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

تنشأة المعلقات الخلوية لنبات *Physalis angulata* L. والكشف عن مركب Physalin

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى، وهي جزء من

متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

ضحى صباح نادر

بكالوريوس علوم حياة2003 - 2004
جامعة ديالى

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور
مثنى محمد إبراهيم

الأستاذ المساعد الدكتور
تلفان عناد أحمد

1439 هـ

2018 م

2. استعراض المراجع

استعراض المراجع

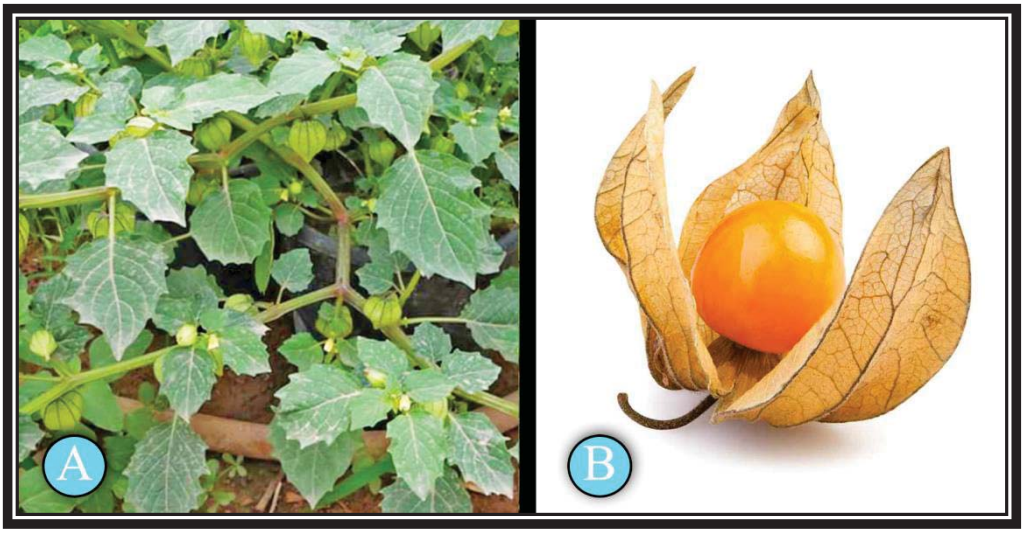
2 – 1: نبات كرز الأرض والأهمية الطبية

ينتمي نبات *Physalis angulata* L. الى العائلة الباذنجانية (Solanaceae) التي تعد من العوائل واسعة الانتشار في العالم ويضم الجنس *Physalis* 120 نوعاً، وأكثر هذه الأنواع انتشارا هو *Physalis alkekengi* و*Physalis divaricata* و *Physalis angulata* و*Physalis minima* و*Physalis peruviana* (العلاق، 2006). وللنبات العديد من التسميات فيدعى بالانكليزية Kamapu ؛ Wild tomato؛ Winter cherry ؛ Mullaca ؛ Koropo و Cut leaf grand cherry (Pietro وآخرون، 2000; Januario وآخرون، 2002).

النبات عشبي حولي، ينتشر في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية من العالم(Hunziker ، 2001 وJose واخرون، 2003). واشار Lin وآخرون (1992) ان ثمار النبات ذات قيمة غذائية لاحتوائها على فيتامينA وفيتامينC وفيتامين B-Complex والعديد من العناصر المعدنية. يجود النبات في التربة الرملية الرطبة وظروف الإضاءة الجزئية (Sultan وآخرون، 2008). يتواجد في الحقول والمراعي وفي أراضي الغابات المفتوحة (Hall وآخرون، 2003). وأشار العلاق (2012) ان هذا النوع ليس من نباتات الفلورا العراقية وإنما دخل واستوطن منذ فترة قليلة إذ عثر على النبات بصورة متباعدة في مناطق عديدة من محافظة بغداد و وجد في مدينة كركوك وبعقوبة وطوزخرماتو.

ان افراد نوع *P.angulata* ذات جذور وتدية، وتتميز سيقانها بكونها رباعية الزوايا وخضراء فاتحة منتصبة والأوراق بسيطة متبادلة وأزهاره كاملة ثنائية الجنس شعاعية التناظر وذات كأس منفوخ يغطي الثمار قبل النضج ويبقى معلقا باتجاه الاسفل (شكل: A1)

وثمارها طرية ذات شكل كروي لونها أخضر قبل النضج ولكنها تصبح ذات لون أخضر مصفر مائل إلى البرتقالي بعد النضج (شكل. B1)، أما البذور مسطحة ذات شكل قرصي كلوي ولونها بني مصفر ويتراوح عددها 50-45 بذرة. ثمرة [1-] (العلاق، 2006).



الشكل (1): نبات *Physalis angulata* النامية في البيت النباتي: (A) السيقان، (B) الثمار بعد النضج.

ويصنف النبات علميا Botanical Classification

Kingdom: Plantae
Subkingdom: Viridaeplantae
Phylum: Tracheophyta
Class: Dicotyledons
Order: Solanales
Family: Solanaceae
Subfamily: Solanoieae
Tribe: Physaleae
Subtribe: Physalinae
Genus: Physalis
Specific epithet: angulata
Botanical name: *Physalis angulata* L. (Sharma وآخرون، 2015)

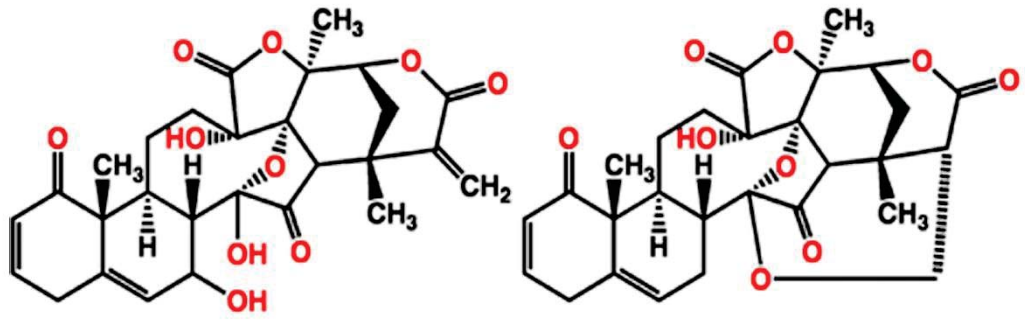
إستخدم النبات في الطب الشعبي لمعالجة العديد من الأمراض منها الأمراض التي تنتقل عن طريق الجنس وأمراض القناة الهضمية (Geissler وآخرون، 2002; Dos Santos

واخرون، 2003) فضلا عن إستخدامه لعلاج حالات التهاب الحلق والتهاب عنق الرحم وكخافض للحرارة (Bastos وآخرون، 2008).

