جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

زراعة نبات لسان الحمل السهمي *Plantago lanceolata* L. خارج الجسم الحي وتقدير مادة الهلام النباتي في مزارع الكالس

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى وهي جزء من

متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

زينب محمد جلوب البهادلي

بكلوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

2008 - 2009

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

مثنى محمد إبراهيم

الأستاذ المساعد الدكتور

تلفان عناد أحمد

1442هـ

2020 م

TDZ	Thiadiazuron
UV	Ultraviolet
V\V	Volume \ Volume
V\V	Volume \ Volume
W\V	Weight \ Volume
W\V	Weight \ Volume

1. المقدمة (Introduction) :

توفر النباتات مصدرا مهما للمنتجات الطبيعية، إذ تشكل الكثير منها الأساس للعديد من العقاقير ذات الأهمية الطبية على الرغم من التطور الهائل في مجال العقاقير الصناعية في الوقت الحاضر، ولا يزال طب الأعشاب أو الطب الشعبي يحتفظ بمكانته الشعبية إذ يلجأ اليه ما يقارب الى 80% من سكان العالم وخاصة في البلدان النامية لرواج فكرة أفضليتها عند أستعمالها كعلاج لجسم الأنسان وقلة ظهور آثار جانبية (Jain وآخرون ، 2012)، فقد أثبتت المعلومات المتراكمة المدعمة بالتجارب العلمية عبر أجيال كثيرة الفاعلية العالية للنباتات الطبية في معالجة الكثير من الأمراض من خلال استخدامها بصورة طبيعية أو عن طريق مكوناتها الفعالة المستخلصة منها، إذ استخدمت مستخلصات بعضها تقليدياً في تخفيض مستوى اليوريا في الدم وفي

معالجة داء الخرف المبكر (Dementia) وداء النسيان (Alzheimer’s disease) وفي علاج بعض أنواع السرطان، كما أثبتت الدراسات الحديثة فعاليتها الطبية تجاه عدد من المسببات المرضية (Meyers و Liston، 2008).

أن التطور الحاصل في أدخال التقانات الحياتية في العديد من المجالات الزراعية والصناعية والطبية لاسيما تقنية زراعة الأنسجة النباتية Plant Tissue Culture خارج الجسم الحي كونها مصدر بديل عن أساليب الزراعة التقليدية خصوصاً لإكثار النباتات المهمة طبياً بعيداً عن ظروفها البيئية وتحت ظروف مختبرية مسيطر عليها لإنتاج المواد الفعالة ذات الاستعمالات المختلفة التي يمكن إنتاجها طيلة أيام السنة دون التقيد بموسم النمو، فضلاً عن أمكانية زيادة إنتاج المزارع من المواد الأيضية من خلال التلاعب بأنواع وتراكيز منظمات النمو النباتية لتوجيهها نحو الهدف المقصود عن طريق انتخاب الخلايا Cells Selection والمستعمرات الخلوية Colonies ذات الإنتاجية العالية، أذ تتجمع هذه المركبات بمستويات أعلى في الخلايا المزروعة خارج الجسم الحي عنه في النبات الأم (Sree وآخرون ، 2010 و بإصلاح ، 2008 و Sarin ، 2005).

مما تقدم تهدف الدراسة الحالية إلى:

1- دراسة تأثير تراكيز مختلفة من (Benzyladenine (BA و(Kinetin (Kin في تضاعف العقد الفلقية.

2- دراسة تأثير تراكيز مختلفة من (Indole-3- butyric acid (IBA في تجذير الأفرع المتضاعفة.

3- دراســــة تأثير تداخلات مختلفة من (2,4-D) 2,4 Dichlorophenoxy actice acid أو (NAA) Naphthalene acetic acid متداخلاً مع (Kin) Kinetin بتراكيز مختلفة في أستحثاث الكالس من الأوراق الحقيقية.

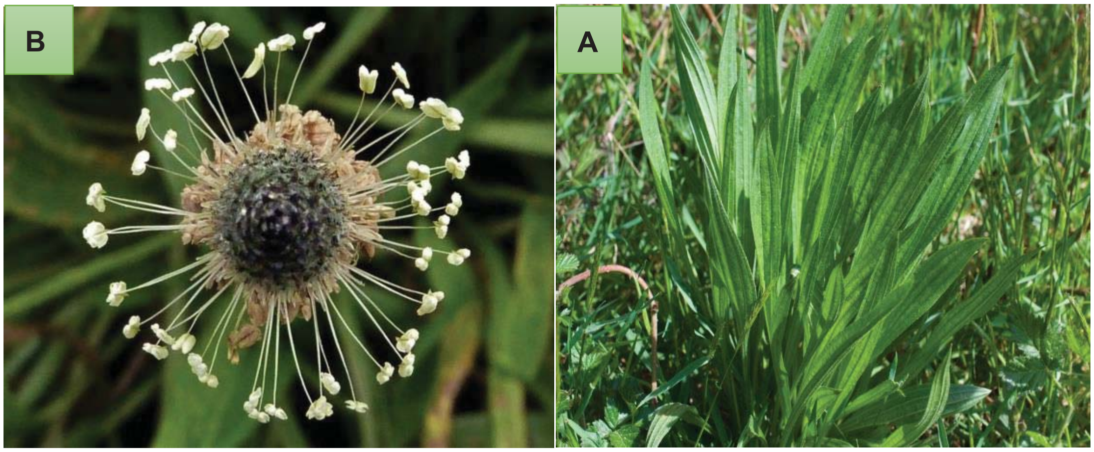
4- أستخلاص المادة الهلامية من المزارع النسيجية وتحليل تركيبها من السكريات والأحماض الدهنية والأمينية.

2- استعراض المراجع (Literature Review) :

2-1 : نبات لسان الحمل السهمي (*Plantago lanceolata* L.) :

ينتمي نبات لسان الحمل السهمي .*P. lanceolata* L الى العائلة الحملية Plantaginaceae وهو من النباتات العشبية الحولية، عشبة تنمو بشكل زهري Rosette يتألف من جذر رئيسي Taproot تتفرع منه جذور ليفية Fibrous وأوراق قاعدية Basal رمحية lanceolate يتراوح طولها بين 5-40 سم وعرضها بين

0.5- 4 سم ذات تعرق طولي تحتوي على 3-5 عروق Veins، محمية بحزمة من شعيرات طويلة تظهر السيقان المزهرة Flowering stalks (الشكل 1) عديمة الأوراق جذعية Scapes وتمتد من منطقة التاج مباشرةً، يبلغ طولها بين 15-50 سم وتحمل أزهار كاملة Perfect Flower، صغيرة وكثيفة بحجم 2.5-5 ملم صفراء Yellow أو سمراء Brownish متجمعة في شكل سنبلة Spike على الجزء العلوي من الساق الزهري، كل زهرة تتكون من تويج corolla أخضر صغير مفصص Lobed بطول 1.5-2.8 ملم مكون من 4 أوراق كأسية Calyx و 2 من الأسدية البيضاء Whitish anthres ومدقة واحدة Pistil ، تتفتح الأزهار بشكل حلقة Ring تفتح من أسفل رأس النورة أولاً وتتحرك ببطء بإتجاه الأعلى، يتم استبدال كل زهيرة بكبسولة تحتوي بذرة صغيرة Capsule بيضاوية Ovoid الشكل يتراوح طولها بين 3-4 ملم، البذور بنية داكنة Dark brown أو سوداء Black بطول 2.3-3 ملم (Wagner وآخرون ، 1999).



الشكل (1) A : صورة لنبات لسان الحمل السهمي .*Plantago lanceolata* L النامي في البيت النباتي

B : زهرة لسان الحمل السهمي (Khalaf وآخرون ، 2018)

Scientific Classification ويصنف النبات علمياً

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Viridiplantae

Infrakingdom : Streptophyta

Superdivision : Embryoohyta

Division : Trachephyta

Subdivision : Spermatophytina

Class : Magnoliopsida

Superorder : Asteranae

Order : Lamiales

Family : Plantaginaceae

Genus : Plantago

Species : *Plantago lanceolata* L.

