاخرى في حين انحدرت القيم إلى أدناها عند المعاملة 2.0 ملغم. لتر⁻¹ ، فقد سجلت قيمة بلغت 2.9 ورقة. فرع¹.

وعند تسجيل بيانات هذه الصفات لمرحلة التضاعف فقد سجلت صفة معدل عدد الافرع المتضاعفة قيمة بلغت 10.0 فرع. جزء نباتي¹ عند التركيز 1.5 ملغم. لتر⁻¹ وقد اختلفت معنويا عن باقي القيم وانحدرت هذه القيمة ادناه عند المعاملة 1.0 ملغم. لتر⁻¹ BA (شكل 6: C) اذ سجلت قيمة بلغت 3.0 فرع. جزء نباتي¹ (شكل 6: D) وسجلت معاملة المقارنة اعلى القيم لصفة معدل طول اطول فرع بلغ 4.6 سم بالمقارنة بقيمة 1.7 سم التي سجلتها أفرع المعاملة 2.0 ملغم. لتر⁻¹ وجاءت نتائج صفة معدل عدد الاوراق التي لم تختلف معنويا فيما بينها فقد سجلت المعاملة 1.5 ملغم. لتر⁻¹ BA اعلى القيم والبالغة 4.0 ورقة. فرع¹ بينما سجلت أقل القيم المعنوية عند معاملة المقارنة والبالغة 3.0 ورقة. فرع¹.

الجدول(6): تأثير تراكيز مختلفة من BA في نشوء وتضاعف العقد لنبات كرز الأرض *P. angulata* المفصولة من بادرات معقمة من زراعتها على وسط MS الصلب.

(مرحلة التضاعف)			(مرحلة النشوء)			تركيز BA ملغم.لتر ⁻¹
عدد الاوراق (ورقه. فرع ⁻¹)	طول اطول فرع (سم)	عدد الافرع (فرع. جزء نباتي ⁻¹)	عدد الاوراق (ورقه. فرع ⁻¹)	طول اطول فرع (سم)	عدد الافرع (فرع. جزء نباتي ⁻¹)	
أ 3.0	أ 4.6	ب 4.0	أ 4.1	أ 3.5	ب 2.3	0.0
أ 3.4	أب 3.1	ب 3.5	أ 3.1	ب 1.4	ب 2.0	0.5
أ 3.3	أب 3.6	ب 3.0	أ 3.4	ب 1.3	ب 2.1	1.0
أ 4.0	أب 2.7	أ 10.0	أ 4.1	أب 1.8	أ 4.7	1.5
أ 3.7	ب 1.7	ب 6.0	أ 2.9	ب 1.0	أب 3.2	2.0

الأرقام ذات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنويًا فيما بينها على وفق اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05.



شكل (6): عقد نبات كرز الأرض *P. angulata* مزروعة على وسط MS المجهز بـ BA بعد أربعة أسابيع

(A) بتركيز 1.5 ملغم. لتر⁻¹ (B) بتركيز 2.0 ملغم. لتر⁻¹ بعد ثمانية أسابيع (C) بتركيز 1.5 ملغم. لتر⁻¹ (D) بتركيز 1.0 ملغم. لتر⁻¹

4-1-3 تأثير Kin في نشوء وتضاعف أطراف الأفرع :

يبين الجدول (7) تأثير Kin في نشوء وتضاعف أطراف افرع نبات كرز الأرض. اذ تشير نتائج مرحلة النشوء إلى صفة معدل عدد الأفرع إلا أن أعلى قيمة لهذه الصفة البالغة 3 فرع . جزء نباتي⁻¹ قد سجلت في الأجزاء النباتية المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 1.5 ملغم لتر⁻¹ Kin (شكل 7A) وانحدرت هذه القيم الى ادناه اذ بلغت 1.1 فرع. جزء نباتي⁻¹)

شكل 7: B) في أطراف الأفرع المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 1.0 ملغم لتر⁻¹ Kin وقد سجلت المعاملة 2.5 ملغم لتر⁻¹ أعلى قيمة لطول أطول فرع وباللغة 3.8 سم متفوقة بذلك على جميع المعاملات الأخرى فيما عدا المعاملة 2.0 و 1.5 ملغم لتر⁻¹ Kin التي سجلت قيم بلغت 3.4 و 2.9 سم على التوالي في حين سجلت هذه الصفة أدنى القيم 0.7 سم عند المعاملة 1.0 ملغم لتر⁻¹ أما لصفة معدل عدد الأوراق فقد سجلت أعلى القيم إذ بلغت 4.6 ورقة. جزء نباتي¹ عند المعاملة 2.0 ملغم لتر⁻¹ Kin وقد اختلفت معنويا عن باقي المعاملات الأخرى باستثناء المعاملة 1.5 ملغم. لتر⁻¹ وسجلت المعاملة 1.0 ملغم. لتر⁻¹ Kin أدنى القيم لهذه الصفة وباللغة 1.8 ورقة. فرع¹.

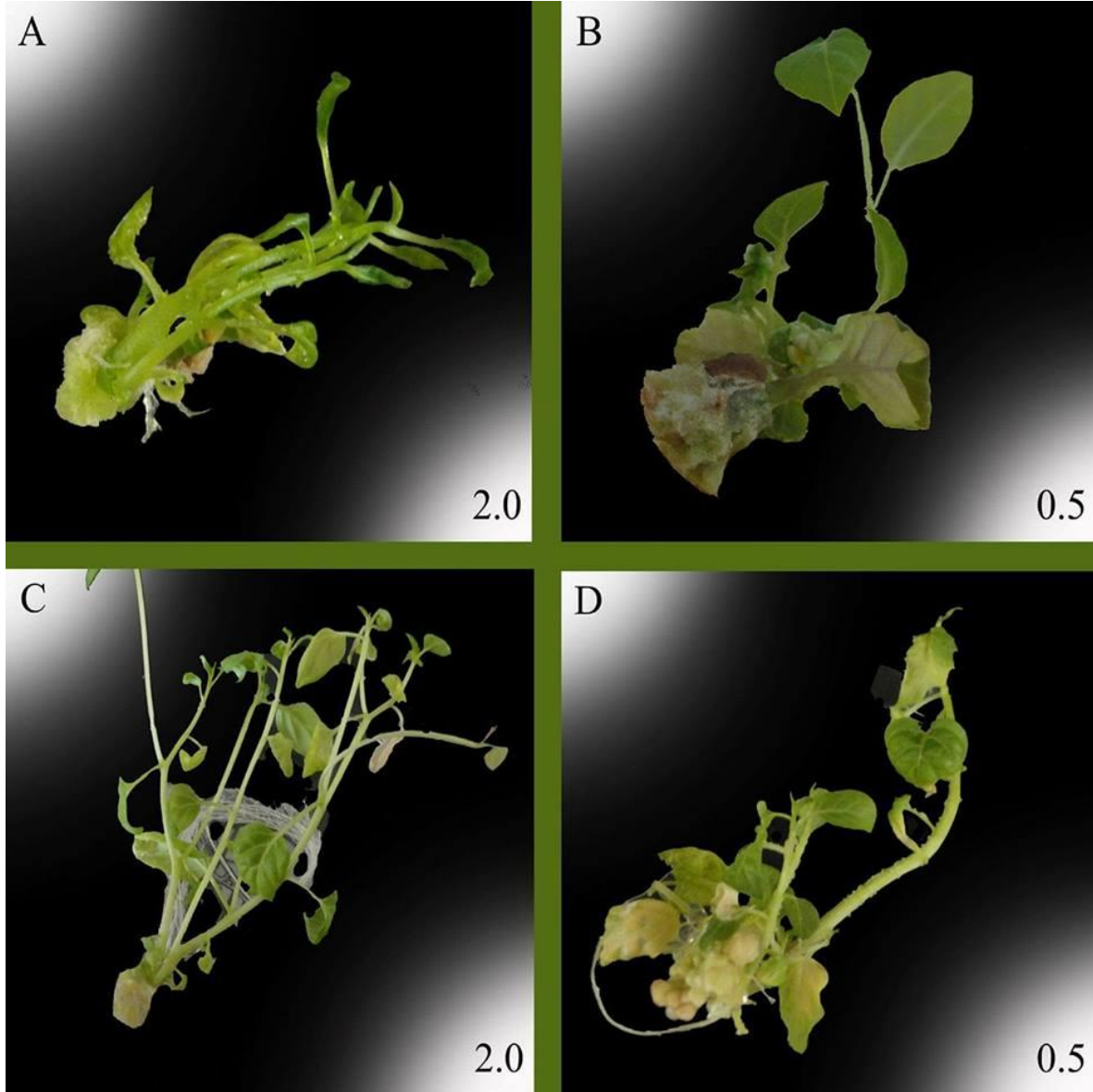
وعند تسجيل بيانات هذه الصفات لمرحلة التضاعف فقد سجلت صفة معدل عدد الأفرع المتضاعفة أعلى القيم البالغة 3.8 فرع. جزء نباتي¹ عند التركيز 1.5 ملغم لتر⁻¹ Kin (شكل 7: C) وانحدرت هذه القيمة الى ادناه عند المعاملة 1.0 ملغم لتر⁻¹ Kin (شكل 7: D) إذ سجلت قيمة بلغت 1.7 فرع. جزء نباتي¹. وسجلت المعاملة 2.5 ملغم. لتر⁻¹ Kin أعلى القيم لصفة معدل طول أطول فرع بلغ 4.1 سم بالمقارنة بقيمة 1.8 سم التي سجلتها افرع المعاملة 1.0 ملغم. لتر⁻¹. وسجلت المعاملة 2.0 ملغم. لتر⁻¹ Kin أعلى القيم لصفة معدل عدد الاوراق وباللغة 4.7 ورقة. فرع¹ والتي لم تختلف معنويا عن باقي معدلات القيم الأخرى وسجلت أقل القيم عند المعاملة 1.0 ملغم. لتر⁻¹ وباللغة 2.5 ورقة. فرع¹.