استخدمت مستخلصات جذور النبات لمعالجة مرض السكري والام الأذن والعضلات ولعلاج اليرقان (Roosita واخرون، 2008) كما أظهر مستخلص أوراق النبات نشاطاً مثبطاً ضد بعض الطفيليات مثل طفيلي الملاريا *Plasmodium falciparum* (Ruiz وآخرون، 2011)، لمستخلص ثمار النبات فعالية مثبطة لنمو بكتريا *Staphylococcus aureus* (Donkor وآخرون، 2012). واشار Lawal واخرون،(2010) الى استعمال مستخلص كامل النبات في حالات الولادة والنزف الدموي وعلاج التهابات نفرونات الكلى وفي علاج الاورام.

يحتوي نبات *Physalis angulata* على مركبات الفلافونويدات و القلويدات و الوذانولويدات Withanolides والأخير أصبح سمة خاصة بالعائلة الباذنجانية وبالأخص للأجناس *Withania* و*Acnistus* و*Dunalia* و*Physalis* و*Datura* و*Jaborsa* (Glotter، 1991)، فضلا عن مركبات الستيرويدات والتي من أهمها مركب الفايسلين Physalin المسمى كيميائيا 16-24-Cyclo-13,14-Seco-ergostan الذي يعد واحدا من المركبات التي يتميز بها نبات *Physalis alkekengi* حيث يعود هذا المركب الى صنف اللبيدات، ومجموعة الستيرويدات (Xu وآخرون، 2013)، والتي أشار Ramawat (2008) إلى أنها تتبع مجموعة كبيرة من المركبات يطلق عليها اشباه التربينات Terpeniods أو Isoprenoids التي تعد من النواتج الطبيعية التي تحتوي مركباتها على 30 ذرة كاربون تشتق من 6 وحدات من (Isoprene) في حين ان المركبات التي تحتوي على أقل من 30 ذرة كاربون يمكن ضمها الى مجموعة الستيرويدات اذا تكونت من 6 وحدات من الإيسوبرين (Isoprene).

يوجد الان أكثر من 50 نوعاً من مركبات Physalin ومركبات neophysalin التي يمكن تحويلها الى Physalin والتي شخصت في الأنواع *Physalis lancifolia* و *Physalis minima* و *Physalis alkekengi* و *Physalis angulata* ولعل من اهمها Physalin A و Physalin B (Han واخرون،2011) والتي تتوضح بنيتها الفراغية في (الشكل :2).



Chemical name: Physalin A

Molecular formula: $C_{28}H_{30}O_{10}$

Molecular weight: 526.539 g.mol^{-1}

Chemical name: Physalin B

Molecular formula: $C_{28}H_{30}O_9$

Molecular weight: 510.540 g.mol^{-1}

الشكل (2): البنية الفراغية لمركبات Physalin A وPhysalin B . (Matsuura واخرون، 1970)

ولمركب Physalin أهمية طبية في معالجة العديد من الأمراض حيث ذكر Silva وآخرون (2005) فعاليته المضادة للجراثيم ضد بكتريا السيلان المسماة *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 4922 وضد بكتريا *Escherichia coli* ATCC 8739 و *E.coli* ATCC 25922 وضد بكتريا*Candida albicans* ATCC 10231، وللمركب استخدامات دوائية في الطب السريري كمدرر لتاثيره في زيادة افراغ أيونات الصوديوم (Rengifo-Salgado وVargas-Arana، 2013; Brayfield، 2015) كما توصلت الدراسات إلى أن

لكل نوع من أنواع Physalin أهمية طبية خاصة به، فقد أشار Antoun وآخرون (1981) لفايسلين A فعالية سمية ضد الخلايا السرطانية من نوع He La للإنسان، ولفايسلين B فعالية مثبطة قوية لكل أنواع سرطان كريات الدم البيض وسرطان القولون وسرطان الجلد فضلاً عن استخدامه كمستحضر طبي لعلاج مرض البلهارزيا (Hsu وآخرون، 2012; Ma وآخرون، 2015). وأشارPinto وآخرون (2010) إلى فعالية Physalin E في علاج حالات التهاب الجلد الحادة والمزمنة إذ يعد قوياً وفعال سطحياً، ويمتلك الخليط المتكون من انواع فايسلينF وD وB نشاط مضاد ضد اللشمانيا وله فعالية مثبطة لنشاط الخلايا البلعمية (Guimaraes واخرون،2009).

يتراكم Physalin بصورة رئيسة في النباتات المكتملة النضج اذ يلاحظ في النباتات المثمرة والمزهرة وتختلف الأنسجة من حيث تراكم الـــ Physalin، اذ يتراكم Physalin A في الفواكه الناضجة، و Physalin B في الأوراق الناضجة وبراعم الأزهار، وPhysalin F في الاوراق الناضجة و Physalin D في براعم الأزهار و Physalin N في السيقان والأوراق والجذور (El-Tayeb وآخرون، 1997; Azlan وآخرون، 2005).