(Xu و Chang ، 2017)

تناولت الدراسة الحالية زراعة نبات لسان الحمل *Plantago lanceolata* L. الذي ينتمي الى العائلة الحملية Plantaginaceae، أحد أشهر الأسماء لهذا النوع هو لسان الحمل السناني (Ribwort) والموز الإنكليزي (English Plantain) والمعروف أيضا في العراق باسم لسان الحمل السهمي (Lamb's Tongue) أشتق أسم الجنس *Plantago* من الكلمة اللاتينية Planta التي تعني باطن القدم تشبيهاً لشكل ورقة بعض أنواعه فضلاً عن أن بذوره تنتشر الى مسافات طويلة نتيجة لألتصاقها بأقدام أي شخص يمر عليها

كونها تصبح لزجة عندما تكون مبللة أو رطبة لأحتواء غلاف البذرة على المادة الهلامية Mucilage ونتيجة لذلك يمكن أن يكون هذا أحد الأسباب وراء العثور على نبات لسان الحمل في أماكن كثيرة من العالم (Kreitschitz وآخرون ، 2016) يتضمن هذا الجنس 200 نوع يتكون معظمها من الأعشاب والشجيرات والنباتات المائية (Baroni وآخرون ، 2000) وهو نبات بري واسع الانتشار ينمو في المروج والمراعي وعلى جوانب الطرق ويمكن زراعته في التربة الخصبة نسبيا تحت أشعة الشمس (Tack و Liisa–laine ، 2014) للنبات تاريخ طويل في علاج العديد من الأمراض فهو مفيد جدا في علاج أنواع كثيرة من الجروح وعلاج لسعة الحشرات كالنحل والدبابير وعلاج عضة الحيوانات كالكلاب كما تستعمل أوراق النبات في علاج التهاب دوالي الساقين وحالات التهاب الاذن، كما يستعمل الشراب أو العصير المستخلص منه لعلاج بعض الأمراض الصدرية منها التهاب القصبات والسعال الديكي والسل وفي معالجة سوء الهضم واضطرابات المعدة والأمعاء والتهاب المثانة والتبول الليلي وحرقان البول والأسهال ولتقوية البنية للضعفاء من الأطفال والأحداث (المعاضيدي ، 2007)، ترجع الخاصية العلاجية لأحتوائه على الصمغيات Mucilages والكلايكوسيدات Glycosides خاصةً الاوكيوبين Aucubin والفلافونويدات Flavonoids والصابونيات Saponins والعديد من المعادن كالكالسيوم والحديد والمغنيسيوم والزنك والفيتامينات Vitamins A ، B ، C (Abdul Ratha و Mohammad ، 2012 و Dalar وآخرون ، 2012).

يمتاز النبات بقدرته العالية على تحمل الجفاف والبرد ينمو تحت ضوء الشمس الكامل ولا يمكن أن ينمو في الظل، pH الملائم يتراوح بين 6.5 – 7 وهو جيد النمو في الترب الرملية والثقيلة الرطبة وحتى الأماكن الشديدة الجفاف والغابات الممطرة الأستوائية ، يُزهر النبات خلال الفترة من نيسان الى آب وتصبح البذور ناضجة خلال الفترة من حزيران الى كانون الأول، موطنه الأصلي أوروبا كما يتواجد في شمال أفريقيا وغرب أسيا وجنوب أمريكا وأستراليا، أنتشرت زراعته في جميع المناطق المعتدلة من العالم (Jacke و Toensmeier ، 2005 و Laine ، 2005)

2–2 : الأهمية الأقتصادية والطبية لنبات لسان الحمل السهمي

(The economic and medical importance of the plantago plant) :

يُعد نبات لسان الحمل مصدراً أقتصادياً هاماً ذا نطاق واسع ضمن المجتمعات العشبية المسترزعة في جميع أنحاء العالم، أذ يتواجد بشكل طبيعي في العديد من المراعي وله تاريخ طويل من الأستعمال كنبات علفي ثانوي خاصة في أوروبا (Foster ، 1988) ، يسترزع من أجل قشور ثمره وبذوره وتعود لفعاليتهُ الطبية لأحتوائه على مادة هلامية وزيتاً ثابتاً ومواداً نشويةً ومادة الأوكيوبين Aucubin التي تعد من أهم أصناف الكلايكوسيدات Glycosides المتواجدة في النبات (Bowers ، 1991) ، كما تشتهر عشبة لسان الحمل بمفعولها العالي في معالجة الجروح وبميزتها كترياق مضاد للسمية وإرتفاع حرارة الجسم، يحتوي النبات كذلك على الـTannic acid الذي يُعد مادة طبية تعمل على تقليص الأنتفاخ والالتهابات ويخفف من حدة النزيف الأمر الذي يفسر أستعمالهُ تقليدياً في علاج السل ونزيف المعدة ونزف القولون (Tzonev و Karakiey ، 2007)، فضلاً عن الأستعمال التقليدي أيضاً لأوراقه بعد الغلي لعلاج حالات الربو Asthma (شمس الدين ، 2000) وأستعمل النبات في الحمية الغذائية فقد أشارت نتائج دراسة إجريت لمعرفة تأثير المادة الهلامية في بذور لسان الحمل التي أعطيت بجرعات مكونة من 3 غرام مذابة في كوب من الماء وتشرب قبل الأكل بنصف ساعة لعدد من النساء البدينات وضعن على حمية خاصة ، إن النساء اللائي أعطين بذور لسان الحمل نقص وزنهن بمعدل 60 % مقارنة بنساء أخريات بنفس البدانة (Chiang وآخرون ، 2003) ولقد أثبت الدستور الألماني نجاح بذور لسان الحمل في علاج الإمساك بجرعة تتراوح بين 3 – 10 ملاعق شاي يومياً (lezama وآخرون ، 2006) كما أستعملت مستخلصات الأوراق الجافة في علاج الحروق والتقرحات (عرموش ، 2007)، إذ يعزى تأثيره الملطف والمهدئ بشكل خاص نتيجة التركيز العالي للمادة الهلامية التي تعمل على حماية الطبقة المخاطية من المهيجات مما يجعلهاً ناجحة لعلاج ألتهاب الشعب الهوائية والسعال الجاف (Tita وآخرون ، 2009).

وأشارت دراسة Abdul Ratha و Mohammad (2012) لتحديد فعالية المستخلص الكحولي لأوراق نبات لسان الحمل السناني ضد البكتريا العنقودية الرمية المعزولة من حالات التهاب المجاري البولية في الأنسان والحيوان، الشفاء منها بعد 21 يوم من العلاج وهذا يعود لاحتواء النبات على العناصر المعدنية كالزنك وفيتامين A و C التي تساعد على التئام المناطق المتقرحة في جدار المثانة، كما توصل Farahpour وHeydari (2015) الى عقار مستخرج من نبات لسان الحمل هو حبيبات الـ Agiolax MADA لعلاج

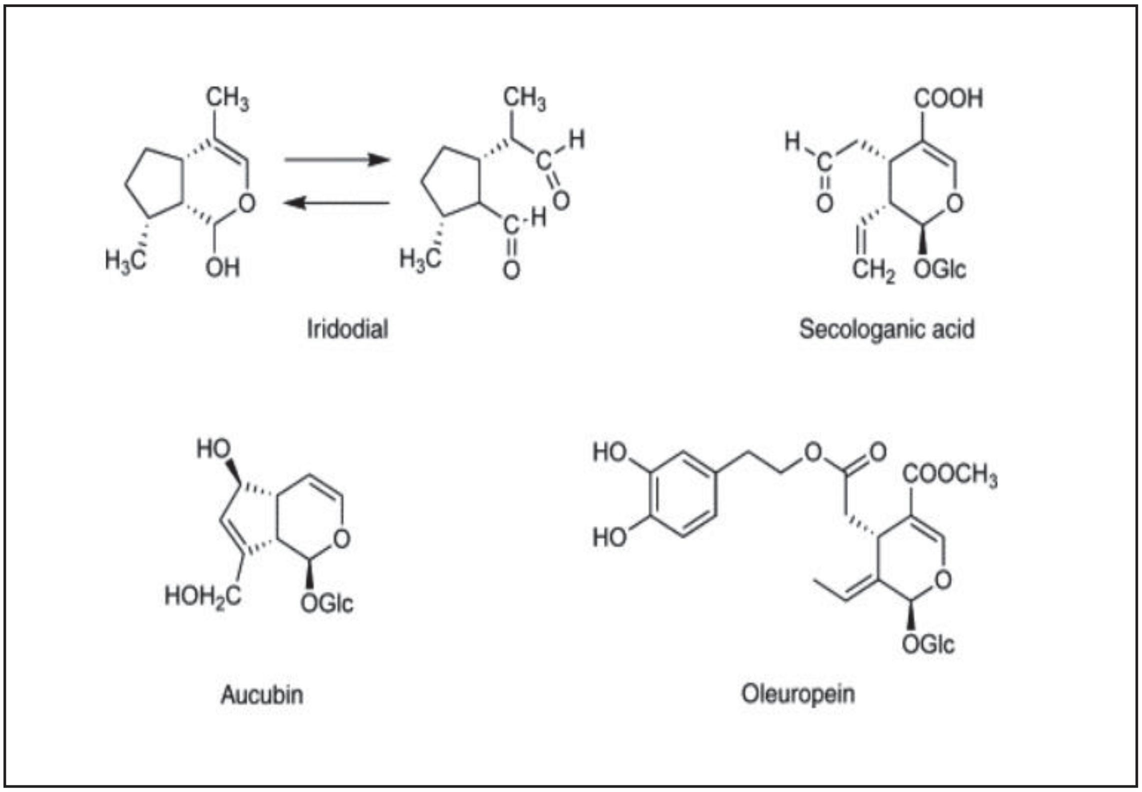
مشاكل الجلد مثل القرح والتهابات اللدغات والجروح فهو فعال وآمن لوقف تدفق الدم وشفاء الأنسجة المصابة ، وبينت Abed و آخرون (2016) عند دراستهم لـ 7 مستخلصات من الأوراق الفتية الطرية والجافة وبتراكيز مختلفة أن النبات غني بالمواد الفعالة التي لها القدرة على تثبيط النمو البكتيري حسب تركيز المادة الفعالة ونوع البكتريا.