الجدول (7): تأثير تراكيز مختلفة من Kin في نشوء وتضاعف اطراف أفرع نبات كرز الأرض *P.angulata* المفصولة من بإدرات معقمة من زراعتها على وسط MS الصلب

(مرحلة التضاعف)			(مرحلة النشوء)			تركيز Kin ملغم. لتر ⁻¹
عدد الاوراق (ورقة. جزء نباتي ¹)	طول اطول فرع (سم)	عدد الافرع (فرع. جزء نباتي ¹)	عدد الاوراق (ورقة. فرع ¹)	طول اطول فرع (سم)	عدد الافرع (فرع. جزء نباتي ¹)	
3.2 أ	3.0 أ	3.2 أب	2.6 ب ج	1.6 ج	2.1 أب	0.0
2.5 أ	1.8 ب	1.7 ج	1.8 ج	0.7 ج	1.1 ب	1.0
4.6 أ	3.6 أ	3.8 أ	3.6 أب	2.9 أب	3.0 أ	1.5
4.7 أ	3.9 أ	3.2 أب	4.6 أ	3.4 أب	2.6 أ	2.0

أ 3.9	أ 4.1	أ 3.7	ب ج 2.8	أ 3.8	أ 2.7	2.5
-------	-------	-------	---------	-------	-------	-----

الأرقام ذات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنويًا فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05.



شكل (7): أطراف افرع نبات كرز الأرض *P. angulata* مزروعة على وسط MS المجهز بـ Kin بعد أربعة أسابيع (A) بتركيز 2.0 ملغم. لتر⁻¹ (B) بتركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹ بعد ثمانية أسابيع (C) بتركيز 2.0 ملغم لتر⁻¹ (D) بتركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹

4-1-4 تأثير Kin في نشوء وتضاعف الأفرع من العقد

يبين الجدول (8) تأثير Kin في نشوء وتضاعف عقد نبات كرز الأرض وتظهر بيانات الصفات لمرحلة النشوء إلى وجود اختلافات معنوية بين المعاملات لصفة معدل عدد الأفرع وان أعلى قيمة لهذه الصفة والبالغة 5.0 فرع. جزء نباتي¹⁻ قد سجلت في الأجزاء النباتية المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 2.0 ملغم. لتر¹⁻ Kin (شكل 8: A) وانحدرت هذه القيمة إلى أدناه ، إذ بلغت 2.1 فرع. جزء نباتي¹⁻ (شكل 8: B) في الأجزاء النباتية المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 1.0 ملغم. لتر¹⁻ والتركيز 2.5 ملغم. لتر¹⁻ Kin. وقد سجلت أعلى القيم لصفة طول أطول فرع والبالغة 3.5 سم عند معاملة المقارنة التي لم تختلف معنويا عن باقي معدلات القيم الأخرى. أما صفة معدل عدد الأوراق فقد سجلت أعلى القيم والبالغة 4.5 ورقة. جزء نباتي¹⁻ عند المعاملة 1.5 ملغم. لتر¹⁻ Kin التي لم تختلف معنويا عن باقي المعاملات.

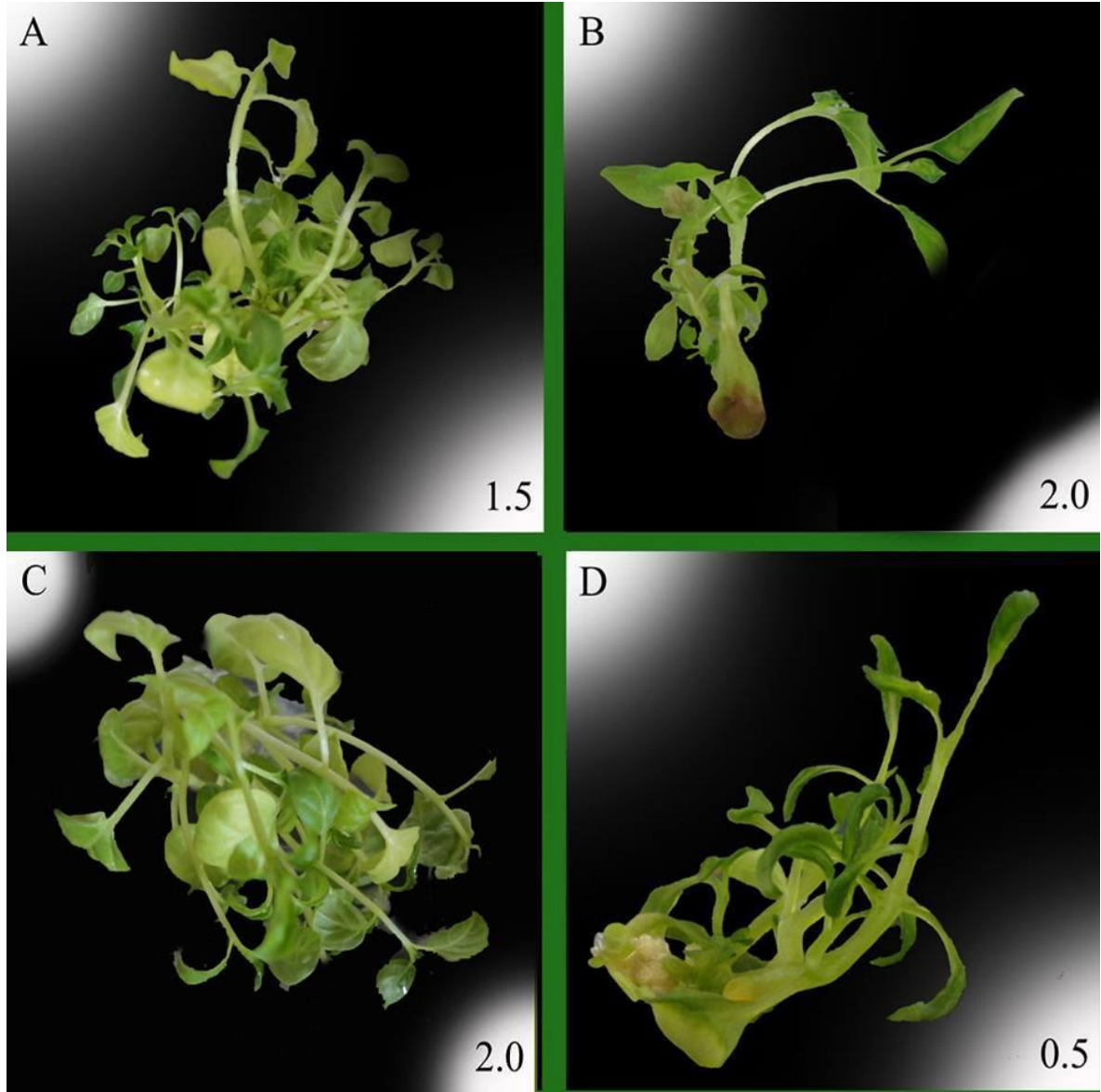
وعند تسجيل بيانات هذه الصفات لمرحلة التضاعف فقد سجلت صفة معدل عدد الأفرع المتضاعفة قيمة بلغت 9.0 فرع. جزء نباتي¹⁻ عند التركيز 2.0 ملغم. لتر¹⁻ متفوقة معنويا على جميع المعاملات الأخرى (شكل 8: C). وانحدرت هذه القيمة إلى أدناها عند المعاملة 1.0 ملغم. لتر¹⁻ (شكل 8: D) إذ سجلت قيمة بلغت 2.6 فرع. جزء نباتي¹⁻ ، وسجلت معاملة المقارنة أعلى القيم لصفة معدل طول أطول فرع بلغ 4.6 سم بالمقارنة بقيمة 1.3 سم التي سجلتها افرع المعاملة 1.0 ملغم. لتر¹⁻ وجاءت نتائج صفة معدل عدد الأوراق مسجلة أعلى القيم والبالغة 3.9 ورقة. فرع¹⁻ عند كل من المعاملات 1.5 ملغم. لتر¹⁻ Kin و 2.5 ملغم. لتر¹⁻ Kin التي لم تختلف معنويا عن باقي المعاملات الأخرى وسجلت أقل القيم المعنوية عند معاملة المقارنة والبالغة 3.0 ورقة . فرع¹⁻ .

الجدول(8): تأثير تراكيز مختلفة من Kin في نشوء وتضاعف الأفرع من عقد نبات كرز الأرض *Physalis angulata* المفصولة من بادرات معقمة من زراعتها على وسط MS الصلب

معدل Kin	بعد أربعة أسابيع (مرحلة النشوء)	بعد ثمانية أسابيع (مرحلة التضاعف)
-------------	---------------------------------	-----------------------------------

ملغم. لتر ⁻¹	عدد الأفرع (فرع. جزء نباتي ⁻¹)	طول أطول فرع (سم)	عدد الاوراق (ورقة. فرع ⁻¹)	عدد الأفرع (فرع. جزء نباتي ⁻¹)	طول أطول فرع (سم)	عدد الأوراق (ورقة. فرع ⁻¹)
0.0	2.3 ب	3.5 أ	4.1 أ	4.0 ب	4.6 أ	3.0 أ
1.0	2.1 ب	1.2 أ	3.3 أ	2.6 ب	1.3 ج	3.1 أ
1.5	2.8 ب	1.4 أ	4.5 أ	3.3 ب	3.1 أب	3.7 أ
2.0	5.0 أ	2.0 أ	3.1 أ	9.0 أ	3.3 أ ب	3.9 أ
2.5	2.1 ب	1.3 أ	2.7 أ	2.7 ب	1.8 ب ج	3.9 أ

الأرقام ذات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنويًا فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05.



شكل (8): عقد نبات كرز الأرض *P. angulata* مزروعة على وسط MS المجهز بـ Kin بعد أربعة أسابيع

(A) بتركيز 1.5 ملغم. لتر⁻¹ (B) بتركيز 2.0 ملغم. لتر⁻¹ بعد ثمانية أسابيع (C) بتركيز 2.0 ملغم. لتر⁻¹ (D) بتركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹

ان الهدف من محور الاكثار الدقيق هو إثبات فعالية هذه التقنية في الحصول على أقصى عدد من الأفرع من الأجزاء النباتية وإن نجاح الإكثار الدقيق لايعتمد فقط على اختيار الجزء النباتي بل هناك العديد من العوامل التي تؤثر في نمو وتطور الجزء النباتي الذي ينعكس بالنتيجة على سير العمليات الأيضية الحيوية داخله، ولعل من أحد هذه العوامل هو اختلاف الإضافات الخارجية من منظمات النمو إلى الوسط الغذائي ومنها ما استخدم لعملية التضاعف في هذه التجربة من الساييتوكاينينات التي اشتملت على اضافة BA و Kin.