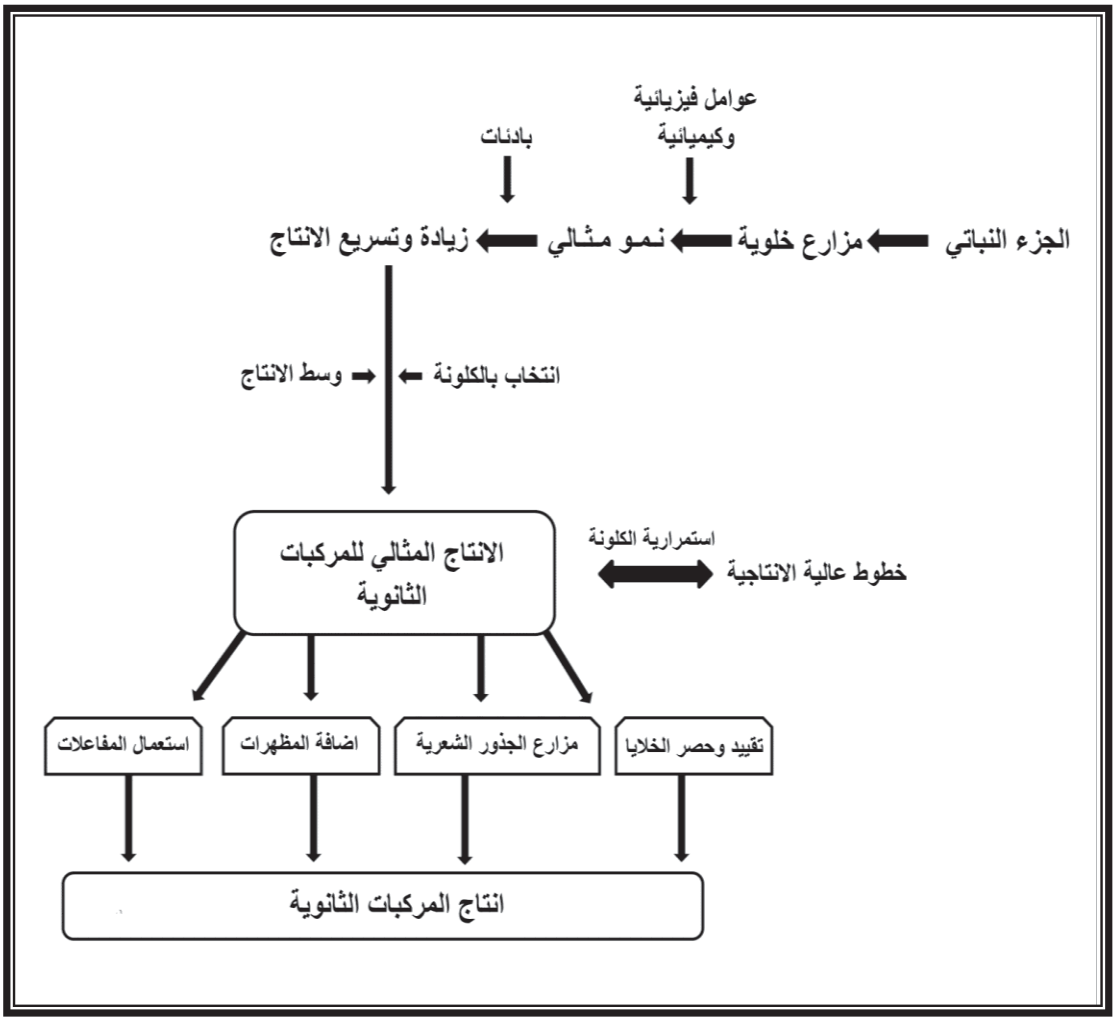
2 -2: المزارع النسيجية ودورها في إنتاج مركبات الايض الثانوي

تنتج الخلية النباتية نوعين من نواتج الأيض هي نواتج الأيض الأولي من خلال العمليات الحيوية مثل التمثيل الضوئي التي تتضمن الكاربوهيدرات واللبيدات والبروتينات التي لها دور مباشر في نمو النبات وأيضه ، ونواتج الأيض الثانوي التي هي نواتج وسطية للأيض الأولي مثل الفينولات والاستيرويدات والقلويدات والفلافونويدات وغيرها من مركبات الايض الثانوي التي لا تشترك في العمليات الحيوية التي يقوم بها النبات (Ramawat، 2008) الا انها

تعد وسيطا كيميائيا بين النبات ومحيطه، لدورها الأساسي في حماية النبات ومقاومة الآفات والحشرات الضارة والمساعدة في عملية التلقيح (Razdan، 2003).

ويقدر الباحثون اليوم وجود 100000 نوع من المركبات الأيضية الثانوية ذات الأهمية العلاجية (Vanisreeوآخرون، 2004)، فضلا عن أهميتها الاقتصادية كونها تستخدم كمكملات غذائية ومبيدات وصبغات (Khan وآخرون، 2009)، فقد أكدت منظمة الصحة العالمية WHO إلى أن 80% من البشر يعتمدون على الأدوية من مصادر نباتية في العلاج الطبي الشعبي (Hartman، 2004).

يمكن زيادة معدلات النمو وإنتاج مركبات الأيض الثانوي إلى أعلى مستوياتها، من خلال تنظيم العوامل الكيميائية والفيزيائية عند الزراعة مختبريا وإنتخاب خلايا عالية الإنتاجية، فضلا عن استعمال أوساط إنتاج مناسبة. فقد أشار Ramawat (2008) إلى طرق التقانات الحيوية، المختلفة المستعملة في إمكانية تحقيق إنتاج مثالي من مركبات الأيض الثانوي (شكل.3).



الشكل (3): التقنيات المختلفة المستعملة لتحقيق إنتاج مثالي لمركبات الايض الثانوية (Ramawat، 2008)

وتعد مزارع الكالس ومزارع المعلقات الخلوية احدى التقنيات الحيوية التي بالإمكان أن تكون المصادر البديلة لسد الحاجة المتزايدة إلى نواتج الأيض الثانوي الصيدلانية بالرغم من ان هذه المزارع في الكثير من الأحيان لا تنتج مستويات أعلى من المصدر النباتي الطبيعي (Dvey و Anthony، 2010).

وقد أجريت دراسة لغرض عزل وتشخيص مركبات Physalin فقد ذكر Azlan وآخرون (2002) عند المقارنة بين جذور نبات *Physalis minima* والجذور الشعرية المحورة وراثيا والمستحثة بواسطة التلقيح ببكتريا *Agrobacterium rhizogens* من السلالة LBA490Z والنامية على أوساط غذائية مختلفة في ظروف الضوء والظلام في محتواها من

مركب Physalin، إن أعلى مستوى لكل من Physalin F وPhysalin B ثبت في مزارع الجذور الشعرية النامية على وسط B5 حيث بلغت قيمتها 4.15 و1.82 ملغم.غم $^{-1}$وزن طري على التوالي عند نموها في ظروف الظلام بينما سجلت مزارع الجذور الطبيعية كميات تراوحت بين 3.30–3.75 ملغم.غم$^{-1}$ وزن رطب لمركب Physalin F وبين 1.60–1.62 ملغم.غم$^{-1}$ وزن رطب لمركب Physalin B.

وأشار Azlan واخرون (2005) إلى أن محتوى الفايسلين الكلي في مزارع الكالس ومزارع الخلايا المعلقة لنبات *Physalis minima* يكون أقل مما موجود في النبات الكامل بمعدل 2.17 – 44.48 ملغم.غم$^{-1}$ وزن طري على التوالي، وأن أعلى محتوى لمادة الفايسلين 1.33 ملغم.غم$^{-1}$ وزن طري قد سجل بمزارع الكالس المستحثة على قطع الجذور وتلاها في محتوى كالس الأوراق والسيقان حيث سجل كمية بلغت 1.17 – 0.73 ملغم.غم$^{-1}$ وزن طري على التوالي في حين سجلت أعلى القيم المعنوية لمحتوى الفايسلين الكلي في مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان البالغ 1.77 ملغم.غم$^{-1}$ وزن رطب والذي لم يختلف معنويا عن قيم محتوى الفايسلين الكلي في المزارع الخلوية المشتقة من كالس الأوراق والبالغ 1.50 ملغم.غم$^{-1}$ وزن طري وسجلت مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس خلايا الجذور قيمة بلغت 1.24 ملغم.غم$^{-1}$ وزن طري. وأشارت الدراسة إلى أن محتوى مزارع الكالس المشتق من الأوراق والسيقان والجذور من مركب الفايسلين نوع B لم تختلف معنويا عن نظيراتها من مزارع المعلقات الخلوية المشتقة منها، وإن أعلى القيم لمركب فايسلين B والبالغة 0.68 ملغم.غم$^{-1}$ وزن طري قد سجلت بالكالس المستحث من الأوراق في حين زادت متوسطات محتوى المعلقات الخلوية من فايسلين F بمعدل 1.2 – 4.0 ملغم.غم$^{-1}$ وزن طري عن نظيراتها من مزارع الكالس، فقد سجلت مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان قيمة