3-2 : مركبات الأيض الثانوي في نبات لسان الحمل (Metabolic compounds in plantago plant) :

يتواجد في لسان الحمل عدد كبير من مركبات الأيض الثانوي المهمة طبياً منها مكونات رئيسة مثل Iridoid glycosides و polysaccharides (plantaglucide ، glucomannan) و Flavonoids و Flavone glycosides و Phenolic carboxylic acids و Alkaloids (indicain، plantagonin) و Terpenoids (loliolide ، ursolic acid ، oleanolic acid) و Tannins بنسبة 65% و Phenolic compounds منها Polyphenolic وتشمل (cinnamic acid ، p-coumaric acid ، syringic acid ، vanillic ، salicylic acid بنسبة 1%) وعلى القليل من الـSaponines ، (Beara وآخرون ، 2012)، بين التحليل الكيميائي بأستعمال جهاز (GC-MS) Gas chromatography-mass spectrometer المحتوى الكمي والنوعي للمركبات العطرية في الزيوت الأساسية لأوراق لسان الحمل، شملت مجموعة من الأحماض الدهنية بنسبة 28.0-52.1% (يمثل الـ Palmitic acid الأكثر وفرةً ونسبتة 15.3-32.0%) وOxidated monoterpenes بنسبة 4.3-13.2% (Linalool ونسبته 2.7 - 3.5%) و Aldehydes و Ketones (Pentyl vinyl ketone ونسبته 2.0-3.4%) و Alcohols بنسبة 8.3-9.2% (1-octen-3-ol بنسبة 2.4-8.2%). (Bajer وآخرون ، 2015).

يحتوي نبات لسان الحمل أيضاً على مكونات نشطة Active constituents تتضمن الكلايكوسيدات الأيرويدية Iridoid glycosides أحد أصناف الكلايكوسيدات Glycosides وهي نوع من Monoterpenoids مع نواة كيميائية من Cyclopentanopyran ، والتي توجد في مجموعة متنوعة من النباتات وكذلك الحيوانات (Sampaio-Santos و Kaplan ، 2001). يتم تمثيل التركيب الكيميائي للأيريويدات بسهولة بواسطة iridolactone و iridomyrmecin و iridodial الذي ينتج عنه Iridomyrmex

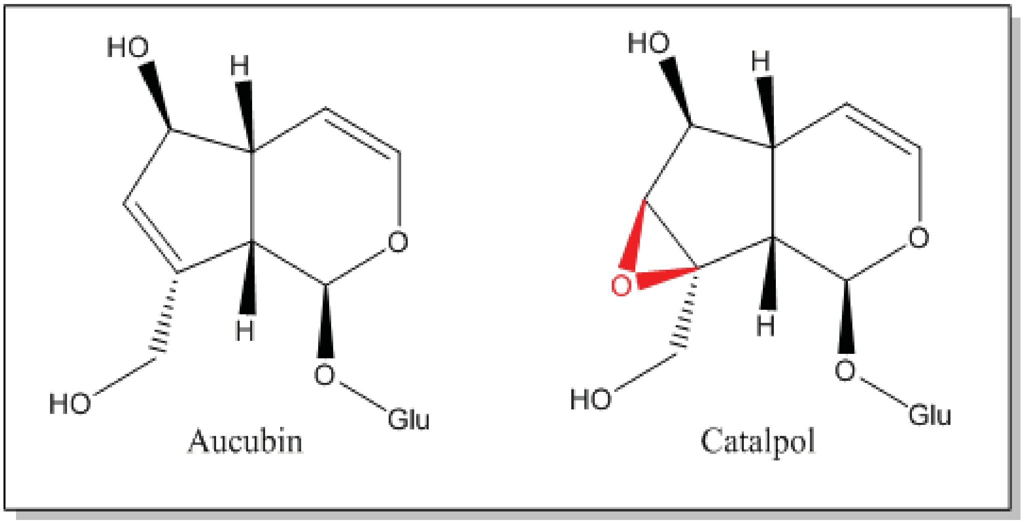
المشتق منه أسم الـIridoid ، وتصنف الى الأيرويدات البسيطة Simple iridoids (not glycosidic) والأيرويدات الثنائية Bisiridoids والأيرويدات الحلقية Secoiridoids (Bianco، 1991). هناك حوالي 790 نوع من الأيرويدات تم تحديدها في النباتات والحيوانات (Andrzejewska-Golec ، 1997) أهمها الأوكيوبين Aucubin والكاتالبول Catalpol وكلاهما من الكلايكوسيدات الأيرويدية الرئيسية في نبات لسان الحمل السهمي (Ronsted و آخرون ، 2000 و Edwards وآخرون ، 2015) ويشير الشكل رقم (2) الى التراكيب المختلفة للأيرويدات.



الشكل(2): الأشكال المختلفة للأيرويدات (Cavill وآخرون ، 1976)

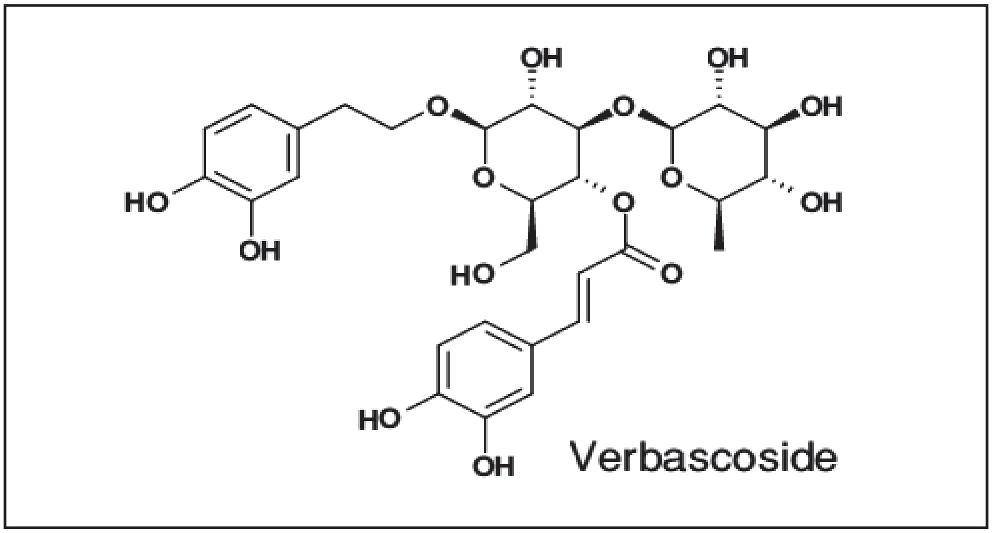
والأوكيوبين مادة صلبة عديمة اللون بلورية عزل لأول مرة من نبات *jponica Aucuba* عام 1905 صيغته الجزيئية $C_{15}H_{22}O_9$ ، وزنه الجزيئي 346 درجة أنصهاره 182مْ ذو خواص حامضية يذوب في الماء والكحول الأ أن ذوبانه في الماء أعلى (Suomi وآخرون ، 2002) تعزى له الفعالية الحيوية لنبات لسان الحمل (Jeong وآخرون ، 2002).