وعموماً تشير نتائج تضاعف الجدول (5 و 6) (7 و 8) إلى أن إضافة BA و Kin أدى إلى تحفيز التضاعف والسبب في ذلك يعود إلى دور السايتوكاينينات التي تلعب دوراً معروفاً في تشجيع البراعم الأبطية وتحررها من تأثير السيادة القمية للبراعم الطرفية إذ تعمل السايتوكاينينات المضافة إلى الوسط والتي تتحرك بعد سحبها من الوسط الغذائي من قبل الجزء النباتي إذ تتحرك داخلة من الأسفل إلى الأعلى مارة بالبراعم الأبطية وبذلك تلغي تأثير الأوكسينات التي قد تتجمع بتركيز عالية في هذه البراعم وبالتالي تعمل السايتوكاينينات على أحداث التمايز الوعائي بين البراعم الأبطية مع مثيلاتها في الساق وبهذا تسهل عملية نقل الماء والمغذيات الأمر الذي يؤدي إلى تحفيزها على النمو والتطور إلى أفرع جانبية (خليفة، 1987).

إن عملية التضاعف والنشوء تعتمد على نوع الجزء النباتي فقد تعتبر القمم النامية والعقد من أفضل الأجزاء النباتية التي تعطي استجابة عالية إذ تعطي العقد استجابة عالية على وسط MS المزود بالسايتوكاينينات متمثلة بالحصول على أعداد عالية من الأفرع وبأطوال مناسبة بينما يتم الحصول على أطول الأفرع من زراعة قمة الأفرع على وسط MS المدعم بالسايتوكاينينات والسبب قد يعود إلى تمايز الأنسجة الوعائية للعقد قياساً بأطراف الأفرع مما يزيد من كفاءة الأمتصاص (عبيد، 2009). فالعقد تتأثر بشكل كبير بالسايتوكاينينات مثل BA فعندما يكون بتركيز مختلفة يلاحظ استجابات مختلفة خلال فترة نموها لكن عند زيادة تركيز BA ينتج عنه انخفاض في العدد والطول (Aruna وآخرون، 2012). أشارت نتائج تضاعف الجدول (6) إلى انخفاض في معدل عدد الأفرع عن التراكيز العالية من BA وقد يعزى السبب إلى أن مثل هذه التراكيز تعد ذات تأثير تثبيطي ويؤدي تجمعها إلى زيادة عمليات الهدم (إبراهيم وآخرون، 2012).

إما لصفة طول الأفرع يلاحظ أن زيادة عدد الأفرع المتضاعفة في الأجزاء المستجيبة لأفضل تركيز من BA انعكس سلباً على طول هذه الأفرع وهذا قد يعزى إلى تنافس الأجزاء النباتية المزروعة على وسط MS في الحصول على المواد الغذائية والهرمونات اللازمة للنمو (حمد والجبوري، 2014).

ويلاحظ بأن BA أكثر تأثيراً من Kin حيث أعطى BA أكثر عدداً من الأفرع المتضاعفة من Kin ولجميع التراكيز المستخدمة والسبب الذي يجعل BA أكثر فعالية من Kin يعود إلى الاختلاف في الصيغة التركيبية بين المادتين إذ تتميز السلسلة الجانبية لل BA باحتوائها على حلقة البنزين التي تمتلك ثلاث أواصر مزدوجة مقارنة ب Kin الذي يمتلك سلسلته

الجانبية على أصرتين مزدوجتين وهذا ما يحدث الفرق بين فعالية المادتين إذ إن زيادة عدد الاواصر المزدوجة معناه زيادة الفعالية (Davies ، 1995).

(امين ومحمد، 2010) وبالتالي يكون BA أكثر تأثيرا في انقسام الخلايا واتساعها بالحجم وتمايزها وبالتالي زيادة تأثيره في عملية النمو والتطور مما يجعله احد ابرز السايبتوكاينينات المستخدمة في تضاعف افرع العديد من الانواع النباتية.

4-2- تأثير IBA على مرحلة التجذير

يبين الجدول (9) تأثير IBA في تجذير أطراف الأفرع الناتجة من الزراعة النسيجية من زراعتها على وسط MS كامل تركيز الاملاح اذ اشارت النتائج ان جميع المعاملات استجابت للتجذير وتراوحت نسبة التجذير بين 60 - 100% . وتوقت المعاملة بتركيز 0.2 ملغم. لتر⁻¹ من IBA حيث اعطت اعلى معدل لعدد الجذور بلغ 16.0 جذر. فرع⁻¹ (شكل 9: C) الا انها لم تختلف معنويا عن معاملة المقارنة والتي سجلت قيمة بلغت 12.8 جذر. فرع⁻¹ (شكل 9: A) وانحدرت قيم هذه الصفة الى ادناها عند المعاملة بتركيز 1.0 ملغم. لتر⁻¹ إذ سجلت قيمة بلغت 5.8 جذر⁻¹ فرع (شكل 9: E) بينما اعطت المعاملة 0.1 ملغم. لتر⁻¹ اعلى معدل لطول الجذر 9.8 سم (شكل 9: B).

يلاحظ من نتائج الجدول (9) ان وجود الاوكسين في الوسط ضروري لتكوين الجذور فقد لوحظ أن الانقسام الأولي للخلايا لنشوء الجذور يعتمد المعاملة بالاوكسين المضاف والاوكسين الداخلي (Sheeba وآخرون، 2010) اذ يعد أحد العوامل الثلاثة المساعدة في عملية حث التجذير والمتضمنة مركب الاورثوداهايدروكسي فينول ortho - dihydroxy phenol والاوكسين والأنزيم بولي فينول اوكسيداز Polyphenol oxidase في تكوين معقد الرايزوكالين المتواجد في انسجة الدائرة المحيطية والذي يعد الخطوة الأولى لنشوء الجذور (Hartmann وآخرون، 2002).

وان استجابة معاملة المقارنة للتجذير تشير الى احتواء الافرع على مستويات مناسبة من الأوكسين الطبيعي اللازمة لحث التجذير فضلا عن ان النباتات العشبية تمتاز بمحتواها العالي من منظمات النمو .

وبالرغم من ان IAA هو الهرمون الطبيعي من الاوكسينات التي تمتلك التأثير الفعال في مواقع نشوء الجذور العرضية بعد انتقاله من مواقع التصنيع الأساسية لكن يستعمل IBA اليوم بشكل واسع تجذير العقل اذ تشير الدراسات الحديثة الى انه يصنع في النبات بشكل طبيعي ولكن بكميات اقل من IAA والذي يكون تأثيره اما من خلال تحولة الى (IAASP) - Indol - acetyl - aspartic acid - 3 الذي يلاحظ زيادة تركيزه في مواقع نشوء الجذور قبل عملية

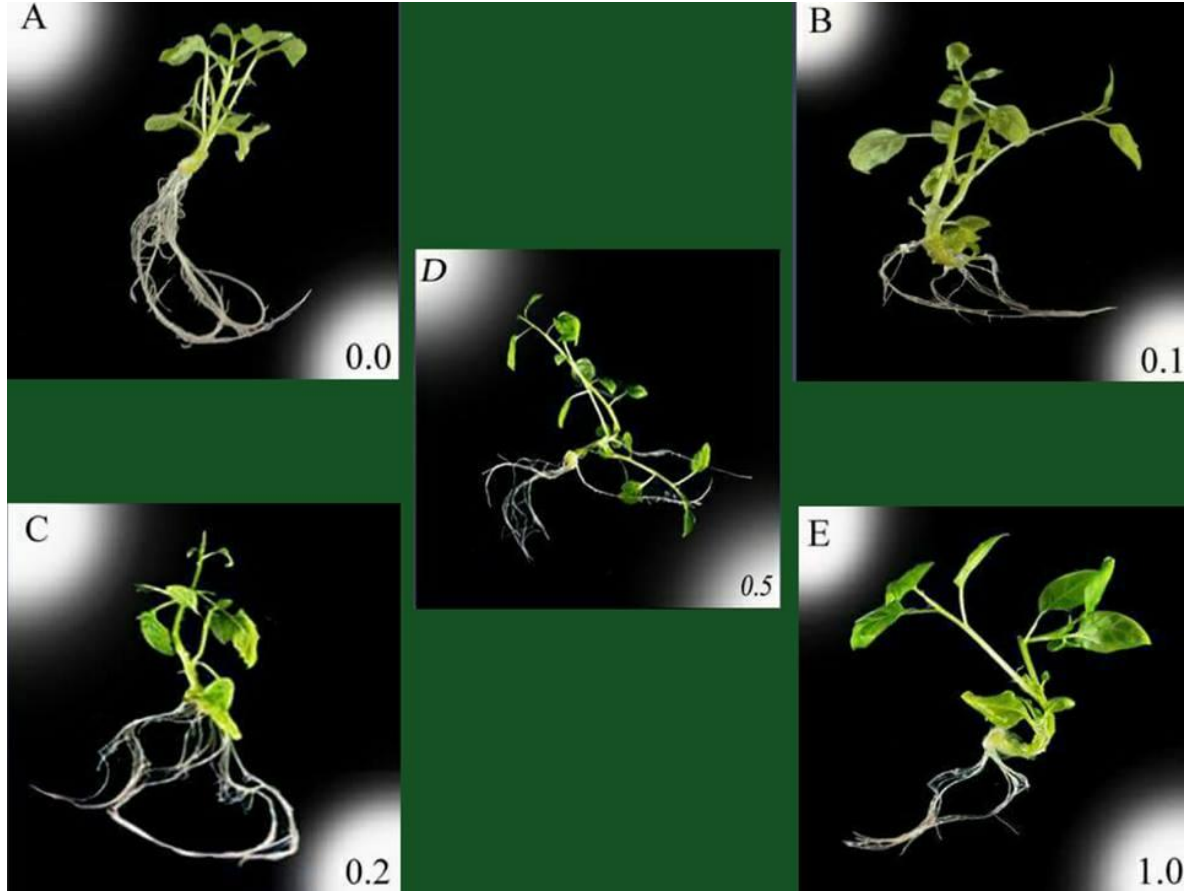
الحث لعملية التجذير (Garcia وآخرون، 1994) أو إضافة IBA الحر الداخلي الموجود في النبات ومن ثم يزيد من الحث على التجذير (Vander وآخرون، 1993). ويلاحظ أن التركيز العالي من الاوكسين قد يكون له تأثيرا معاكسا مما يؤدي الى قلة نسبة الاستجابة والذي ينعكس بالنتيجة على عدد الجذور المتكونة.

الجدول (9): تأثير IBA في تجذير أطراف الأفرع الناتجة من الزراعة النسيجية لنبات *Physalis*

angulata بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS الصلب.

تركيز IBA (ملغم. لتر ⁻¹)	نسبة التجذير (%)	معدل عدد الجذور	معدل طول الجذور (سم)
0.0	100	12,8 أب	5,7 ب
0.1	100	6.8 أب	9.8 أ
0.2	80	16.0 أب	6.0 ب
0.5	100	6.8 أب	6.3 ب
1.0	60	5.8 أب	6.8 ب

الأرقام ذات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنويا فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05 .