بلغت 1.32 ملغم.غم$^{-1}$ وزن طري في حين بلغت أعلى القيم لمركب الفايسلين F في مزارع الكالس المستحث من قطع الجذور اذ سجلت قيمة بلغت 0.78 ملغم.غم$^{-1}$ وزن طري.

أشارت حاتم (2016) عند دراستها نسب تواجد مركب Physalin A و Physalin B في مزارع الكالس لنبات *P.angulata* L. للمراحل العمرية 30 ,45 ,60 يوما ان إلى نسب تواجد Physalin A و Physalin B تراوحت بين 7.60–18.77 و12.25– 250% على التوالي، وإن أعلى وجود من Physalin A و Physalin B كان 18.77 و250 % على التوالي، تم الحصول عليه من الكالس في المرحلة العمرية 45 يوماً. كما وأشارت الدراسة ان نسبة تواجد المركبين ولجميع المراحل العمرية للكالس قد سجلت قيما أعلى من نسبة تواجد المركبين في أوراق النبات الطبيعية عند مرحلة الأزهار.

تمكنت علوان (2016) من الكشف عن مستويات الستيرويدات Withanolides في المزارع النسيجية للكالس والوسط الغذائي للمعلقات الخلوية لنبات *Withania somnifera* L.، حيث تراوحت نسبة تواجد مركبات الستيرويدات Withanolides في كل من مزارع الكالس بين 11.2 – 58.06مايكروغرام.مل-1 وفي الوسط الغذائي للمعلق الخلوي بين 0.79 – 11.62 مايكروغرام.مل–1 .وأشارت النتائج إلى قابلية الخلايا على افراز هذه المركبات إلى الوسط الغذائي، والتي يمكن أن يعتمد اساساً لإنتاج هذه المركبات في المفاعلات الحيوية.

إن المزايا المعروفة للمزارع النسيجية جعلت منها مورداً طبيعياً لإنتاج العديد من مركبات الأيض الثانوي وان من أكثر التقنيات المستخدمة في هذا المجال هي تقنية مزارع المعلقات الخلوية، وفي أدناه (الجدول 1) أمثلة متعددة لنواتج الأيض الثانوية المشتقة من مزارع المعلقات الخلوية للنباتات التي تتواجد فيها.

الجدول (1): أمثلة لبعض مركبات الأيض الثانوي ذات الأهمية الطبية المستخلصة من مزارع المعلقات الخلوية لبعض النباتات المتواجدة فيها.

اسم العلمي النبات	المادة الفعالة	الاستعمال الطبي	المصدر
Physalis angulata	Physalin F	مضاد للملاريا	(Azlan وآخرون، 2005; Sá وآخرون، 2011)
Withania somnifera L.	Withanolides	مضاد للأكسدة	(Glotter، 1991 ;علوان، 2016)
Citrus sinensis	Limonoid aglycones	مضاد للسرطان	(Geralino وآخرون، 2015)
Taxus spp.	Txol	مضاد للسرطان	(Wu وآخرون، 2001)
Stizolobium hassjoo	L-DOPA	علاج فعال لمرضى الباركنسون	(Huang وآخرون، 2002)
Podophyllum hexandrum	Podophyllotoxin	مضاد للاورام	(Chattopadhyay وآخرون، 2002)
Capsicum spp.	Capsaicin	منشط للجهاز الهضمي وللاضطرابات الروماتيزمية	(Ravishankar وRao، 2002)
Cenrella asiatica L. urban	Flavonoid	مضاد للحساسية والاكسدة والالتهابات والبكتريا والفايروسات	(Tan وآخرون، 2010)
Catharanthus roseus	Vinblastine و Vincristine	مضاد للاورام ولأنواع من اللوكيميا	(Zhao وآخرون، 2001)

2 – 3: استحثاث الكالس Callus induction

يعرف الكالس بأنه نسيج بسيط من الخلايا البرنكيمية غير منتظمة وغير متخصصة وفي دراسة العديد من العمليات الفسيولوجية وفي مجال الهندسة الوراثية، بالإضافة إلى استخدامه في تكوين الأعضاء والأجنة الجسمية وفي إنتاج المركبات الطبية والصيدلانية

وفي إنشاء مزارع المعلقات الحيوية في المفاعلات الحيوية (Trigiano وGray، 2000).

وأشار فهمي (2003) إلى استحثاث الكالس مختبريا يستوجب من إضافة منظمات النمو إلى الأوساط الغذائية، إذ تلعب الأوكسينات والسايتوكاينينات دوراً كبيراً في تحفيز تكوين الكالس. فيجب أن تكون هناك نسبة متوازنة بين الاوكسينات والسايتوكاينينات في الوسط، ويعتمد ذلك على نوع الجزء النباتي وحالته الفسلجية ومحتواه الداخلي من الهرمونات وكذلك على التركيب الوراثي للنبات نفسه.

يعد استحثاث الكالس من العمليات المهمة في الزراعة النسيجية حيث أشار Hartman وآخرون (2002) لإمكانية استحثاثه من الأجزاء النباتية المختلفة وأن العملية تمر بثلاث مراحل هي التحفيز والإنقسام والتمايز على الجزء النباتي في زراعة الأنسجة.

اجريت العديد من الدراسات لبيان تأثير منظمات النمو في استحثاث الكالس لإنواع مختلفة من جنس *Physalis* حيث أشارت حاتم (2016) عند دراستها حث الكالس من زراعة السيقان تحت الفلقية لنبات *Physalis angulata* على وسط MS مدعم بتراكيز 0.1، 0.3، 0.5، 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ من 2,4-D وأن تدعيم الوسط بالأوكسين أثر بشكل معنوي في نسبة الإستجابة لتكوين الكالس فقد سجلت التراكيز 0.3، 0.5، 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ إستجابة بلغت 100% وانحدرت هذه النسبة في التركيز 0.1 ملغم.لتر$^{-1}$ الى 33.3% وامتاز الكالس المتكون من الأجزاء النباتية ببنيته الهشة ولونه الأصفر المخضر.