تختلف كمية الأوكيوبين والكاتالبول في النبات أعتماداً على فترة الحصاد فبالقرب من وقت الأزهار ينخفض محتوى الـِAucubin ويصبح منخفض للغاية في النبات بأكمله ويرتفع كلما تقدمت الأوراق في العمر وخلال ظروف الصيف الحارة ، حتى بعد قطع النبات يمكن أن يظهر مستوى الأوكيوبين زيادة كبيرة في الورقة المنفصلة (Stamp و Bowers ، 1996)، على عكس الـCatalpol الذي يظهر في الأوراق الفتية، وكخطوة مهمة عند حصاد وجمع الأوراق يجب تجفيف النبات مباشرة بعد الحصاد لتجنب التخمر الناتج عن التحلل المائي للأوكيوبين الذي يتم تحويله الى بوليمرات بنية داكنة اللون وهذا مؤشر واضح عن فكرة التجفيف غير السليم للنبات الذي بدوره يمكن أن يخلق مشكلة كبيرة في الدراسات الكمية للنبات (Wichtl ، 2004) ويشير الشكل(3) الى التركيب الكيمياوي للأوكيوبين والكاتالبول.



الشكل (3): التركيب الكيمياوي للأوكيوبين والكاتالبول (Ronsted وآخرون ، 2000)

ويعد نبات لسان الحمل غني بمجموعات مختلفة من مركبات الفينول التي تعد الفينولات المتعددة (Polyphenole) المجموعة الأساسية لها، وطبقاً لدستور الأدوية البريطاني فأن مركب الـPolyphenolic الرئيسي يتحول الى Verbascoside (Phenylpropanoid–phenylethanoid glycosides) الشكل (4) (Muria وآخرون ، 1995 و Andary وآخرون ، 1982).



الشكل (4): تركيب الـ Verbascoside (Murai وآخرون ، 1995)

وتعد التانينات Tannins أحد أنواع المركبات الـPolyphenolic متعددة الفينول الرئيسة الموجودة في لسان الحمل السهمي والتي تشكل حوالي 6.5 % ولها القابلية على الذوبان في الماء كما أن هناك بعض التاينينات قابلة للذوبان بشكل كبير في الـOctanol (Mueller–Harvey وآخرون ، 2007) وأشار Mueller-Harvey (2006) أن التاينينات تلعب دوراً بايولوجياً يرتبط في حماية النبات من الحشرات أو الحيوانات العاشبة أو العدوى المرضية (Hagerman وآخرون ، 1998).

كما تعد الفلافونويدات Flavonoids واحداً من المواد الـpolyphenolic التي تكون مسؤولة عن أنتاج العديد من الألوان في الأوراق والأزهار والفواكه كيميائياً، وقد تم تحديد الفلافونيدات luteolin و luteolin–7–O–glucoside كمركبات سائدة في أربعة أنواع من الـPlantago وهي *P. atrata* و *P. coronopus* و *P. Holoste* و *P. lanceolata* (Janković وآخرون ، 2012).

4–2 : أكثار نبات لسان الحمل نسيجياً :

تعد تقانة الزراعة النسيجية وتوليد الخلايا والأعضـاء النباتية خارج الجسم الحي أداة لا غنى عنها في أنتاج مواد دوائية مشـــتقة من النباتات وهذه الطريقة لها فوائد إنتاجية كبيرة من حيث الكمية والنوعية والإنتاج

المســـيطر عليه من دون تقييد العوامل الطبيعية مثل الموقع الجغرافي أو التغيرات الموســـمية أو الاجهادات البيئية (Zhou و Wu, 2006). كما أن لهذه التقانة فوائد كثيرة مقارنة مع طرائق الإكثار التقليدية إذ نحتاج إلى مساحة صغيرة لإنتاج أعداد كبيرة من النباتات في فترة زمنية قصيرة مع السهولة في التعامل مع النباتات الناتجة وفضــلا عن عدم خضـوعها الى قوانين الحجر الزراعي (Ramawat, 2008). ولكن على الرغم من نجاح تقنية زراعة الأنســجة النباتية في أســتخدامها مصـــادراً مختلفة من الأجزاء النباتية Explant للإكثار ومنها الخلية أو النسيج أو العضو النباتي (ورقة ، جذر ، برعم طرفي أو أبطي قشرة ثمرها وغيرها) (جندية ، 2003) الأ أن أختيار الجزء النباتي يجب أن يتم بدقة وإتقان لتباين الإستجابة للنمو في الأنسـجة النباتية المختلفة (محمد وعمر ، 1990).

فقد أشـــار Makowczynska و Andrzejewska-golec (2003) أن عمر الشـــتلات لايؤثر على قدرتها في تكوين البراعم او الجذور عند إجراء تجربة التضـــاعف للقمم النامية لأفرع نبات *Plantago asiatica* L. فبعد زراعة أطراف القمم النامية للأفرع بدأت الأفرع بالتجذير في بداية الإســـبوع الثاني وفي نهايته ظهرت البراعم الأولى إذ إستمرت الزراعة لمدة 6 أسابيع تم الحصول فيها على أفضل النتائج للإكثار الدقيق أو معدل التضـــاعف على وســط MS المضـــاف لهُ 0.1 ملغم. ديســميتر$^{-3}$ من IAA و 1 ملغم. ديسميتر$^{-3}$ من BAP ولم تتطلب النباتات أوساطاً زرعية إضـافية وبعد 8 أسـابيع من الزراعة تم الحصـول على نباتات مجذرة بجذور جيدة والتي كانت قادرة على التطور في الإسـبوع الثاني من نقلها الى السـنادين إذ تكونت النباتات من شكل متورد Roselte leaves يتكون من 6-7 أوراق طول كل منها 12-15 سم. كما كانت النباتات الناتجة من الأكثار النسيجي عن طريق التضاعف لأطراف الأفرع النامية طبيعية المظهر ولم تختلف أختلافاً كبيراً في الشكل عن النباتات التي تم الحصول عليها من خلال الزراعة التقليدية في التربة كما كان لون الأوراق للنباتات الناتجة من الإكثار الدقيق هو اللون الأخضـــر الداكن على عكس النباتات الناتجة من زراعتها في التربة والتي كانت باللون الأخضر المعتاد.

كما أوضــح Budzianowka وآخرون (2004) أن منظمات النمو تؤثر بشـكل كبير في أسـتجابة قطع الأجزاء النباتية للإوراق والأوراق الفلقية والأفرع الطرفية والجذور لإعادة تكون الأفرع منها، عند زراعتها نســـيجياً على وســـط MS الحاوي على تراكيز مختلفة من IAA 1.14 و 2.85 و 5.71 و 11.42 مايكرومول المتداخل مع Kin بالتراكيز 4.65 و 9.29 مايكرومول أو NAA بالتراكيز 1.07 و 1.61 و 2.69 و 5.37 و 10.74 مايكرومول المتداخل مع 0.89 و 2.22 و 8.88 مايكرومول من BA فقد

أشـارت نتائج زراعة قطع من الأوراق لنبات *P.lanceolata* L. بطول 1 سـم والجذور بطول1.5 سـم من الحصول على أفضل أنتاج لوريدات الأوراق والبراعم المتضاعفة عند المعاملة 11.42 مايكرومول من IAA المتداخل مع 9.29 مايكرومول من Kin التي سجلت بمعدل 4.38 من الوريدات ناتجة من قطع الأوراق في حين سـجلت 4.00 من الوريدات ناتجة من قطع الجذور بعد 6 أسـابيع من الزراعة كما تم تجذير الوريقات المتوردة والبالغة 5 سم على وسط MS الحاوي على 5.71 مايكرومول والتي بلغت نسـتها 100% ثم تمت أقلمة النباتات تحت الظروف 23 درجة مئوية و 50- 60% من الرطوبة النسبية وفترة ضوئية 16 ساعة.