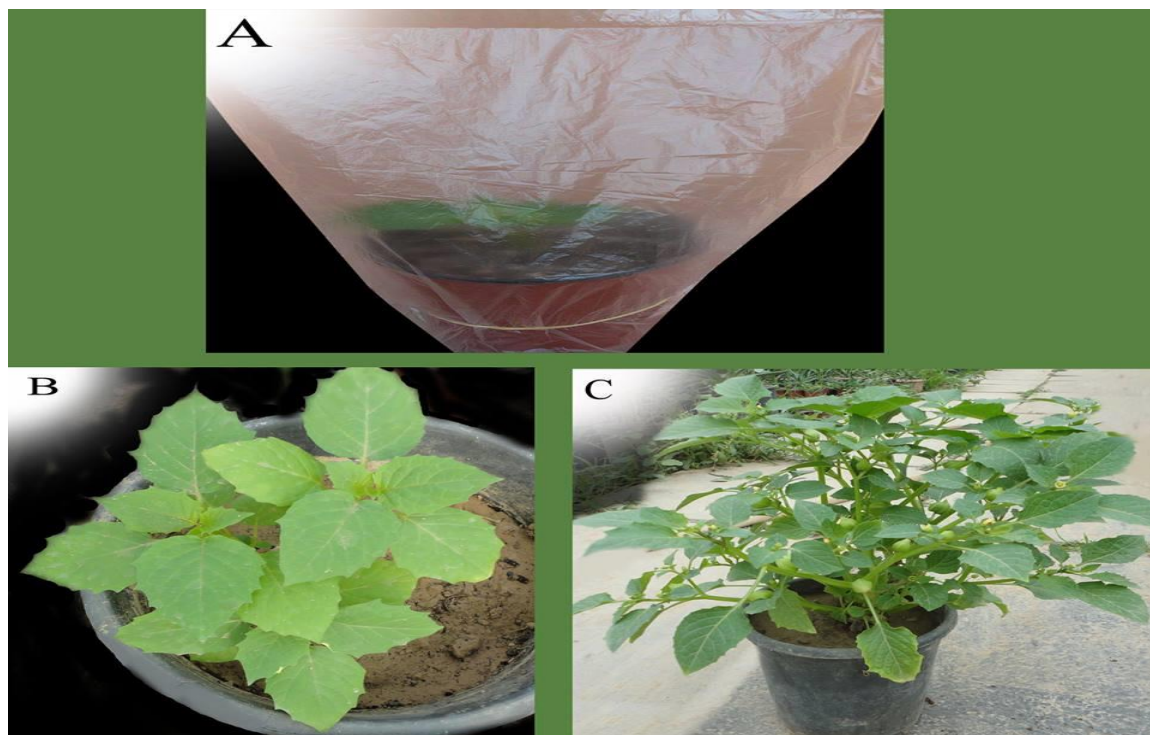
الشكل (9): تأثير IBA (ملغم.لتر⁻¹) في تجذير أطراف أفرع نبات كرز الأرض *P. angulata* الناتجة من الزراعة النسيجية بعد أربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS كامل تركيز الاملاح . اعلى عدد عند تركيز 0.2 ملغم. لتر⁻¹ وأطول جذر عند التركيز 0.1 ملغم. لتر⁻¹.

4-3- مرحلة الاقلمة:

من المهم ضمن برنامج الاقلمة تغطية النبيتات بغطاء بلاستيكي شفاف خلال الاسابيع الاولى من الاقلمة للحفاظ على رطوبة نسبية عالية حولها ومنع جفافها والسماح بنفوذ الضوء لزيادة عملية التركيب الضوئي لكي يقوم النبات بتصنيع غذائه بنفسه ويتحول من حالة التغذية الرمية الى حالة التغذية الذاتية فضلا عن ان للاقلمة فائدة في تنظيم الية عمل الثغور. ويتضح أن عملية تغطية النبيتات يجب ان تستمر أربعة اسابيع مع عمل ثقوب مناسبة في الغطاء البلاستيكي الشفاف قبل رفع الغطاء بمدة مناسبة لتقليل الرطوبة المحيطة بالنباتات بشكل تدريجي (ابراهيم وآخرون، 2012).

تم اقلمة النبيتات بنجاح (شكل 10) من خلال استجابة النبيتات المتأقلمة اذا بلغت 95%، ويرجع سبب نجاح العملية أن الوسط الحاوي على المزيج والبتموس يمتلك مسامات جيدة لنمو الجذور وانتشارها اضافة الى كونه وسط جيد لتصريف الماء وبالتالي يمنع من اختناق الجذور

كما يعتبر وجود البتموس كونه وسط جيد لعملية التغذية مع المزيج باعتباره وسطاً جيداً لعملية التهوية فهو جيد وملائم لنمو النبيتات، بعد نجاح عملية الأقلمة مختبرياً تم نقل الببيتات بعد 4 أسابيع إلى البيت الزجاجي وزرعت في السنادين .



شكل (10): مراحل أقلمة نبات *Physalis angulata* بعد تجذيرها مختبرياً (A) النبات بعد أسبوع

(B) النبات بعد 4 أسابيع (C) النبات في مرحلة الأزهار .

4-4 تأثير 2,4-D في استحثاث وتنمية مزارع الكالس

ان استحثاث الكالس في هذه الدراسة يفتح الباب أمام بحوث مستقبلية في مجالات التلاعب الوراثي أو تحسين انتاج نواتج الأيض الثانوية.

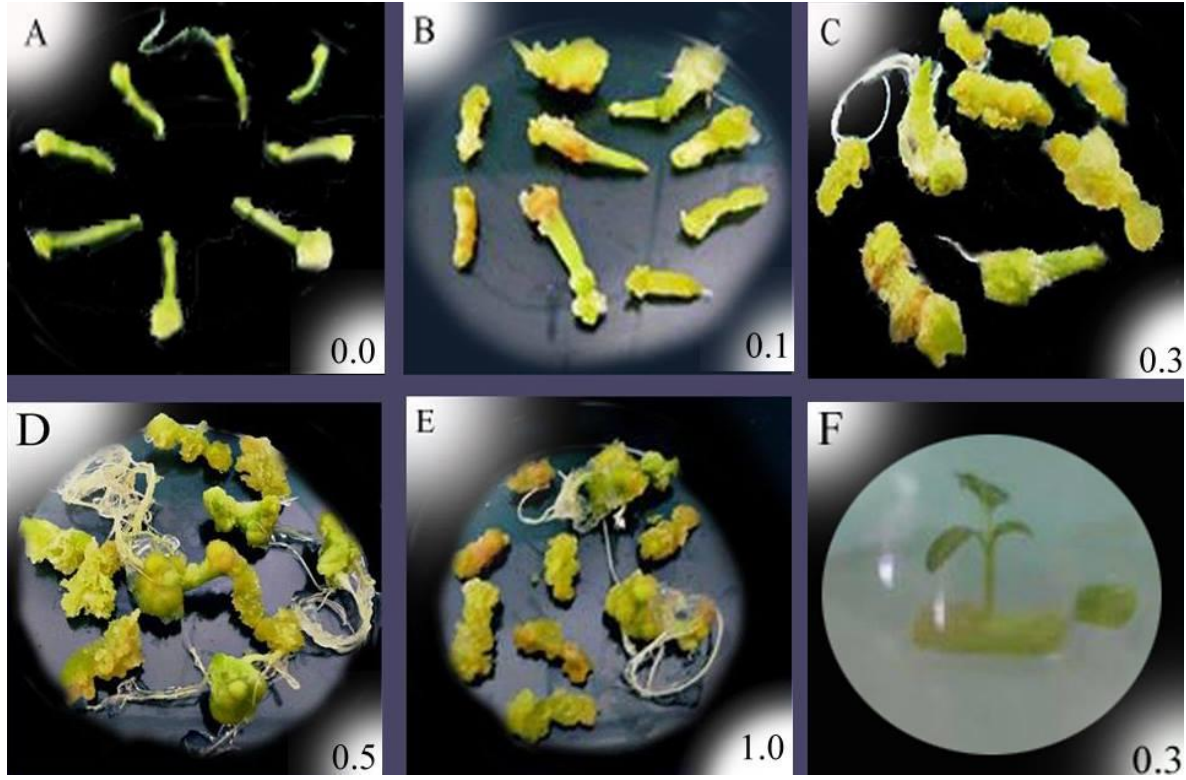
فقد اشار الجدول (11) إلى أن التراكيز المضافة من 2,4-D في استحثاث الكالس من السيقان تحت الفلقة لنبات كرز الارض قد أثر بشكل معنوي في نسبة الاستجابة لتكوين الكالس، فقد سجلت التراكيز 0.3 ، 0.5 ، 1.0 ملغم. لتر⁻¹ نسبة استجابة بلغت 100% وانحدرت هذه النسبة في التركيز 0.1 الى 33.3% في حين لم تستجب الاجزاء النباتية لمعاملة المقارنة الخالية من 2,4-D الا بظهور انتفاخات في المنطقة القريبة من التاج وتشكل الجذور منها (شكل 11: A).

ويشير التحليل الاحصائي إلى أن إضافة 2,4-D إلى الوسط الغذائي بتركيز 0.3 ملغم. لتر⁻¹ قد أدى إلى زيادة معنوية في صفة الوزن الطري للكالس على باقي المعاملات فقد سجل قيمة بلغت 4.65 غم. وزن طري ، ولم تختلف المعاملتان 0.5 و 1.0 ملغم. لتر⁻¹ من 2,4-D معنويا عن بعضهما في معدل الوزن طري اذ بلغتا 2.50 و 2.13 غم. وزن رطب في حين سجلت أقل القيم في معدل الوزن الطري عند المعاملة 0.1 ملغم. لتر⁻¹ 2,4-D التي لم تختلف عن معاملة المقارنة .

الجدول (10): نسبة استجابة قطع السويقة تحت الفلقية من نبات كرز الارض *P.angulata* لاستحثاث الكالس ومعدل الوزن الطري على وسط MS المجهز بتركيز مختلفة من 2,4-D بعد اربعة اسابيع من الزراعة.