وتوصل Ramar و Ayyadurai(2016) إلى استحثاث الكالس من نبات *Physalis minima* خارج الجسم الحي بصورة كفوءة من أجزاء السلاميات وأجزاء الورقة على وسط النمو MS المجهز بفيتامين B5 والمدعم بالتراكيز 1 و 2 و 3 ملغم.لتر$^{-1}$

BAP و 0.5 ، 1 ، 2 ملغم. لتر$^{-1}$ NAA و 0.5 ، 0.5 ، 1 ملغم. لتر$^{-1}$ 2,4-D و 0.5 ، 0.5 ، 1.5 IAA متداخلة وكان أعلى متوسط لحث الكالس من أجزاء السلاميات وأجزاء الورقة في وسط MS المدعم بتركيز 3.0 ملغم. لتر-1 BAP + 2.0 ملغم. لتر$^{-1}$ NAA + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ IAA.

وتمكن Sheeba وآخرون (2013) من حث الكالس من قطع أوراق نبات *Physalis minima* عند زراعتها على وسط MS المدعم بتراكيز مختلفة من منظمات النمو تضمنت NAA و 2,4-D بتركيز 0.5 ، 1.0 ، 1.5 ، 2.0 ، 2.5 ، 3.0 ملغم. لتر$^{-1}$ لوحدها أو بتداخل تراكيز NAA مع BA بتركيز 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ او بتداخل IAA بالتراكيز ذاتها مع Kin بتركيز 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$. فقد أشارت النتائج بان أعلى استجابة للكالس المستحث بلغت 80.67% في الأوراق المزروعة على وسط MS المدعم بتركيز 3.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من NAA بعد 20 يوم. وبوزن طري بلغ 1955.7 ملغم وبوزن جاف بلغ 1451.2 ملغم.

وهناك دراسة قام بها Mungole وآخرون (2011) حول استحثاث الكالس من قطع الأوراق الطرفية وجذور وعقد نبات *Physalis minima* L. وذلك بزراعة تلك الأجزاء النباتية على وسط MS المجهز بتراكيز 0.1، 0.2، 0.3، 0.4 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D أو الـــ Kin أو الـــ BAP كلا على إنفراد أوبتداخل الأوكسين مع السايتوكاينين، اذ أظهرت الدراسة أنه تم الحصول على أفضل إستجابة للاستحثاث والتي بلغت 90% بعد فترة 12 يوم عند زراعة قطع الأوراق الطرفية على وسط 2,4-D بتركيز 0.4 ملغم.لتر$^{-1}$ وقد امتاز الكالس الناتج عن هذه الزراعة بأنه ذو لون أخضر مصفر وذو قوام هش أما بعد فترة 18 يوم من زراعة قطع العقد عند التركيز نفسه من 2,4-D فقد بلغت الإستجابة 30% في حين لم تظهر أي إستجابة لقطع الجذور الا عند تركيز 0.2 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D، اذ كانت 20% بعد 20

يوماً من الزراعة على نفس الوسط وبلغت أعلى إستجابة 65% بعد 14 يوم في قطع الأوراق الطرفية بزراعتها على وسط MS المضاف اليه 0.4 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D و Kin بينما كانت الإستجابة 30% عند تداخل 2,4-D و BAP باضافة تركيز 0.4 لكل منها عند زراعة قطع الأوراق الطرفية على وسط MS بعد 24 يوم. وكانت العقد عديمة الإستجابة عند زراعتها على وسط MS المضاف اليه 2,4-D و Kin عندما أُضيف 2,4-D بتركيز 0.2 ملغم. لتر$^{-1}$ مع تركيز 0.1، 0.2، 0.3 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin ولم تظهر أية إستجابة عند اضافة 2,4-D بتركيز 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ مع تركيز 0.1، 0.2، 0.3 ملغم. لتر$^{-1}$ من BAP بينما بلغت اعلى استجابة 70% في قطع الجذور عند زراعتها على وسط MS المجهز بكل من Kin و 2,4-D بتركيز 0.4 ملغم. لتر$^{-1}$ بعد فترة 11 يوم. كما قام فريق البحث نفسه بتجربة لحث الكالس لحث الكالس على التمايز على اوساط MS المضاف اليها تراكيز مختلفة الـ Kin والـ BAP حيث كانت 0.1، 0.2، 0.3، 0.4، و2.0، 2.5، 3.0، 3.5 ملغم. لتر$^{-1}$ على التوالي وأظهرت النتائج أن أكبر عدد للأفرع بلغ 6 فرع.معاملة$^{-1}$ وبأطوال وصلت 77سم في قطع الكالس المزروعة على وسط MS المجهز بتراكيز 0.4 ملغم. لتر-1 من Kin و3.5 ملغم. لتر$^{-1}$ منBAP .

وفي أبحاث أُخرى على نباتات تابعة إلى العائلة الباذنجانية توصلت علوان (2016) من خلال دراستها لاستحثاث الكالس من السويقة تحت الفلقية لنبات *Withania somnifera* L. أن الوسط MS المدعم بتركيز 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D او NAA المتداخل مع 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ Kin سجل أعلى استجابة بلغت 100% ، وأعلى متوسط للوزن الطري للكالس بلغ 1.9680 و 3.1400 غم على التوالي، وامتاز الكالس المستحث بوجود 2,4-D بقوامه الهش، وكان قوامه صلباً بوجود NAA.

وتمكنSuthar و Shah (2015) من حث الكالس من السيقان تحت الفلقية لنبات الفلفل الحار *Capsicum annum* L. على وسط MS المدعم بتركيزين من الـ2,4-D 0.45، 0.9 ملغم.لتر$^{-1}$ المتداخلة مع تركيزين من الـ BA 0.44 ، 0.88 ملغم.لتر$^{-1}$ BA. وأظهرت النتائج أن أعلى إستجابة بلغت 86.7% على وسط MS المدعم بتركيز0.45 ملغم. لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.44 ملغم.لتر$^{-1}$ BA وانحدرت الى 53.43% على الوسط المدعم بتركيز 0.9 ملغم. لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.88 ملغم.لتر-1 BA.

وفي دراسة Adhikari و Pant (2013) لاستحثاث الكالس من قطع سيقان نبات *Withania somnifera* L. Dunalعلى وسط MS المدعم بالتراكيز 0.5 ، 1.0 ، 1.5 ، 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ من 2,4-D اوNAA منفردة أو متداخلة مع الـ BA او الـ Kin بالتراكيز ذاتها، ان جميع الأوساط حفزت تكوين الكالس. والذي تميز بلونه المصفر. وأشارت الدراسة إلى أفضلية وسط MS المدعم بتركيز 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ BA + 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ NAA في نمو الكالس.