ووجـد Makowczynska و Andrzejewska-golec (2008) عنـد زراعتهمـا القمـة النـاميـة للبادرات والأفرع الطرفية والأوراق الفلقية والجذور لنبات *Plantago camtschatica* L. خارج الجسم الحي بعمر 4 أسـابيع على وسـط MS المدعم بتركيز 0.6 مايكرومول من IAA متداخلاً مع تراكيز مختلفة من السايتوكاينينات BA و Zea و Kin الى الحصول على أعلى معدل لتضاعف القمم النامية للبادرات السليمة والتي بلغت 3.7 فرع. جزء نباتي$^{-1}$ على وسـط MS المدعم بتركيز0.6 مايكرومول من IAA المتداخل مع 4.4 مايكرومول من BA ، بينما بلغ أعلى معدل لنشـوء الأفرع 7.2 فرع . جزء نباتي$^{-1}$ في وسـط MS المجهز بتركيز 0.6 مايكرومول المتداخل مع 8.9 مايكرومول من BA، وبلغ أعلى معدل لتضـاعف البراعم والأفرع الطرفية حوالي 13.2 فرع. جزء نباتي$^{-1}$ على الوسـط MS المجهز بالتراكيز المتداخلة مع 0.6 مايكرومول من IAA وكل من BA و Zea بالتراكيز 8.9 مايكرومول 9.1 مايكرومول على التوالي وحوالي 9 فرع. جزء نباتي$^{-1}$ عند التركيز المتداخل مع 9.3 مايكرومول من Kin، كما تم تجذير الأفرع الناتجة من دون الجذور بعد 6 أسـابيع من الزراعة وكانت أفضـل نتيجة عند الأفرع المجذرة على وسـط MS خالي من منظمـات النمو والتي بلغت 90% والوسـط MS المجهز بتركيز 0.5 مـايكرومول من NAA التي بلغت 89.7% وتمت أقلمة النبـاتـات النـاتجـة من قمم الأفرع والتي بلغ معدل النجاة فيها 14% و27% كمعدل للنباتات الناتجة من بقية الأجزاء.

وفي دراسة أخرى لــMakowczynska و Andrzejewska-golec (2009) على اجزاء مختلفة من نبات *Plantago maritima* L. نسيجيا بعمر 4 أسـابيع شـملت القمة النامية للبادرات والأفرع الطرفية والأوراق الفلقية والجذور على وسط MS المدعم بـ 0.6 مايكرومول من IAA متداخلاً مع تراكيز مختلفة من السـايتوكاينينات BA و Zea و Kin حيث تمكن من الحصـول على أعلى معدل للأفرع المتضـاعفة السـليمة 3.8 فرع. جزء نباتي$^{-1}$ من القمة النامية للبادرات بعد مرور 6 أسـابيع من الزراعة عند المعاملة الحاوية على

وسط MS المدعم بتركيز 0.6 مايكرومول من IAA المتداخل مع 6.7 مايكرومول من BA ، كما تم تجذير النباتات لمدة 4 أسابيع بوجود الأوكسينات إذ بلغت أعلى نسبة للتجذير 90% عند وسط MS المدعم بتركيز 0.5 مايكرومول من NAA بينما كانت أقل نسبة 55% عند الوسط المدعم بتركيز 2.5 مايكرومول من IBA وتمت أقلمة النباتات من البادرات السليمة والتي بلغ معدل النجاة فيها 75% في حين بلغ معدل النجاة 40% للنباتات الناتجة من بقية الأجزاء.

2-5 : المادة الهلامية في لسان الحمل السهمي (Mucilage In *Plantago lanceolate L.*) :

الهلام نوع غروي مائي لمادة طويلة السلسلة من السكريات عالية الوزن الجزيئي تستعمل على نطاق واسع كمادة مضافة للأغذية كعامل يعمل على زيادة التكثيف أو التجلط في صناعة المواد الغذائية وتُعد البذور من المصادر المعتمدة والقديمة لأستخراج المادة الهلامية (Campos وآخرون ، 2016)، يتم أنتاج المادة الهلامية من خلال نوع خاص من الخلايا التي تعرف بالخلايا الفارزة للهلام Mucilage-secreting cells (MSCs) والتي تعد جزءاً لا يتجزأ من غلاف البذرة، إذ يخضع الجدار الخلوي لهذه الخلايا للتعديل أثناء فترة نمو وتطور البذور مما يؤدي الى زيادة محتوى البكتين (Western ، 2012). كشفت التحليلات الكيميائية المتنوعة أن الهلام يتألف من تركيب وهيكل معقد لذا يمكن أعتبارهُ جداراً خلوياً متخصصاً غنياً بالبكتين في الخلايا الفارزة للهلام (Haughn و Western ، 2012)، حيث يحتوي غلاف البذرة الغنية بالمادة الهلامية على بوليمرات كربوهيدراتية تمتص الماء وتشكل الهلام ذي اللزوجة عالية وهذه السكريات تتكون من Xylose ، Arabinose ، Galactorunic acid ، Glucuronic acid ، Rhamnose ، Galactose و Glucose (Samuelsen ، 2000).

تحتوي المادة الهلامية في *Plantago lanceolata* وبعض أنواع الـ *Plantgo* ومنها *P. media* و*P. ovata* على هيكل تركيبي يتكون من كتلة ضخمة من البكتين ومكونات السيليلوز المتمثلة بألياف من السيليلوز، إذ تكون الألياف مرتبة بأنتظام شعاعي مع البكتين جنباً الى جنب والتي لها دور مهم في الحفاظ على الهلام وتوزيعه بالتساوي بشكل طبقة على سطح البذور التي يتراوح سمكها بين 350-450 ميكرون، يمتلك هلام البذور بنية نانوية واضحة المعالم، إذ يمثل السيليوز فيها بوليمرات متجانسة خطية من وحدات

1,4-β-D-glucan (Donaldson ، 2007) أن وجود الهلام يؤدي فوائد مختلفة للنبات منها تثبيت البذور على الأرض وأمداد الجنين بالمياه الضرورية لإنباته، كما تسهم خاصية الإلتصاق والإحتكاك في أنتشار البذور بواسطة الحيوانات والتفاعل مع التربة (Kreitschitz وآخرون ، 2016 و Kreitschitz وآخرون ، 2015 و Yang وآخرون ، 2012) كما تعمل في الحفاظ على البذور رطبة عند الظروف القاحلة والمواقع التي تكون فيها أنماط الطقس غير مستقرة (Huang وآخرون ، 2008).

تمثل المادة الهلامية الـ Mucilage منتجات أيض طبيعية بشكل عام لا يحتاج أنتاجها الى محفز مثل الأصابة أو المرض في النبات، وهو الفرق بينها وبين الصمغ Gum الذي يُعد مستقلباً مرضية وفسيولوجية (Qadry و Pillai ، 2008)، إذ يتم أنتاج المادة الهلامية داخل الخلايا على عكس الصمغ الذي ينتج خارج الخلايا وكلاهما بوليمرات أحادية السكر Monosaccharide polymers وكلاهما يمثلان هيدروكولويدات Hydrocolloids للنباتات وعند تحللهما مائياً يعطيان السكريات Sugars والأحماض البولية Uronic acids لأنها تحتوي على جزيئات يمكن أن تتحد مع الماء لأنتاج محلول لزج أو هلام. تشكل المادة الهلامية تركيزاً عالياً في أوراق نبات لسان الحمل إذ يبلغ 6.5 % وهذا سبب كون مستخلص النبات دوماً لزج (jania وآخرون ، 2009). توجد المادة الهلامية في أجزاء مختلفة من النبات كالجذور واللحاء وقشر البذور وفي خلايا البشرة للأوراق (Vishwakarma وآخرون ، 2004) وعموماً يمكن تصنيف المادة الهلامية الى العديد من التصنيفات أعتماداً على:

مصدرها Source : فقد يكون مصدرها النباتات Plants أو الطحالب البحرية Marine algae أو الحيوانات Animals أو الميكروبات Microbes .

تصنيعها Semisynthetic : فقد تكون مشتقة من النشأ Starch أو مشتقة من السيليلوز Cellulose.

شحنتها Charge : شحنتها أيونية Ionic ولا أيونية Non-ionic.

شكلها التركيبي Shape : فقد تكون خطية Linear أو متفرعة Branched. (Taskova وآخرون ، 2002)

أما بالنسبة الى الدور الفسيولوجي للمادة الهلامية فأنه غير واضح لكنها تؤدي بعض الأدوار منها نقل الماء (Zimmermann وآخرون ، 1994) وحجز الطاقة (Franz ، 1979) وتوازن الأيونات في الخلايا النباتية (Pollak و Albert ، 1990) والإستجابة عند جرح النبات (Clarke وآخرون ، 1979).

يعتبر الهلام منتجاً طبيعياً لعمليات الأيض يتكون داخل الخلية يتم ترسبه بشكل طبقات تساعد النباتات في تخزين المياه وإنبات البذور كما يعمل كمثخن للأغشية وكإحتياطي غذائي للنبات، وقد تم إكتشاف مادة الهلام Mucilage على نطاق واسع بإعتبارها مواد خام لصناعة الأدوية كونها مواد منتجة طبيعياً (Bhardwaj وآخرون ، 2000).