تركيز 2,4.D ملغم لتر ⁻¹	نسبة نشوء الكالس	الوزن الطري (غم)	مقياس تكوين الكالس
0.0	0	0.35 ج	-
0.1	33.3	0.66 ج	+
0.3	100	4.65 أ	+++
0.5	100	2.50 ب	+++
1.0	100	2.13 ب	+++

امتاز الكالس المستحث على الاجزاء النباتية ببنيته الهشة ولونه الأصفر المخضرّ وبدأ تكون الكالس في مناطق القطع ثم فقدت الأجزاء النباتية شكلها بشكل كامل بعد أربعة اسابيع من الزراعة في المعاملات 0.3 ، 0.5 ، 1.0 ملغم. لتر⁻¹ من 2,4-D (شكل:11 C و D و E) على التوالي مع تشكل للجذور في بعض العينات. في حين تكون الكالس في مناطق القطع، ولم تفقد القطع شكلها في المعاملة 0.1 ملغم. لتر⁻¹ 2,4-D (شكل:11 B). ومن الجدير بالذكر ان بعض عينات السويقة تحت الفلقية التي زرعت على وسط MS المدعم بتركيز 0.3 ملغم. لتر⁻¹ 2,4-D فقد تمايزت إلى أفرع عرضية مباشرة دون المرور بمرحلة الكالس (شكل:11 F).



شكل (11) استحثاث الكالس من السيقان تحت الفلقية لنبات *Physalis angulata* (A) معاملة المقارنة (B) تركيز 0.1 ملغم/لتر⁻¹ (C) تركيز 0.3 ملغم/لتر⁻¹ (D) تركيز 0.5 ملغم/لتر⁻¹ (E) تركيز 1.0 ملغم/لتر⁻¹ (F) تركيز 0.3 ملغم/لتر⁻¹ تمايز قطع الكالس بشكل مباشر.

إن لوجود الأوكسينات أهمية كبيرة في عملية استحثاث الكالس بمفردها أو مع وجود الساييتوكاينينات ويؤدي التوازن ما بين المنظمات المضافة خارجياً مع الهرمونات الداخلية للحصول على أفضل انقسام للخلايا وأن النمو الجيد لنسيج الكالس يحدث من خلال التوازن بين تراكيز الأوكسينات والساييتوكاينينات المستعملة وأن الزيادة في تركيز أي منهما على حساب الآخر سوف يؤثر سلباً في نمو نسيج الكالس (Stephen و Hedden، 2006).

وأشار Ayyaduri و Ramar (2016) إلى أن مزارع الانسجة لنبات *P. minima* تظهر استجابة جيدة لاستحثاث الكالس في أوساط MS المدعمة بمنظمات النمو BA و NAA و 2,4-D و IAA وبعد 2,4-D من أكثر الأوكسينات فعالية في سرعة تحفيز ونمو نسيج الكالس (أبو زيد، 2000) إذ تعمل الأوكسينات على تحفيز استطالة الخلايا النباتية من خلال دوره الفعال في تحفيز ليونة الجدار، إذ يتسبب في كسر روابط ذلك الجدار وإعادة بنائها إلى مواقع جديدة تحت تأثير الضغط الانتفاخي مما يسهم في زيادة حجم الخلية واتساعها هذا فضلاً عن تأثيرها

في الانزيمات المسؤولة عن بناء مكونات الجدار الخلوي وتحللها ومن ثم التأثير في الخصائص الميكانيكية لذلك الجدار وفي مقدمتها زيادة نفاذيتها (Taiz و Zeiger، 2002)، وقد لوحظ أن الكالس النامي قلّ وزنه الرطب بزيادة تركيز منظم النمو وربما يعود السبب إلى أن زيادة التركيز تؤدي الى تأثيرات عكسية (الحديدي، 2002). اذ تعمل الاوكسينات على تفكك الجدران الخلوية اضافة الى زيادة ايض الاحماض النووية وخصوصا RNA الذي يؤدي بدوره الى تصنيع البروتين الضروري لعملية انقسام وتكاثر الخلايا وتوثر الساييتوكاينينات على عملية ايض السكريات وتنظيم البروتين ومن ثم تحفيز عملية انقسام الخلايا (Mahesh، 2008).

4-5: تمايز الكالس

على الرغم من استعمال العديد من الأوساط فإنها لم تتمكن من تمايز الكالس . المواد وطرق العمل فقرة (3-10).

4-6: التشخيص والتقدير الكمي لمركب الفايسلين.

4-6-1: تشخيص Physalin A وتقدير نسبة وجوده في اوراق نبات كرز الارض البذرية ومزارع الكالس بواسطة HPLC.

عبّرت المنحنيات الناتجة من حقن العينات المختلفة في كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء احتوائها ستيرويد Physalin بدلالة زمن الاحتباس المسجل لكل منها مع زمن احتباس العينة القياسية الفايسلين (شكل 12:A) وعلى النحو الاتي:

• النباتات البذرية

أوضحت المنحنيات المسجلة بواسطة (HPLC) عن احتواء مستخلص عينات الاوراق PhysalinA اعتماداً على قيم زمن الاحتباس Retention time البالغة 3.91 دقيقة مقارنةً مع قيم زمن احتباس عينة Physalin القياسية (الجدول 11)

وكشفت النتائج عن اختلافات واضحة في نسبة مساحة منحنى Physalin القياسي مع نسب مساحة المنحنيات المسجلة A Physalin المعزول من عينات النباتات البذرية (شكل 12:B) واكدت البيانات وجود Physalin A في أوراق النباتات البذرية بنسبة وجود بلغت 5.35%.

• المزارع النسيجية.

أظهرت نتائج التشخيص بواسطة (HPLC) وجود Physalin A في مستخلصات مزارع الكالس بعمر 30 و 45 و 60 يوماً المشتق من السويقة تحت الفلقية بدلالة زمن الاحتباس للفائسلين A المعزول منها (جدول 11)، فقد سجل الكالس المستحث بعمر 30 يوماً ارتفاعاً ملحوظاً (شكل 13:A) عن النسبة المئوية لمساحة المنحني المسجل للاوراق وازدادت هذه النسبة عند العمر 45 يوماً (شكل 13:B) ثم بدأت بالانخفاض بتقدم عمر المزرعة إلى 60 يوماً (شكل 13:C).

الجدول (11): قيم زمن احتباس Physalin A المعزول ونسب وجوده في أوراق نبات *angulata Physalis* البذرية ومزارع الكالس بأعمارها المختلفة.

مصدر الفايسلين	زمن الاحتباس (دقيقة)	مساحة المنحني (%)	وجود الفايسلين (%)
فايسلين A القياسي (المقارنة)	3.21	68.20	100
اوراق النباتات البذرية	3.91	45.42	5.35
الكالس المستحث	3.91	60.21	11.33
من السيقان تحت	3.25	11.13	18.77
الفلقية	3.63	8.65	7.60
30 يوماً			
45 يوماً			
60 يوماً			

4-6-2: تشخيص Physalin B وتقدير نسبة وجوده في اوراق نبات كرز الارض البذرية

ومزارع

الكالس بواسطة HPLC.

أظهرت المنحنيات الناتجة من حقن العينات المختلفة في كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء احتواءها على ستيرويد Physalin بدلالة زمن الاحتباس المسجل لكل منها مع زمن احتباس العينة القياسية الفايسلين وعلى النحو الاتي:

• النباتات البذرية

أوضحت المنحنيات المسجلة بواسطة (HPLC) عن احتواء مستخلص عينات الاوراق على PhysalinB اعتماداً على قيم زمن الاحتباس Retention time البالغة 5.00 دقيقة مقارنة مع قيم زمن احتباس عينة Physalin القياسية جدول (12) وكشفت النتائج عن اختلافات واضحة في نسبة مساحة منحنى Physalin القياسي مع نسب مساحة المنحنيات المسجلة Physalin B المعزول من عينات النباتات البذرية (شكل 12:A) وأكدت البيانات وجود Physalin B في اوراق النباتات البذرية بنسبة وجود بلغت 3.8 % .

• المزارع النسيجية.

أظهرت نتائج التشخيص بواسطة (HPLC) وجود Physalin B في مستخلصات مزارع الكالس بعمر 30 و 45 و 60 يوماً المشتق من السويقة تحت الفلقية بدلالة زمن الاحتباس للفائسلين B المعزول منها (جدول 12) ارتفاعاً ملحوظاً في مزارع الكالس بعمر 30 يوماً (شكل 13:A) عن النسبة المئوية لمساحة المنحنى المسجل للأوراق وازدادت هذه النسبة عند العمر 45 يوماً (شكل 13:B) ثم بدأت بالانخفاض بتقدم عمر المزرعة الى 60 يوماً (شكل 13:C).

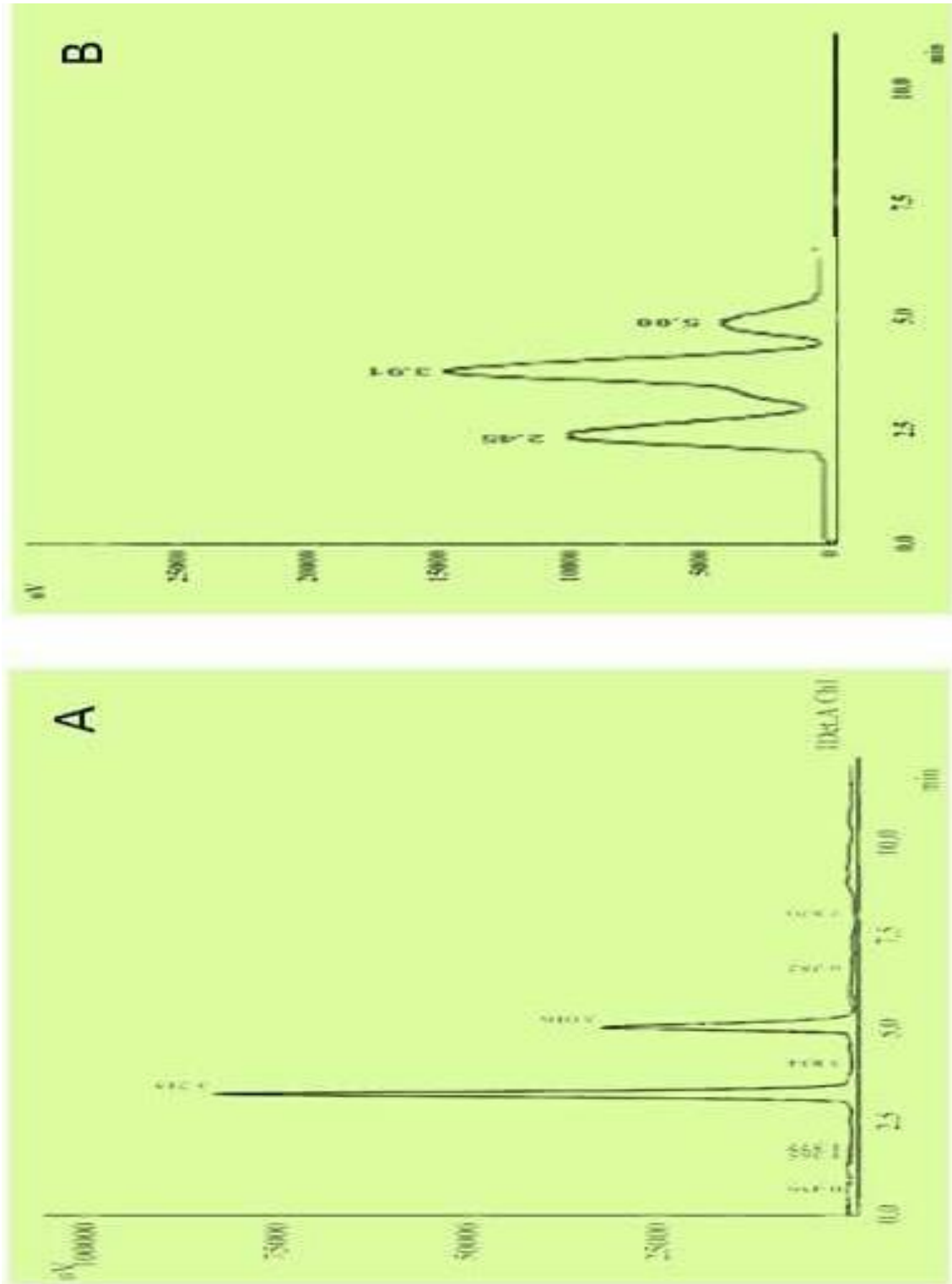
الجدول(12): قيم زمن احتباس PhysalinB المعزول ونسب وجوده في أوراق نبات *angulata Physalis* البذرية ومزارع الكالس بأعمارها المختلفة.