كما أشارت دراسة قام بها Elnour وآخرون (2012) إلى إمكانية حث نسيج الكالس من أوراق نبات *Dutura starmonium* عند زراعتها على وسط MS مدعم بمنظم النمو 2,4-D لوحده بتراكيز 0.05 ، 0.5 ، 1.0 ، 2.0 ، 3.0 ، 4.0 ، 5.0 ، 6.0 ، 7.0 ملغم.لتر$^{-1}$ أو متداخلا مع Kin بتركيز 0.025 – 0.05 ملغم.لتر$^{-1}$. وأ شارت إلى أن النتائج حث الكالس استغرقت مدة ثلاثة اسابيع من الزراعة وإن أعلى استحثاث للكالس كانت في الأجزاء النباتية المزروعة على وسط MS المدعم بالتركيز 2.0 ملغم. لتر$^{-1}$ 2,4-D وإن أفضل تداخل لحث الكالس من الأوراق بعد تضمين التركيز 0.05 ملغم. لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.025 ملغم. لتر$^{-1}$ Kin.

2 – 4: إنشاء وزراعة المعلقات الخلوية

المعلقات الخلوية عبارة عن مجموعة من الخلايا المفككة تتكون من تفكك نسيج الكالس الهش أو من النسيج المتوسط للأوراق النامية في وسط سائل متحرك، ويفضل الكالس الهش غير المتماسك والسريع النمو لإنشاء مزارع المعلقات الخلوية لسهولة تفككها الى خلايا مفردة أو كتل صغيرة من الخلايا بواسطة التحريك المستمر في الوسط الغذائي السائل. وتتميز المعلقات الخلوية النموذجية باحتوائها على نسبة عالية من الخلايا المفردة، ونسبة قليلة من المستعمرات الخلوية ويعتمد ذلك أساساً على البنية الهشة للكالس، ونوع الوسط الغذائي السائل (Ramawat، 2008).

توفر مزارع المعلقات الخلوية نظاماً جيداً لدراسة سلوك الخلايا المفردة وزيادة كتلتها الحيوية من خلال انقسامها وتكاثرها في الوسط الغذائي السائل المتحرك في انشاء هذه المزارع. ومجالاً مناسباً للدراسة الفسلجية المتعلقة بجدار الخلية، فضلاً عن إمكانية استخدامها في عزل البروتوبلاست والدراسات المتعلقة بنقل الجينات أو إحداث الطفرات الوراثية كأنظمة للتحول الوراثي بتحضينها مع بلازميدات Ti او Ri المعزولة من بكتريا *Agrobacterium* لماتوفره كثرة الخلايا المفردة من فرصة أكبر لإستقبال المادة الوراثية (Hellwing، 2004 ; رشيد وقاسم، 2006 والنعمة، 2009).

ويستفاد من مزارع المعلقات الخلوية للحصول على نباتات كاملة كأنسال Clones جديدة من الخلايا المفردة التي تتميز بخواص مرغوبة بعد إختبارها وإنتخابها مثل مقاومة المبيدات والأمراض وتحمل الملوحة والبرودة والمعادن الثقيلة (Martinez–Estevez وآخرون، 2001 ; Andrade وآخرون، 2009).

فقد أشارت دراسة Lantcheva وآخرون (2001) الى تكوين نبات كامل من زراعة الخلايا المفردة للنبات البقولي العلفي الجت *Medcago truncatula* حيث بدأت الخلايا إنقسامها الأول خلال 3 أيام من الزراعة وتكوينها المستعمرات الخلوية ما بين 14–21 يوماً من الزراعة مكونة كالس أخضر اللون أبدى قابليته على التمايز في أوساط التمايز المناسبة خلال 4 أسابيع. وذكرت بعض الدراسات تميز نبات فول الصويا *Glycin max* الناتج من المعلقات الخلوية بإكتسابه صفة المقاومة للإصابة بفطر *Fusarium solani* عند زراعتها في التربة وكذلك مقاومتها للفطر *Septoria* (Song وآخرون، 1994; Jin وآخرون، 1996).

ولمنظمات النمو دوراً كبيراً في إنشاء وزراعة المعلقات الخلوية (Güral وآخرون، 2002) إذ أشار النعمة (2005) إلى إنشاء مزارع المعلقات الخلوية من الكالس المشتق من سيقان نبات فول الصويا *Glycine max* في الوسط السائل MS المضاف إليه 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ NAA +2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ BA ، وبينت النتائج أن الزيادة في متوسط النمو تصاحبت مع مدة نمو المعلق الخلوي، إذ بلغ أعلى متوسط نمو للخلايا 174 × 10 خلية.مل$^{-1}$ في اليوم السادس وتراوحت نسبة حيوية خلايا المعلق الخلوي خلال فترة نموها بين 47–81%، وأدت زراعة كثافات (60، 73، 85، 101، 122، 174، 134) × 10^{6} خلية.مل$^{-1}$ بطريقة الطمر في قطرات الاكار المتعددة Multiple Drop Arrays (MDA)، إلى نجاحها وكفاءتها في زيادة سرعة انقسام الخلايا وتكوين المستعمرات الخلوية حيث بلغت 2159 مستعمرة عند الكثافة 101 × 10^{6} خلية.مل$^{-1}$ وتطورها الى بادئات الكالس التي تراوحت نسبة تكوينها ما بين 10–285% بالإعتماد على الكثافات المستخدمة.

وفي إحدى الدراسات، تمكنت رشيد وقاسم (2006) من إنشاء المعلقات الخلوية من الكالس الهش المستحث من السيقان تحت الفلقية لنبات زهرة الشمس *Helianthus annuus*

المستحث على وسط MS المدعم بتركيز 1.0 ملغم. لتر$^{-1}$ NAA و2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ BA. وأظهرت نتائج إنشاء مزارع المعلقات الخلوية إن الكالس الهش كان مناسباً للحصول على هذه المزارع في وسط MS السائل لسهولة تفكك خلاياه والحصول على كثافات عالية من الخلايا.

وتمكن الملاح وزيدان (2006) من إنشاء المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان بادرات الباقلاء *Vicia faba* الصنف المحلي، بإعتماد وسط MS السائل المدعم بتركيز 1.0 ملغم. لتر$^{-1}$ NAA و0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ BA وأظهرت النتائج إن معدل النمو بدأ بالزيادة خلال اليوم الرابع إذ بلغ أعلى معدل للانقسام 75% وتراوحت نسبة حيوية الخلايا ما بين 39–77%، وأدت زراعة كثافات (5.6، 4.8، 4.2، 3.7، 3.3، 3.2، 3.0، 2.9) × 10^{3} خلية.مل$^{-1}$ من هذه المعلقات بطمرها في قطرات الأكار الى نجاحها وكفاءتها في تشجيع إنقسام الخلايا وتكوينها المستعمرات الخلوية التي بلغت 68% عند الكثافة 5.6 × 10^{3} خلية.مل$^{-1}$ وتطورت أعداد من هذه المستعمرات إلى بادئات الكالس التي تباينت في نسب تكوينها بين 25–50%.