أشار Mirmasumi وآخرون (2001) عند دراستهم لأنتاج الهلام النباتي من مزارع الكالس لنبات *Plantago lanceolata* L. على 16 من الأوساط الزرعية المختلفة، إذ تم الحصول على أفضل أنتاج من الهلام النباتي في الأوساط NTII و B5I و MSHII و NTI وتراوح محتوى الهلام فيها بين (10.40 – 14.73 % وزن جاف أي أن الكالس أحتوى على ما يقارب 3 مرات ضعف محتوى البذور من الهلام النباتي ومرة ونصف بالنسبة لمحتوى الهلام في كل من الورقة والجذر، كما أشاروا الى أن أفضل إستحثاث للكالس تم الحصول عليه بعد 15 يوماً من الزراعة لكل من الأجزاء المستخدمة الورقة والجذر بوجود 0.4 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D في الوسط MSHI وأن أفضل إستحاث لنمو الكالس بشكل ملحوظ كان بوجود 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D و 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin في الوسط MSHII الذي بلغ وزنهُ الطري 799 ملغم والوزن الجاف لهُ 79 ملغم.

ووجد Farzan وآخرون (2014) عند دراستهم لبعض الصفات في نبات *Plantago major* L. شملت أستحثاث الكالس والوزن الطري وقطر الكالس وأنتاج الهلام بأستخدام نوعين من أنسجة النبات الأوراق والجذور كأجزاء نباتية مستخدمة على وسط MS المدعم بتراكيز مختلفة من 2,4-D (0.5 ، 0.8 ، 1 ، 2.5 ملغم. لتر$^{-1}$) المتداخل مع Kin 0.0 ، 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ وتركيز 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D لوحده أو متداخل مع 1 ملغم. لتر$^{-1}$ من IAA. إذ بينت النتائج أحتواء الكالس الناتج من الجذور على نسبة أعلى من الهلام النباتي والتي بلغت 27.24 % في المعاملة 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D المتداخل مع 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin وأدنى قيمة 8.42 % المعاملة 1 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D المتداخل مع 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin ، في حين بلغت نسبة الهلام النباتي من كالس النبات المستحث من الورقة 15.51

% بينما بلغت 19.75 % من الكالس المســـتحث من الجذر. كما أحتوى الكالس النامي على الأوســـاط المكملة بـــ 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D المتداخل مع 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin ما يقارب 3 مرات أكثر من الهلام النباتي الذي تم الحصــول عليه من الوســط الحاوي على 1 ملغم.لتر$^{-1}$ من 2,4-D المتداخل مع 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin، كما تم الحصــول على أعلى القيم من محصــول الهلام النباتي والبالغة 32.29 ملغم وأدنى القيم 0.77 ملغم من الكالس المســـتحث للمعاملات 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D المتداخل مع 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin و2.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D المتداخل مع 0.01 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin على التوالي كما بلغ محصـول الهلام النباتي للكالس المستحث من الجذر والورقة 12.29 و 11.934 ملغم على التوالي. كما تم عمل مقارنة في هذه الدراســة بين مســتويات الهلام الناتجة للكالس المســتحث، حيث أعطى الكالس المستحث من الأوراق في وسط مكمل بـ 0.8 ملغم.لتر$^{-1}$ من 2,4-D متداخلاً مع 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin أكثر من الهلام الناتج من معاملة المقارنة وعلى عكس ذلك حقق الكالس المســـتحث من الجذر في وسط مكمل بـ 0.1 ملغم.لتر$^{-1}$ من 2,4-D متداخلاً مع 1 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin نفس مستوى الهلام النباتي الناتج في معاملة المقارنة. كما بينت النتائج أن أفضـــل أســـتجابة لأســـتحثاث الكالس تراوحت بين 86%-100% وذلك عند المعاملات 2.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D و 0.01 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin والمعاملة 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D و 1 ملغم. لتر$^{-1}$ من IAA في كل من الورقة والجذر والمعاملة 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D و 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin في الورقة والمعاملة 1 ملغم.لتر$^{-1}$ من 2,4-D و 0.5 من Kin في الجذر. بينما تم الحصـول على أعلى القيم للوزن الطري للكالس والتي بلغت 3.64 غم وأدنى القيم 0.55 غم في الأوســـاط الحاوية على 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D المتداخل مع 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin في أنسـجة الجذر و 2.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D المتداخل مع 0.01 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin في أنسـجة الورقة على التوالي.

وتوصـــل Gupta وآخرون (2015) عند دراســـتهم لنبات *Phantago ovata* Forsk في محاولة منهم لزيادة كمية الهلام النباتي من خلال زراعة الكالس للنبات كخطوة أولى حيث أســتخدمت أوراق لشــتلات بعمر 10 – 20 يوماً مزروعة على وســط MS الصـــلب المدعم بتراكيز مختلفة من منظمات النمو النباتية حيث تم الحصول على أعلى معدل لأستحثاث الكالس بنسبة 89% على وسط MS يحتوي على 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D المتداخل مع 1 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin وأشارت نتائج الدراسة أن أعلى القيم لمحتوى الكالس

من الهلام النباتي قد سجل في وسط MS المجهز بـــ 0.25 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D المتداخل مع 0.25 ملغم. لتر$^{-1}$ من TDZ، إذ أنتج الكالس ما يقارب من خمس مرات أكثر من كمية الهلام الناتج من البذور.

وفي محاولة Golkar وآخرون (2017) لتحسـين كمية الهلام النباتي لــــ14 نوع من أنماط وراثية مختلفة لنبات *Plantago ovata* Forsk بإستخدام البراعم الطرفية والأوراق الفلقية والبذور المستنبتة مسبقاً في المختبر، إذ بلغ أعلى معدل لإستحثاث الكالس نسبة 73% ومعدل النمو للكالس 0.45 مليمتر.يوم في النمط الوراثي *P. ovata* على وسط MS الصلب الحاوي على 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ من 2,4-D و المتداخل مع 1 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin. وبلغ محتوى الكالس من المادة الهلامية ثلاثة أضـــعاف ما موجود في البذور. إذ أشارت النتائج الى وجود أختلافات كبيرة في محتوى الهلام النباتي الناتج في كل من الكالس والبذور إذ بلغت نســبة الهلام الناتجة من الكالس 0.45 غم.غم وزن جاف والبذور 0.130 غم.غم وزن جاف للأنمطين الوراثيين *P. ovata*$_{11}$ و *P.ovata*$_{9}$ على التوالي، كما بينت النتائج أن جميع الأنماط الوراثية كان فيها أنتاج الهلام النباتي الناتج من الكالس أعلى من الهلام الناتج من البذور بأستثناء الأنواع *P. ovata*$_{8}$ و *P. ovata*$_{14}$ و *P. ovata*$_{11}$ ،كما كان محتوى الهلام الناتج من الكالس والبذور متطابق تقريباً في النمط الوراثي *P. ovata*$_{9}$ ، كما تم أعتبار النمطين الوراثيين *P. ovata*$_{8}$ و *P. ovata*$_{9}$ متفوقة لمحتوى الهلام النباتي الناتج من البذور.

6-2 : استحثاث الكالس في العائلة الحملية (Induction of cullus in the Plantaginaceae):

يطلق على الخلايا البرنكيمية غير المنتظمة الشكل التي تنشأ من الخلايا المرستيمية للأنسجة النباتية مصطلح كالس Callus. يعتمد أستحثاث الكالس بدرجة كبيرة على الظروف المتبعة في زراعته بالإضافة الى نوع قطع النبات Explant ومصدرها والظروف الخاصة مثل الضوء ودرجة الحرارة والمواد الغذائية ومنظمات النمو كما تختلف حيوية الكالس المستحث أعتمادا على القطعة النباتية المستعملة في أستحثاثه وأن الكالس المستحث من الأجزاء المختلفة يمكن أن يتخصص مكوناً الأعضاء أو الأجنة بالإعتماد على الظروف البيئية المستخدمة في الزراعة ومكونات الوسط الغذائي (محمد ومبشر، 1990).

وقد أوضح Ramawat (2008) أن الأنسجة الفتية هي الأكثر إحتمالاً لإنتاج الكالس وقد تم الحصول على الأخير من البادرات والافرع الفتية حديثة التكوين أو البراعم وقمم الجذور وغيرها ويمكن إستعمال أي نسيج نباتي حي كجزء نباتي لتنشئة مزارع الكالس ويمكن تحفيز خلايا الجزء النباتي تحت تاثير منظمات النمو لكي تنقسم وتكون كتلة من الخلايا.