مصدر الفايسلين	زمن الاحتباس (دقيقة)	مساحة المنحنى (%)	وجود الفايسلين (%)
فايسلين B القياسي (المقارنة)	5.01	31.79	100
اوراق النباتات البذرية	5.00	18.17	3.8
الكالس المستحث من السيقان تحت الفلقية	30 يوماً	36.48	12.25
	45 يوماً	83.27	250.60
	60 يوماً	42.42	66.52

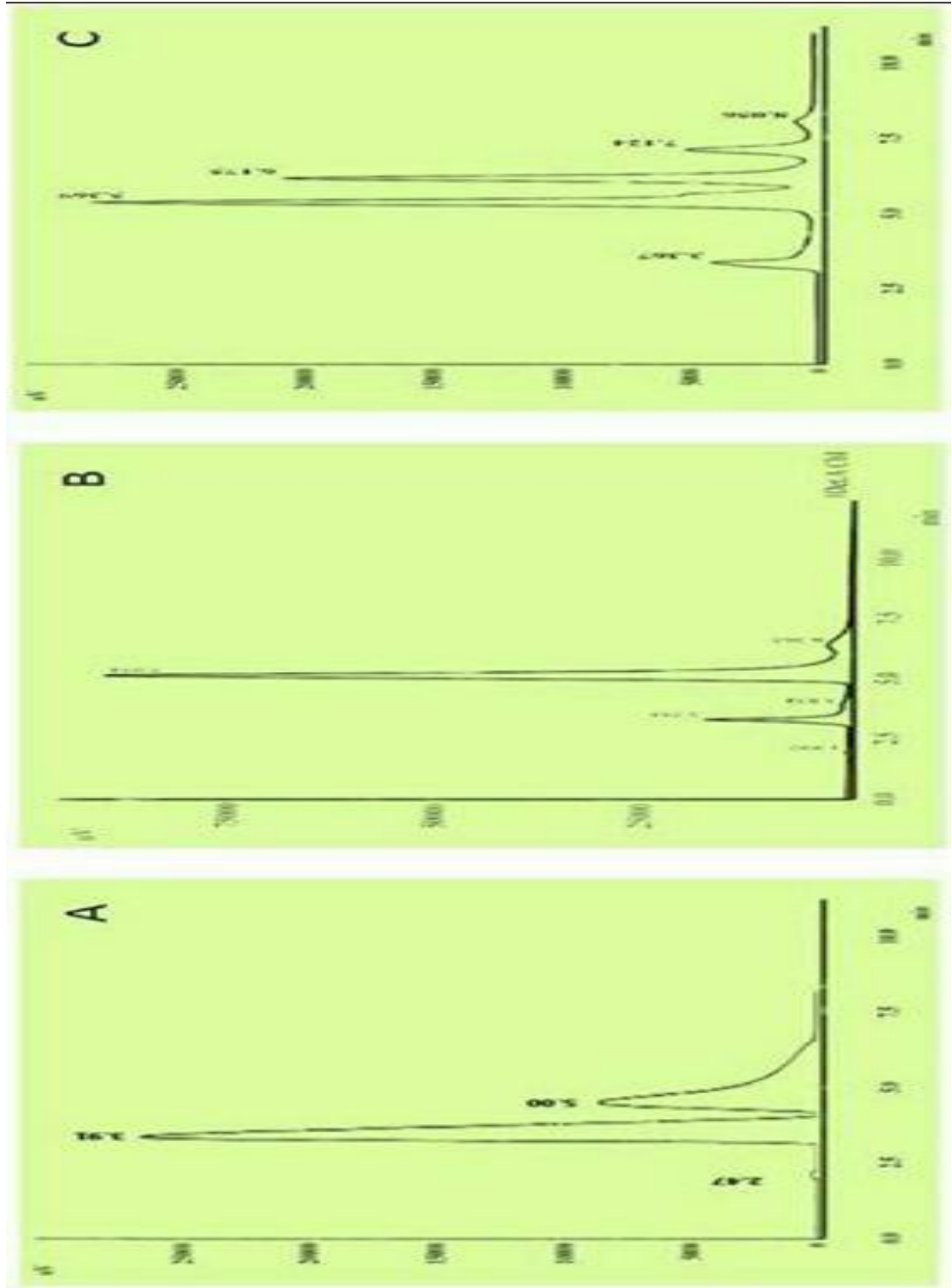
ان الزيادة في نسب تواجد مركب الفايسلين A و B مع تقدم عمر المزرعة في النتائج المشار إليها آنفا قد يكون بسبب ان منحنى نمو المزارع النباتية يأخذ شكل الحرف S يمر خلاله بثلاثة اطوار هي طور التباطؤ الذي ينعدم خلاله النمو تقريبا ويتبعه الطور الأسّي الذي تزداد خلاله نواتج الأيض الأولية وتتضاعف الخلايا بسرعة مستهلكا مغذيات الوسط.

وتصل بعدها المزارع إلى الطور الثالث المتمثل بطور الاستقرار، وهي المرحلة التي تسجل ارتفاعا في نواتج الأيض الثانوي نتيجة لتوقف معدل الأيض الأولي واستغلال المخزون من النواتج الأيضية الأولية لبناء النواتج الأيضية الثانوية (Ramawat، 2008).

وان سبب انخفاض كمية مواد الأيض الثانوي مع كبر عمر الكالس وصولا إلى 8 أسابيع ربما يعود إلى كبر عمر المزرعة وحاجتها إلى إعادة الزراعة وتحولها إلى المرحلة الأخيرة وهي مرحلة عدم القدرة على التطور culture inviability نتيجة لنفاذ المواد الغذائية في الوسط وزيادة تراكيز المواد السامة فيه وما يميز هذه المرحلة تحول لون المزارع والأوساط إلى اللون البني الناتج عن زيادة المواد الفينولية.



شكل 12: منحنيات الفايلسن A و B للعينة القياسية (A) والمعزول من الأوراق (B) أوراق نبات *Physalis angulata* في مرحلة البلوغ بواسطة HPLC.



شكل 13: منحنيات الفايسلين A و B المعزول من كالس السيقان تحت الفلوية (A) بعمر 30 يوماً

و (B) 45 يوماً و (C) 60 يوماً واحداً المشتقة من نباتات *Physalis angulata* بواسطة HPLC.

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

في أدناه أهم الاستنتاجات التي أظهرتها الدراسة الحالية:

- 1_ يعد نوع الجزء النباتي ونوع منظم النمو من العوامل المحددة في تضاعف، فيفضل استعمال العقد للتضاعف على وسط MS مدعم بالبنزائل ادنين بتركيز 1.5 ملغم لتر⁻¹.
- 2_ سهولة تجذير الأفرع الناتجة من التضاعف وبدون استعمال الاوكسينات لحث الجذور، وإن زراعة الأفرع على وسط MS المزود بـ 0.2 ملغم/ لتر IBA يعطي أعلى القيم لعدد الجذور.
- 3_ نجاح اقلمة الافرع المجذرة ونقلها إلى ظروف الحقل وأزهار وأثمار النباتات المأقلمة.
- 4_ اعتماد مزارع الكالس المستحث من السيقان تحت الفلقية بعمر 45 يوماً في تحقيق مستويات مضاعفة من الفايسلين A و الفايسلين B قياساً بمستوياتها في أوراق النبات الطبيعي في مرحلة الأزهار.

التوصيات

في أدناه بعض التوصيات لاعتمادها في دراسات مقترحة لاحقة:

- 1_ دراسة أجزاء نباتية أخرى ومنظمات نمو أخرى في استحثاث الكالس، ودراسة مستويات المركبات الفعالة فيها.
- 2_ إيجاد مسارات أخرى للتغلب على مشكلة تمايز كالس هذا النوع النباتي بالإفادة من تأثيرات بعض العوامل الفيزيائية.
- 3_ الكشف عن مركبات أيض ثانوية فعالة أخرى في النبات.
- 4_ انتخاب خطوط خلوية كفوءة منتجة للفايسلين A و الفايسلين B، وتطويعها لمنظومات المخمرات والمفاعلات الحيوية للبدء بإنتاجها تجارياً.