كما أشارت نتائج دراسة الملاح وزيدان (2008) إلى نجاح إنشاء المعلقات الخلوية المشتقة من الكالس الهش لسيقان نبات فول الصويا *Glycine max* النامية على وسطي MS و B5 المدعمة بتراكيز 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ NAA و 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ BA + 0.2 ملغم. لتر$^{-1}$ NAA و 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ BA + 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ NAA و 5.0 ملغم. لتر$^{-1}$ BA. وأظهرت خلايا هذه المزارع في نموها نمطاً واضحاً في جميع الأوساط على الرغم من الإختلاف في تراكيز الإضافات من منظمات النمو. وسجلت أعلى كثافة للخلايا والبالغة 7.3 × 10^{5} خلية.مل$^{-1}$ في هذه المزارع في وسط MS المدعم بتركيز 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ BA و 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ NAA وسجلت أدنى كثافة للخلايا، اذ بلغت 4.9 × 10^{5} خلية. مل$^{-1}$ في اليوم السادس من عمر المزرعة، وأكدت نتائج زراعة كثافات مختلفة (4.9، 6.9، 7.3) × 10^{5} خلية. مل$^{-1}$ في

وسط MS تشجيعها تكوين أعداد كبيرة من المستعمرات الخلوية التي تحول قسم كبير منها الى بادئات كالس تراوحت أعدادها بين 319–781 بادئة.

وفي دراسة للنعمة (2009) تمكن من إنشاء مزارع المعلقات الخلوية لنبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* من كالس أوراقه في الوسط MS السائل المدعم بتراكيز 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.1 ملغم.لتر$^{-1}$ BA، وأظهرت النتائج إن كالس أوراق القرنفل الهش كان ملائما لانشاء المعلقات الخلوية في وسط MS المدعم بالتراكيز المذكورة، وشجع إنقسام الخلايا التي بدأت انقسامها الاول بعد مرور 72 ساعة من عمر المزرعة، وأعقبتها الانقسامات الخلوية الاخرى إلى أن وصلت المزرعة لأعلى كثافة بلغت 420 × 10^{3} خلية.مل$^{-1}$ من التعليق أعقبها ثبات عدد الخلايا قي اليوم السادس والسابع نتيجة توقف انقسام الخلايا.

وتمكن المهداوي (2013) من إنشاء مزارع إنموذجية للمعلقات الخلوية لنبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* من كالس العقد الفلقية والسيقان تحت الفلقية في الوسط السائل MS المدعم بتراكيز 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ BA + 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ NAA، وأدت زراعة هذه المعلقات بطمرها في قطرات الأكار المتعددة (MDA) في وسط الاستحثاث بحالته الصلبة إلى انقسام الخلايا وتكوين المستعمرات الخلوية وتطورها إلى منشأت الكالس ونموها إلى قطع صغيرة الحجم من الكالس ومن ثم تمايزها الى أفرع عند إعادة زراعتها في الوسط MS الصلب المدعم بتركيز 0.3 ملغم.لتر$^{-1}$ Zeatin متداخلا مع 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ NAA.

كما نجحت رشيد (2013) من زراعة كثافات (4.2، 7.8، 11.2، 13.0، 9.8، 7.5) × 10^{2} خلية.مل$^{-1}$ من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنبات البطيخ *Cucumis melo* L. بطريقة قطرات الاكار لتكوين أعداد من منشأت الكالس، تطورت

هذه المنشأت إلى تكوين مزارع إنموذجية من الكالس شبه الهش ذو اللون الأخضر المائل للاصفرار.

استطاع محمد والملاح (2015) إنشاء المعلقات الخلوية لنبات الجزر *Daucus carota* L. من كالس سيقانه في الوسط السائل MS المدعم بتركيز 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ لكل من NAA و BA. وبلغت كثافتها 3.4 × 10^{5} خلية.مل$^{-1}$ في اليوم الثالث من إنشائها واستمرت خلاياها حين زراعتها بطمرها في قطرات الأكار المتعددة (MDA) من متابعة إنقسامها وتكوينها المستعمرات الخلوية وإنتاجها أعداد كبيرة من منشأت الكالس، مكونة مزارع الكالس.

توصلت علوان (2016) إلى إمكانية إنشاء المعلقات الخلوية لنبات *Withania somnifera* L. من كالس السيقان تحت الفلقية على الوسط MS السائل المدعم بتراكيز 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D و0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ Kin، وأدت زراعة الكثافات (1.0، 1.52، 1.79، 2.03) × 10^{4} خلية.سم^{3} بطريقتي النشر والطمر في وسط الاستحثاث بحالته الصلبة إلى إنقسام الخلايا وتكوين المستعمرات الخلوية وتطورها إلى منشأت الكالس ونموها إلى قطع صغيرة الحجم من الكالس، وأظهرت النتائج تفوق طريقة الزراعة بالنشر على طريقة الطمر عند زراعة الكثافات المختلفة من المعلقات الخلوية في أعداد المستعمرات الخلوية وأعداد منشأت الكالس المتكون منها، فقد بلغ معدل أعداد المستعمرات الخلوية 27.6 مستعمرة.طبق$^{-1}$ عند زراعة الكثافة 2.03 × 10^{4} خلية.سم^{3} بطريقة النشر، في حين بلغ معدل أعداد المستعمرات بطريقة الطمر 20.4 مستعمرة.طبق$^{-1}$ عند زراعة الكثافة ذاتها وتفوقت الكثافة 2.03 × 10^{4} خلية.سم^{3} في اعطاء منشأت كالس بلغ عددها 58 منشأ.طبق$^{-1}$ بعد 20 يوم من زراعة الخلايا المعلقة بطريقة النشر، وبلغ عددها 6 منشأ.طبق$^{-1}$ بعد 25 يوم من زراعة الخلايا المعلقة بطريقة الطمر.