ولاحظ Sarihan وآخرون (2005) عند دراستهم لنبات *Plantago afra* L. وأكثاره نسيجياً أن التطور المبكر للجذور خلال تشكيل الكالس غير مرغوب فيه في زراعة الأنسجة النباتية حيث أنهُ لا يقلل من جودة الكالس فقط ولكن يعيق أيضاً تجديد البراعم، إذ تم ملاحظة الجذور المبكرة النمو في المراحل الأولى من تشكيل الكالس في كلا الأجزاء المستخدمة من الأوراق الفلقية والبراعم في أوساط زرعية تحتوي على 1.11 أو 2.22 مايكرومول من BAP مع 1.34 مايكرومول من NAA ومن ثم تمت أزالتها لتحقيق نشوء الكالس والحصول على نوعية جيدة، كما تم الحصول على أفضل نشوء للكالس في كلا الأجزاء المستخدمة حيث أستنتج أن وجود BAP المتداخل مع NAA عزز من النمو المبكر للجذور، ولم يلاحظوا وجود جذور في الأوساط الزرعية الحاوية على IBA المتداخل مع BAP و IBA المتداخل مع Kin و IBA المتداخل مع TDZ. وسجلت النتائج أعلى نشوء للبراعم 23.17 في وسط MS الحاوي على 0.91 مايكرومول من TDZ المتداخل مع 0.98 مايكرومول من IBA وبعدها نقلت الى وسط التجذير الحاوي على 3.22 مايكرومول من NAA ثم نقل النباتات المجذرة الى التربة لأقلمتها وصولاً الى مرحلة الإزهار وتشكُل البذور.

وتمكن Ay وآخرون 2016 عند دراستهم حث الكالس من تحقيق أعلى نسبة لإستحثاث الكالس وتشكلهُ من سويقات فتية غير ناضجة لنبات *Plantago camtschatica* L. عند زراعتها على وسط MS الصلب بإستعمال تراكيز مختلفة من 2,4-D (0 و 0.1 و 0.5 و 1 ملغم. لتر$^{-1}$) و BA بالتراكيز (0 ، 0.5 ، 1 ، 2 ملغم.لتر$^{-1}$) إذ سجل الحد الأعلى لإستحثاث الكالس نسبة 96.67 % في وسط MS المدعم بتركيز 1 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D و 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA في حين كان الحد الأدنى بنسبة 6.67 % عند المعاملة 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D و 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA والمعاملة 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D و 1 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA ولم يلاحظ أي أستحثاث للكالس على أي من التراكيز الأخرى. كما تم تمايز الأجنة الجسدية من الكالس المستحث على وسط MS مدعم بتركيز 1 ملغم. لتر$^{-1}$ من TDZ لوحده أو متداخل مع

0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من NAA حيث سجل أعلى معدل للإستحثاث بلغ 92 و96 % بعد 4 أسابيع من الزراعة، وأدى نقل الكالس الى أوساط التمايز الى تمايز الأفرع من الكالس المعاد زراعته خلال 8 أسابيع من الزراعة، إذ سجلت أعلى القيم لنشوء الأفرع والتي بلغت 2.8 و 3.6 و 3.7 و 3.7 فرع. جزء نباتي$^{-1}$ و 3.3 و 3.5 و 3.8 و 4.9 فرع. جزء نباتي$^{-1}$ بعد 2 – 8 أسابيع من أعادة الزراعة وذلك عند الوسط MS الحاوي على 5 و7 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA .كما كانت جميع البراعم الناتجة بحالة جيدة وجاهزة للتجذير وبينت النتائج أن أفضل وسط للتجذير كان وسط MS بنصف قوته التركيبية مدعم بتركيز 5 و 7 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA أو مع 2 غم. لتر$^{-1}$ من الفحم المنشط و 4–0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من NAA كما بينت النتائج أعلى معدل بقاء للنباتات الناتجة 93.3 – 100% حيث نمت النباتات بشكل طبيعي في السنادين على أوساط زرعية مختلفة أحتوت على المزيج من القش ورماد قشر الأرز 1 : 1 أو مزيج من الرمل : التربة 1 : 1 أو التربة فقط.

المواد وطرائق العمل (Materials and Methods) :

1–3 : مصدر بذور نبات لسان الحمل السهمي (Source of seeds *Plantago lanceolate* L. plant) :

جمعت بذور نبات لسان الحمل السهمي من النباتات المزروعة والنامية في البيت النباتي التابع لقسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة.

2–3 : موقع التجربة (location of the experiment) :

أجريت الدراسة الخاصة بالبحث في مختبر زراعة الخلايا والانسجة النباتية التابع لقسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى ، وقد تمت جميع الاختبارات والتجارب لهذه الدراسة تحت ظروف مختبرية مسيطر عليها وأجريت عملية الزرع بإستعمال منضدة انسياب الهواء الطبقي airflow cabinet Laminar الحاوية على مرشحات نوع Helphire والمعقمة بالاشعة فوق البنفسجية Ultra violate (UV) light ، حفظت العينات في غرفة النمو بدرجة حرارة 25 ± 2 م° وبتعاقب ضوئي 16 ساعة ضوء و 8 ساعة ظلام وشدة اضاءة 2000 لوكس.

3-3 : تحضير الوسط الزرعي (Preparation of medium Culture) :

إستعمل الوسط الغذائي MS والموصوف من قبل (Murashige و Skoog ، 1962) المجهز من شركة HIMEDIA (الجدول 1) حضر لتر واحد من هذا الوسط الغذائي، وذلك بإذابة 7 غم من الاكار (Agar-agar) في 500 مل من الماء المقطر عند درجة الغليان على جهاز الهزاز المغناطيسي ذي الصفيحة الساخنة Hot plate magnetic stirrer ثم أضيف له 4.91 غم أملاح من وسط MS و30 غم من السكروز المذاب كلاهما في 250 مل من الماء المقطر بعدها أكمل حجم محلول الوسط الغذائي الى 1 لتر بإضافة ماء مقطر الى خليط مكونات الوسط المحضر، وتم ضبط الدالة الحامضية pH ما بين 5.7 -5.8 بواسطة محلول 1 عياري من هيدروكسيد الصوديوم NaOH أو حامض الهيدروكلوريك المخفف HCl ، وبعد الانتهاء من تحضير الوسط تم توزيع الوسط على القناني الزجاجية سعة 125 مل بواقع 20 مل لكل قنينة ، ثم غطيت القناني بورق الالمنيوم وتم تعقيم الوسط بجهاز الموصدة Autoclave على درجة حرارة 121 مْ ولمدة 20 دقيقة.

الجدول (1): مكونات الوسط الغذائي MS (Murashige و Skoog ، 1962)

ت	المـــــــادة	الصيغـة	التركيز ملغم . لتر$^{-1}$
	العناصر الغذائية الكبرى		
1	نترات الامونيوم	NH_4NO_3	1650
2	نترات البوتاسيوم	KNO_3	1900
3	كلوريد الكالسيوم المائي	$CaCl_2 . 2H_2O$	440
4	كبريتات المغنيسيوم المائية	$MgSO_4 . 7H_2O$	370
5	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	KH_2PO_4	170

	العناصر الغذائية الصغرى		
1	حامض البوريك	H_3BO_3	6.2
2	كبريتات المنغنيز المائية	$MnSO_4.4H_2O$	22.3
3	كبريتات الخارصين المائية	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
4	موليبيدات الصوديوم المائية	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
5	أيوديد البوتاسيوم	KI	0.83
6	كبريتات النحاس المائية	$CuSO_4.\ 5H_2O$	0.025
7	كلوريد الكوبلت المائي	$CoCl_2.\ 6H_2O$	0.025
8	كبريتات الحديدوز المائية	$FeSO_4.\ 7H_2O$	27.8
9	أثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك ثنائي املاح الصوديوم	Na_2 EDTA	37.25
	الفيتامينات والاحماض الامينية		
1	ثايمين حامض الهيدروكلوريك	Thiamine-HCl	0.1
2	حامض النيكوتينيك	Nicotinic acid	0.5
3	بايرودكسين حامض الهيدروكلوريك	Pyridoxine-HCl	0.5
4	كلايسين	Glycine	2
5	مايو اينوسيتول	Myo-Inositol	100
	Sucrose 30.0 غم ، Agar 7.0 غم ، ماء مقطر 1.0 لتر ، 5.8 pH		

3-4 : تعقيم الأدوات المستعملة (Sterilization of Tools) :

عقمت جميع الأدوات المستخدمة في الزراعة من مشارط وملاقط بتغليفها بورق الالمنيوم والدوارق والماصات وأوراق الترشيح بوضعها داخل أكياس نايلون في جهاز الموصدة Autoclave لمدة 20 دقيقة ، فضلا عن غمر الملاقط والمشارط عند الإستخدام في الكحول الاثيلي بتركيز 96% ثم حرقها على لهب مصباح بنزن للتخلص من الكحول وذلك لضمان تعقيم أضافي للتخلص من الملوثات ثم بردت لأجل استخدامها في الزرع لضمان عدم تلوث الاجزاء والقطع النباتية المزروعة على الوسط الغذائي، كذلك استخدم الكحول الأثيلي بتركيز 70% لتعقيم الأيدي ومنضدة أنسياب الهواء الطبقي Laminar-Air flow cabinet

برشه جيداً من الداخل والخارج ومسح المنضدة بقطعة من القطن المبللة بالكحول لغرض ضمان كفاءة التعقيم وتوفير كافة الظروف المعقمة للزرع ، ثم تشغيل جهاز المنضدة لمدة 30 دقيقة على الأقل قبل البدء بالزراعة للتأكد من طرد البكتريا والفطريات وغيرها من الملوثات.