المصادر العربية:

- إبراهيم، كاظم محمد ، خليل إبراهيم رشيد و ثامر حميد خليل (2012). الاكثار الدقيق لثلاثة اصناف من العنب الاوربي. *Vitis vinifera* L خارج الجسم الحي. مجلة جامعة النهرين، 15(3): 42-50.
- أبو زيد، الشحات نصر(2000). الهرمونات النباتية والتطبيقات الزراعية . الدار العربية للنشر والتوزيع . مصر.
- أمين، سامي كريم محمد و حيدر عماد محمد (2010). تأثير بعض منظمات النمو والجزء النباتي المزروع في استحثاث الكالس لنبات المرمية *Salvia officinalis* خارج الجسم الحي ، مجلة ديالى للعلوم الزراعية، 2(1): 171-184.
- اندروشوفالييه، (2010). الطب البديل : التداوي بالاعشاب والنباتات الطبية .أكاديمية انترناشيونال ، بيروت ،لبنان .
- جنديّة، حسن(2003). فسيولوجيا أشجار الفاكهة (احدث الطرائق في علاج مشاكل الزراعة والتربية والإنتاج لأشجار الفاكهة في الاراضي المختلفة). الدار العربية للنشر والتوزيع، القاهرة، مصر.
- الحديدي، محمد علي حسين (2002). تجارب في زراعة الأنسجة النباتية. دار الفكر للطباعة والنشر والتوزيع، عمان، الأردن.
- حمد، محمد شهاب و ميادة طارق الجبوري (2014). تأثير BA و NAA في الإكثار الدقيق لاصول الحمضيات خارج الجسم الحي. مجلة الفرات للعلوم الزراعية 6(1) : 48-56.
- خليفة، محمد ميلود (1987). مواد النمو النباتية واستعمالاتها في الزراعة.(مترجم عن H.N. Krishnamoorthy). معهد الإنماء العربي، بيروت، لبنان.
- الراوي، خاشع وعبد العزيز محمد خلف الله (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. العلمي، مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل ، العراق.
- الرفاعي، عبد الرحيم توفيق وسمير عبد الرزاق الشوبكي (2002). تقنيات القرن 21 لتحسين النبات باستخدام زراعة الأنسجة. دار الفكر العربي، القاهرة، جمهورية مصر العربية.

- السامرائي، خلود وهيب عبود (1983). توزيع القلويدات في بعض الأنواع البرية من العائلة الباذنجانية Solanoceae في العراق. رسالة ماجستير، جامعة بغداد - كلية العلوم.
- السعدي، سحر عبد العباس مالك وإيمان محمد عبد الزهرة الربيعي وكارزان عمر قادر (2012). دراسة مظهرية حبوب اللقاح لبعض أنواع العائلة الباذنجانية (Solanaceae) في العراق. مجلة علوم ذي قار، 3(3): 3-14.
- سلمان، محمد عباس (1988). أساسيات زراعة الأنسجة والخلايا النباتية، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.
- عبيد، إياد عاصي (2009). تأثيرات الوسط الغذائي والمجال المغناطيسي في الإكثار والصفات التشريحية لأصل الخوخ (*Prunus persica* L. Batsch) صنف محلي بيبضاوي بالزراعة النسيجية. اطروحة دكتورا، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل.
- العرقاوي، نبيل (2009). موسوعة النباتات الطبية المصورة. الطبعة الأولى. اتحاد الناشرين السوريين
- العلاق، سناريا عباس (2012). تسجيل جديد للنوع (*Physalis angulata* (Solanaceae) L. مجلة جامعة النهرين، 15(4): 31-42.
- العلاق، سناريا عباس جعفر (2006). دراسه مظهرية وتشريحيه لانواع بريه مختارة من العائلة الباذنجانية (Solanaceae) في العراق. رساله ماجستير ، جامعه بغداد ، كليه العلوم للنبات.
- محمد، عبد المطلب سيد، مبشر صالح عمر، 1995. المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والانسجة والأعضاء للنبات، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل، العراق.
- المهداوي، مثنى محمد أبراهيم (2013). اطروحة دكتوراه، جامعة الموصل، الموصل ، العراق.
- المزوري، ليلي شعبان محمد (2007). اكثار نبات الشبوي الشجيري *Cestrum nocturnum* L. في البيئة الصناعية *In vitro*، رسالة ماجستير، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق.
- الملاح، مزاحم قاسم وأواب وعد الله يونس (2011). ابتكار إنتاج الهايوسين والهايوسيامين من المزارع النسيجية لنباتات الداتورة *Datura innoxia* L. البرية المنتشرة في البيئة العراقية، براءة اختراع رقم 3364 الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية، العراق.
- الملاح، مزاحم قاسم وغادة شرف الدين اليوزيكي (2005). إنتاج قلويد الكابيسين من نباتات الفلفل الحار ومن الكالس المستحدث منها، مجلة التربية والعلم، 17: 20-31.

المصادر الأجنبية:

- Abo.K.A. and Lawal ,I.O.(2013). Antidiabetic activity of *Physalis angulata* and fractions in alloxan-induced diabetic rats. Journal of Advanced Scientific Research., 4(3):32-36.
- Adhikari, S.R. and Pant ,B. (2013). Induction and proliferation of *in vitro* mass of callus of *Withania somnifera* L. Dunal. Res in Plant Sci 1(3): 58-61
- Afroz, F .; Hassan, A.K.M.S. ; Bari, L.S; Sultana .R. ; Begum, N. ; Jahan, M.A.A and Khatun, R., (2009). *In vitro* shoot proliferation and plant Regeneration of *Physalis minima* L.-a Perennial Medicinal herb.Bangladesh J of Scientific and Industrial Res, 44(4):453-456.
- Aruna, V.; Kiranmai, C. ; Karuppusamy, S. and Pullaiah, T. (2012). Effect of medium, explants, cytokinins and node position on *in vitro* shoot multiplication of *Caralluma lasiantha* (Wight) N.E.Br, an endemic and medicinally important plant. African Journal of Biotechnology 11(89): 15523-15528.
- Azlan, G.J.; Marziah, M.; Radzali, M. and Johari, R. (2002). Establishment of *Physalis minima* hairy roots culture for the production of physalins. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 69: 271-278.
- Ayyadurai, V. and Ramar, K.(2016). Standarization of efficient *in vitro* Callus Induction Protocol For *Solanum Pubescens* Willd. International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 1(1):01-03.
- Azlan, G.J.; Marziah ,M. ; Radzali, M. and Johari ,R. (2005). Accumulation of Physalin in Cells and Tissues of *Physalis minima* L. Acta Hort.,2: 53-59.
- Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K. (1996). " Plant Tissue Culture: Theory and Practice. a Revised Edition " . Elesevier . Amsterdam -Lausanne – New York – Oxford – Shannon – Tokyo.

- Chandra, I.; . Singh, P. ; Bhattacharya ,A. ; Singh ,P. ; . Javed, S. and Singhamahapatra, A (2013). *In vitro* callus induction regeneration and micropropagation of *Solanum Lycopersicum* International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2(12): 192-197.
- Chiang.H.C. Jaw S.M.and ChenP.M.(1992) In hibitory effects of physalin B and physalin F on Various human Leukemia cells *in Vitro*. Anticancer Res. 12: 1155-1162.
- Davies, J.P. (1995). Plant Hormones. Cornell University, New York U.S.A.
- Dixon, R. A. (1985). Plant Cell Culture A practical Approach. IRL Press. Oxford. U. K.
- Donkor, A-M.; Glover, R.L.K.; Boateng, J.K. and. Gakpo, V.Y. (2012). Antibacterial activity of the fruit extract of *Physalis angulata* and it formulation. Journal of Medical and Biomedical Sciences, 1(4):21-26.
- ElNour, M.E.M.; . Mahmood, F.Z.A.A.R. and Yagoub, S.O. (2012). Callus Induction and Antimicrobial Activities of Callus and Intact Plant Extracts of *Datura Stramonium* L..International Journal of Science and Research, 3(8): 1105-1109.
- Garcia, G.; Omero ,C.S.R.; Munoz ,A.B.; Heredic ,A. and Alfaro, F.P. (1994). Levels of endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetyl-aspartic acid during adventitious rooting in avocado microcutings. J.Exper. Bot., 45(275):865-870.
- Giri, A. and Narasu, M. L (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechn. Adv., 18:1-22.
- Guimaraes, E.T.; Lima, M.S.; Santos, L.A.; Ribeiro, I.M.; Tomassini,. T.B.C.; Santos, R.R.; Santos, W.L.C. and Soares, M.B.P.(2009). Activity of physalins purified from *Physalis angulata* *in vitro* and *in vivo* models of cutaneous leishmaniasis Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 64:84-87.
- Gupta, S. Dutta and Ibaraki,Y (2006). Plant Tissue Culture Engineering Vol. 6. The Background. Springer.

- Hall, D. W. and Vandiver, V. V.; (2003) " Cut Leaf Groun Cherry (*Physalis angulata* L.), Florida Cooperative extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences Univ. of Florida.
- Hartmann, H.T. ; Keter, D.E. ; Davies ,F.T. and Geneve ,R.L. (2002). Plant Propagation, Principles and Practices. 7th Ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J.
- Hedden .P and Stephen, G. (2006) .Plant Hormone signaling . Blackwell Publisher Ltd .pp:97-101.
- Intzaar, S.; Akram, M. and Afrasiab, H. (2013). High Frequency Multiple Shoot Formatin of Pygmy Ground cherry (*Physalis minima*): An Endangered Medicinal Plant. International Journal of Agriculture & Biology,15:755-760
- Joy, P. P.; Thomas, J.; Mathew ,S.; Skaria, B.P. (1998). Medicinal Plants. Odakkali, Asamannoor P. O., ErnaKulam District, Kerala, India, first edition.
- Karthikeyani, T. P. and Janardhanan, K. (2003).Ethno-Medico-Botanical studies of the tribals of lower palani hills, south India. Asi J.Microbiol. Biotechnol Environ. Sci . 5: 467 - 497.
- Kasumi, M.; Takastu, Y. ; Suzuki, K. ; Gonja, T. ; Nogi ,M. ; Yamada, T. and . Manabe ,T.(2004). Callus formation and plant regeneration from root explant of gladiolus (*Gladiolus* X *grandiflora* (*Gladiolus* X *grandiflora* Hort.). J. JPN. Soc. 4(1).April. 7.
- Mahadev,M.D.; Panathula, C.S. and Naidu ,C.V. (2014). Efficient Protocol for *in vitro* callus induction and indirect plant regeneration of *Solanum viarum* (Dunal) – An important anticancer medicinal plant. Int .J. Med. Arom. Plants. ISSN, 4(2): 117-123.
- Mahesh, S. (2008). Plant Molecular Biotechnology. New Age
- Mathews, C. K. and Van Holde, K. E. (1991). Biochemistry. The Benjamin, Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, California.