2 –5: المفاعلات الحيوية

يعتبر المفاعل الحيوي الجزء الرئيسي في أي عملية زراعة حيوية لتلك الكائنات وأن هذه المفاعلات قد تم تطويرها بشكل أولي في مجال زراعة الاحياء المجهرية ثم في مجال المعلقات الخلوية النباتية فيما بعد لغرض تكوين كتلة حيوية للخلايا النباتية لغرض إنتاج مركبات الأبض الثانوي (Rittershaus وآخرون، 1989). وقد عرف Scragg (1994) المفاعل الحيوي بأنه عبارة عن وعاء زجاجي أو فولاذي يستخدم في زراعة الكائنات الحية كالجراثيم والخلايا النباتية والحيوانية. يشير مصطلح المفاعل الحيوي إلى أي أداة مصنعة أو جهاز تمت هندسته ليسمح بنمو البيئة الحيوية بشكل نشط (Decker وReski، 2008)

وعند مقارنة تقانات المزارع النسيجية البسيطة مع تقانة المفاعلات الحيوية تجارياً وجد بأنه يمكن إستخدام الأخيرة كبديل عن التقانات البسيطة في إنتاج النباتات وإستخلاص المركبات الفعالة منها وذلك لإحتياجها لجهد أقل وحيز أصغر و أوعية زراعة أقل فضلا عن رفع القدرة الكيمياوية لإنتاج مركبات الأيض الثانوية بمستويات عالية وبتكاليف أقل (الرفاعي والشوبكي، 2002).

وأشار Razdan (2003) الى إستخدام المفاعلات الحيوية كمزارع مستمرة لزراعة الخلايا النباتية بكثافات قليلة تحت ظروف مسيطر عليها لزيادة تنسيل الخلايا المفردة لإمكانية تطبيقها في عملية التطفير الإنتقائي وبناء النواتج النباتية الطبيعية. وهناك مجموعة من المفاعلات الحيوية المستعملة في تنمية الخلايا النباتية وإنتاج مركبات الأيض الثانوي والتي صنفت الى أصناف عدة بالإعتماد على طريقة التحريك بدرجة أساسية الى:

- التحريك الميكانيكي
- التحريك الهوائي
- التحريك الإهتزازي
- التحريك بواسطة الطبلة الدوارة
- التحريك بواسطة مرشحة سبين (Souret وآخرون، 2003)

وأن الأداء الأمثل لأي مفاعل حيوي يعتمد على عوامل عدة منها تركيز الكتلة الحيوية للخلايا الذي يجب أن يبقى عالياً، واستمرارية ظروف التعقيم، والتوزيع المتساوي للمغذيات التي تنمو فيها الخلايا في المفاعل من خلال التحريك المستمر، بالإضافة الى ضبط درجة الحرارة وكمية الاوكسجين ومقدار الخلايا المحصودة (Hilton وRhodes، 1990 وNuutila وآخرون، 1994). ومن المفاعلات الحيوية المستخدمة بوفرة ولأغراض مختلفة هي المفاعلات صغيرة الحجم التي يبلغ حجمها ما بين 100 – 500 مل فضلاً عن قيامها بوظيفتها بطريقة مشابهة لعمل المفاعلات الحيوية الكبيرة فانها تتميز بفرصة نمو أسرع للخلايا وبكلفة نمو أقل (Kumar وآخرون، 2004).

وأدى تطوير المفاعلات الحيوية على اختلاف انواعها إلى حصول نقلة نوعية في مجال تطبيقات الزراعة النسيجية عموما والاكثار الدقيق خصوصا بالاضافة إلى إنتاج المئات من التحضيرات الدوائية والتجميلية باستعمال المعلقات الخلوية داخل المفاعلات الحيوية (الصميدعي، 2017).توصل Konstas وKintzios (2003) إلى إنتاج مادة الشيكونين Shikonin باستخدام المفاعل الحيوي ذو الطبلة الدوارة من زراعة الكتلة الحيوية الخلوية لنبات عين البزون *Catharanthus roseus* ونبات *Lithospermum erythrorhizon*.

تمكن Vongpaseuth وRobert (2007) من إنتاج Paclitaxel المركب الثنائي التربين متعدد الاوكسجين من خلايا نبات الطقسوس *Taxus brevifolia* باستخدام المفاعلات الحيوية سعة 75000 لتر.

تمكن Schurch وآخرون (2008) من إنتاج بعض المستحضرات التجميلة من الكتلة الحيوية لمعلق خلايا التفاح باستخدام المفاعلات الحيوية متوسطة الحجم ذات التحريك العالي لتفكيك الخلايا واطلاق جميع مكوناتها المفيدة الى داخل الوسط.

وأشار Davey وAnthony (2010) إلى استخدام المفاعل الحيوي ذي التحريك الهوائي لزراعة خلايا نبات الريحان الحلو *Ocimum basilicum* لإنتاج المركب الفينولي منه حامض الروزمارينك Irosmarinic acid.

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة في مختبر زراعة الخلايا والأنسجة النباتية التابع لقسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصرفة بجامعة ديالى خلال الفترة من من أيلول/2016 ولغاية آيار/2017، نفذت هذه الدراسة بهدف الحصول على مزارع خلايا معلقة إنموذجية لنبات كرز الأرض *Physalis angulata* L. ذي القيمة الطبية والصيدلانية، والمشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنبات كرز الأرض النامي على وسط MS المدعم بتراكيز مختلفة من 2,4- Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) وNaphthalene acetic acid NAA) المتداخلة مع Kinetin (Kin) أو Benzyl adenine (BA) ومن ثم متابعة نتائج زراعتها بطريقتي النشر والطمر، وتحديد الكثافة الحرجة من الخلايا المترسبة لنمو المزارع المستمرة المغلقة والمزارع الكمية، ثم الاستخلاص والكشف والتشخيص والتقدير الكمي لمركب الفايسلين A والفايسلين B في الكالس المشتق من السيقان تحت الفلقية بعمر 30 يوماً، وفي الوسط الغذائي السائل للمزارع المستمرة المغلقة بعد 7، 14، 21 يوماً، فضلاً عن الخلايا المحصودة من المزارع الكمية ومقارنتها بالأوراق النامية في الحقل وتشير النتائج الآتي:

1- إن أعلى استحثاث للكالس المتكون من السيقان تحت الفلقية بلغ 100% عند المعاملة بتركيز 0.3 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D أو 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ NAA مضاف له مع 0.25 ملغم.لتر$^{-1}$ BA مقارنة مع معاملة المقارنة التي بلغت 0%، وبمتوسط وزن طري للكالس بلغ 0.658 و1.440 غم على التوالي. وأظهر تداخل 2,4-D أو NAA بتركيز 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ +0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ Kin نسبة استحثاث بلغت 100% مقارنة مع معاملة المقارنة التي بلغت 0%، وأعلى معدل للوزن الطري للكالس بلغ 1.636 و1.528 غم على التوالي. امتاز الكالس المستحث بوجود 2,4-D المضاف له Kin عن باقي التداخلات بقوامه الهش.