- Mantell, S.H. ; Matthews, J. A. and Mckee, R. A. (1985). Principles of Plant Biotechnology: An Introduction to Genetic Engineering in Plants. First edition, Blackwell Scientific Publications, USA.
- Mulabagal, V. and Tsay ,H. S. (2004). Plant cell cultures –An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Intr. J. Appl. Sci. Engin.* 2: 29-48.
- Murashige, T. and Skoog ,F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Mungole, a.j.; Doifode ,V.D. ; Kamble ,R.B. ; Chaturvedi, A. and Zanwar ,P. (2011). *In- vitro* callus induction and shoot regeneration in *Physalis minima* L.. *Annals of Biological Research* 2(2): 79-85.
- Nanumala, S.K.; Kannadhasan, R. ; Gunda, K.; Sivakumar. G. and Somasekhar. P. (2012). Antiulcer activity of the ethanolic Extract of leaves *Physalis angulata* L.. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 4(4): 226-228.
- Oladele,G.M.; Ode, O.J; Akande, M.G.; Ogunbodede, M.A. and Simon, M.K. (2013). Effects of ethanolic root extract of *Physalis angulata* On alloxan induced diabetic rats. *Int.J.A.PS.BMS*, 2(2):95-100.
- Osho, A.;Adetunji,T.;Fayemi,S.O.and Moronkola, D.O.(2010). Antimicrobial Activity of Essential Oils of *Physalis angulata* L..*Afr J Tradit Complement Altern Med*, 7(4):303-306.
- Osman, M.G.; Elhadi, E.A. and Khalafalla, M.M. (2010). Callus formation and organogenesis of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill, C.V. Omdurman) induced by thidiazuron. *African Journal of Biotechnology*, 9(28): 4407-4413.
- Otroshy, M.; Mokhtar, A. ; Khodae, S.M.M. and Bazrafshan, A-H (2013). Direct regeneration from leaves and nodes explants of *Physalis peruviana* L.. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 214-218.

- Pietro R.C., Kashima, S.; Sato, D.N.; Januario, D.N. and Franca, SC.(2000). *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L..Phytomedicine 7: 355-358.
- Pinto, N.B.; Morais,T.C.; Carvalho,K.M.B.;Silva,C.R.; Andrade G.M. ; Brito, G.A.C. ; Veras, M.L. ; Pessoa, O.D.L. ; Rao ,V.S. and Santos, F.A. (2010). Topical anti inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. Phytomedicine, 17: 740-743.
- Porika, R.; Poojari, S.; Lunavath, V. and Mamidala, E.(2014). Preliminary phytochemical investigation and TLC analysis of *P.angulata* fruit extract. Journal of Pharmacy and Biological Sciences.; 9(2): 11-14.
- Purohit, S.S.(1999). Agricultural Biotechnology. P.G. Department of Botany Dungar Colleg Karuppusamy, Bikaner, India.
- Rashid, R.; Bhat, J.A.; Bhat, Z.A.; Dar, W.A and Shafi ,W.(2012). Callus formation and organogenesis of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.).VEGETOS ,25(2): 243-248.
- Ramar, K. and Ayyaduria, V. (2016). *In Vitro* Callus Induction Studies of *Physalis minima* (L). An Important Medicinal Plant. International Journal of Pharmaceutival Science and Research, 1(1): 01-03.
- Ramawat, K. G. (2008). Plant Biotechnology. S. Chand and Company Ltd. third edition, New Delhi, India.
- Ramar, K.; Ayyadurai ,V. and Arulprakash, T. (2014). *In Vitro* Shoot Multiplication and Plant Regeneration of *Physalis peruviana* L. An Important Medicinal Plant. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(3):456-464.
- Razdan, M.K.(2003). Introduction to plant tissue culture, 2nd Ed. Science publisher, INC, USA.
- Rodrigues, A .R. ;Soares, J.D.R. ; Silva ,R.A.L. ; Penoni, E.S. ; Pasqual, M.; Pereira, F.J. and Castro,E.M. (2014). Anatomy of vegetative organs and seed histochemistry of *Physalis peruviana* L. Australian Journal of Crop Science .; 8(6):895-900.
- Saritha, K.V.; Prawash,E.; Ramamurthy,N. and Naidu C.V.(2002). Micropropagation of *Spilanthes acmella* Marr. Biology plant , 45:581-584.

- Santos, R.A.D.; Cabral, T. R.; Cabral, I.R. ; Antunes, L.M.G. ; Andrade, C.P.; Cardoso, P.C.D.S.; Bahia, M.D.O.; Pessoa, C.; Nascimento, J.L.M.D.; Burbano ,R.R. and Takahashi, C.S. (2008). Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated *in vitro*. *BIOCELL*, 32(2): 195-200.
- Sarin, R.(2005). Useful metabolites from plant tissue cultures. *Biotech.*; 4: 79-93.
- SAS. 2004.SAS /STAT Users Guide for personal computer, SAS Institute Inc, Cary, N.C. USA.
- Seigler, D.S.(1998) Plant secondary metabolism, Kluwer Academic Publishers.
- Silva, M.T.G; Simas,S.M.; Batista,T.G.F;Cardarelli,P. and Tomassini, T.C.B(2005). Studies on antimicrobial activity *In vitro* of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Mem Inst Oswaldo Cruz* , Rio de Janeiro 100(7): 779-782.
- Shah, S.H.; Ali .S. ; Jan, S.A. ; Din, J. and Ali ,G.M. (2015). Callus Induction *In Vitro* Shoot Regeneration and Hairy Root Formation By The Assessment Of Various Plant Growth Regulators In Tomato (*Solanum Lycopersicum* Mill). *The Journal of Animal & Plant Sciences* 25(2): 528-538.
- Sharma, N.; . Bano. A.; . Dhaliwal ,H.S. and Sharma, V. (2015). Perspectives and Possibilities of Indian Species of Genus *Physalis* L.- A Comprehensive review.*European Journal of Pharmaceutical and Medical Research.*, 2(2): 326-353.
- Sheeba, E.; Palanivel,S. and Parvathi, S. (2013). Effect of Plant Growth Regulators On Callus Induction In *Physalis minima* L..*International Journal of Innovative Research in Science Engineering and Technology*, 2(9):4847-4851.
- Siddique,N.A.; Bari ,M.A.; Shahnewaz, S.; Rahman, M.H.; Hasan, M.R.; Khan, M.S.I. and Islam, M.S.(2004). Plant Regeneration of *Withania somnifera* (L.) Dunal (Ashwagandha) from Nodal Segments Derived Callus an Endangered Medicinal Plant in Bangladesh.*Journal of Biological Sciences*, 4(2): 219-223.
- Soares, M.B.P.; Brustolim, D.; Santos, L.A.; Bellintani, M.C.; Paiva, F.P.; Ribeiro, Y.M.; Tomassini., T.C.B and Santos, R.R(2006). PhysalinA B,F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection,*International Immunopharmacology* 6: 408-414.

Taiz, L. and Zeiger, E. (2002). Plant physiology, 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc. pp: 690.

Trigiano, R.N. and Gray, D.J. (1999). Plant Tissue culture concepts and laboratory exercises, 2nd Ed., CRC Press Inc.; 11-17.

Vander, K.W.M.; Breteler, H.; Visser, M.H.M. and Mavridou, D. (1993). The role of the conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple: Introduction of a test system. Plant Cell Reports. 12: 203-206.

www.almrsal.com

Xu, W.X.; Chen, J.C.; Liu, J.Q.; Zhou, L.; Wang, Y.F. and Qiu, M.H. (2013). Three new physalins from *Physalis alkekengi* var. *franchetii*. Nat. Prod. Bioprospect, 3: 103-106.

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

SUMMARY

This study was conducted in laboratory of plant tissue and cell culture in the department of Biology at the College of Education for Pure Sciences, University of Diyala, During the period October 2015 – 2016 May. The aim of the project was to study the propagation of cherry ground *Physalis angulata* L. plant, which has medical and pharmaceutical importance. Through multiplication of Shoot tips and nodes grown on Murashige and Skoog (MS) medium provided with different concentration of Benzyladenine (BA) and Kinetin (Kin). Then rooting the new shoots produced from the multiplication on the MS medium Supplimented with different concentration of 3-Indol butyric acid (IBA). In addition to callus induction from growing hypocotyls sterile Seedlings from tissue culture using MS medium fortified with different concentrations of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). Then composite estimate of Physalin A and B in the produced callus after 30, 45 and 60 days. The results indicate the following:

1. The best multiplication of the Shoot tips of $6.0 \text{ Shoot.explant}^{-1}$ and that of the individual nodes reached $10.0 \text{ Shoot.explant}^{-1}$ Both obtained from culture and cultivation respectively on MS medium supplimented with 1.5 mg.L^{-1} BA, after eight weeks of subculture.
2. rooting percentage of Shoots resulting from the multiplication ranged from 60-100 % and Shoots recorded the highest rate of the number of the roots was $16.0 \text{ root. Shoot}^{-1}$ of culture rooting MS medium supplimented with 0.2 mg. L^{-1} IBA while the highest recorded significant values of root length, amounting to 9.8 cm in Shoots culture on the MS medium of rooting suppliment with 0.1 mg. l^{-1} IBA.
3. The best quantity callus $4.65 \text{ g wet weight}$ were obtained from culture hypocotyls explant in MS medium provided with 0.3 mg .l^{-1} 2,4-D, after four weeks of culture.
4. The data showed the presence of both Physalin A and B in callus culture using High Performance Liquid Chromatography Technique and comparing them with standard samples, in general the percentage of presence of Physalin A and B ranged from 7.60 - 18.77% and 12.25- 250%, respectively, in the callus samples of 30, 45 and 60 days age. The highest presence of Physalin A and Physalin B were 18.77 and 250% respectively which obtained from callus at the age of 45 days, and that the ratio of the presence of the two compounds, to all groups of callus has recorded higher rates of

presence of two compounds in the natural plant leaves values at the flowering stage. Generally the increment of levels of Physalin A and B in the tissues of callus may be an indicative of that the tissue culture is a favorite and sustainable source for secondary metabolic products and appropriate alternative to the normal flora.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Diyala
College of Education for Pure Science
Department of Biology

**Callus Induction and Regeneration in *Physalis*
angulata plant and detection of Physalin in callus
and Plantlets**

A thesis submitted to
The Concil of College of Education for Pure Science/Diyala
University as a Partial Fulfillment of the Requirements for
the Degree of

M.Sc.in Biology

By

Sarah Mutashar Hatem

Supervised by

AssistantProf

Dr. Muthanna Muhammed Ibrahim

2016 A.D

1438 A.H