3-5 : تعقيم البذور وأنتاج البادرات المعقمة (Seed sterilization and sterile seedling production) :

عقمت البذور بغسلها بمسحوق الغسيل العادي لمدة 5 دقائق وتركت تحت الماء الجاري لمدة 15 دقيقة، لضمان التخلص من الأتربة والمواد العالقة ثم نقلت الى منضدة أنسياب الهواء الطبقي في غرفة الزراعة. لغرض أجراء معاملات التعقيم، بنقعها بمحلول هايبوكلورات الصوديوم المعروف محليا بالقاصر نسبة الكلور فيه 0.6 % (بتركيز 50% لكل من من هايبوكلورات الصوديوم والماء المقطر المعقم) ولمدة 20 دقيقة، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لمدة 5 دقائق مع التحريك المستمر ولغرض المحافظة على حيوية البذور وإزالة التأثير الضار لمادة التعقيم، بعد ذلك وضعت البذور المعقمة على أوراق ترشيح معقمة للتخلص من الماء العالق بها، ثم زرعت بوضعها على 20 مل من الوسط الزرعي MS الصلب الخالي من منظمات النمو وفي قنانٍ زجاجية بحجم 250 مل وبمعدل 5 – 7 بذور/ قنينة، ثم حفظت العينات في الظلام لمدة ثلاثة أيام (ألمهداوي ، 2013) وعند إنبات البذور نقلت إلى الظروف المشار إليها مسبقاً لحين بلوغ البادرات من العمر 21 يوماً لإستعمالها في التجارب اللاحقة.

3-6 : الأكثار الدقيق للنبات :

3-6-1 : مرحلة النشوء والتضاعف (Initiation and multiplication stage) :

فصلت الجذور النامية من البادرات المعقمة بعمر 45 يوماً وقطعت بطول 1.0-1.5 سم وزرعت على وسـط MS المدعم بتراكيز 1.0 ، 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ من BA و Kin بتركيز 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ لكل منها، فضـلاً عن معاملة المقارنة المتمثلة بزراعتها على وسـط MS الخالي من منظمات النمو، وحفظت الزروعات في غرفة النمو تحت نفس الظروف المشـار إليها في الفقرة (3-1)، عُدت الأسـابيع الأربعة الأولى مرحلة

النشوء وعُدت الأسابيع الأربعة التي تلت إعادة زراعتها على نفس الوسط مرحلة التضاعف، سجلت البيانات عن عدد الأفرع المتكونة على الجزء النباتي وطول الأفرع وعدد الأوراق المتكونة على أطول فرع.

3-6-2 : مرحلة التجذير (Rooting stage) :

أخذت الأفرع الناتجة من مرحلة التضـــاعف فقرة (3-6-1) التي تراوح عدد أوراقها ما بين 1-5 ورقة وزرعت على وســـط MS المدعم بمنظمات النمو وبالتركيزين 1.0 و2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ من IBA لغرض التجذير، وسُجلت بيانات عدد الجذور وطول أطول جذر والنسبة المئوية للتجذير وأرتفاع النمو الخضري.

3-6-3 : مرحلة الأقلمة (Acclimatization stage) :

أجريت أقلمة النبيتات Plantlet المجذرة (فقرة 3-6-2) بعد غسل جذورها بشكل جيد بماء الحنفية لإزالة بقايا الأكار الملتصق بها، ثم غمرت في محلول المبيد الفطري بينوميل Benomyl بتركيز 1 غم.لتر$^{-1}$ ولمدة 5 دقائق لوقايتها من الإصـــابة الفطرية، ثم زُرعت على وســـط البتموس المعقم، وغطيت الأصـــص بأكياس من النايلون من أجل الحفاظ على الرطوبة، ثم ثُقبت الأكياس تدريجياً وأزيلت بالكامل، وبعد 8 أسابيع من الأقلمة أخذت الصفات والتي شملت : النسبة المئوية للنجاة وعدد الأوراق ومتوسط طول النبتة.

3-7 : إستحثاث الكالس من البادرات المعقمة (Callus induction of sterile seedlings) :

فصلت قواعد أوراق البادرات السليمة بطول 1.0 – 1.5 سم ، ونقلت الى الوسط MS لأستحثاث الكالس منها، وذلك بأختيار أوساط مدعمة بتراكيز 0.5 و1.0 و1.5 و2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ من 2,4-D متداخلة مع 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ من Kin ، أو 0.5 و1.0 و1.5 و2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ من NAA متداخلة مع 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ من BA بمعدل قطعة واحدة لكل قنينة حجم 250 مل حاوية على 20 مل من الوسط ، حضنت الزروعات في غرفة النمو وبظروف درجة الحرارة 25 ± 2 مْ ذات نظام ضوئي متعاقب 16 ساعة ضوء / 8 ساعة

ظلام، وبعد مرور 30 يوم من الزراعة سجلت القراءات الخاصة لصفات الاستجابة بالاعتماد على المقياس النظري الجدول (2) الذي يقسم نشوء الكالس نظرياً الى عدة مستويات حددت شدة الإستجابة لإستحثاث الكالس (Collnis وآخرون ، 1990) والوزن الطري للكالس عن طريق أخذ الفرق بين وزن القناني الزجاجية ومحتوياتها قبل وبعد إزالة محتوياتها.

الجدول (2): المقياس النظري لاستجابة الأجزاء النباتية إلى استحثاث الكالس

القيمة النظرية للكالس	ما تشير اليه القيمة
–	عدم الإستجابة
+	إستجابة ضعيفة ونشوء كالس في أطراف القطع
++	إستجابة متوسطة تصل الى 50%
+++	إستجابة عالية تفقد القطع شكلها وتتحول الى كالس بالكامل يصل الى 100%

8-3 : أدامة الكالس وتقدير الوزن الطري والوزن الجاف :

(Callus maintenance and estimation of lean weight and dry weight) :

نقلت قطع الكالس المستحدث على أوساط الإستحثاث (فقرة 3-7) الى وسط الإدامة المنتخب أعتماداً على تجربة إستحثاث الكالس والمتمثل بالوسط MS المدعم بتراكيز 1.5 ملغم . لتر$^{-1}$ من 2,4-D متداخل

مع 0.5 ملغم . لتر$^{-1}$ من Kin وبعد مرور 30 يوم سجلت بيانات لصفات القوامية واللون والوزن الطري والجاف والذي أستعمل في عملية أستخلاص المادة الهلامية.

3-9 : التصـــميم التجريبي والتحليل الأحصـــائي (Experimental design and statistical analysis) :

نُفذت جميع تجارب الدراسة بوصفها تجارباً بسيطة بالتصميم العشوائي الكامل Completely CRD randomized design بعشرة مكررات لكل معاملة وقورنت الفروق بين المتوسطات بإختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى أحتمال 0.05 (Victor و Felipe ، 2006) وحُللت البيانات بإستخدام الحاسوب عن طريق تحليلها ببرنامج SPSS .

3-10 : تقدير محتوى المادة الهلامية في نبات لسان الحمل السهمي :

3-10-1 : تحضير العينات النباتية :

قدرت تراكيز المادة الهلامية الـMucilage في مستخلصات كل من :

1- بذور نبات لسان الحمل السهمي

2- أوراق للنبات النامي في الحقل، إذ جففت عينات الأوراق الطرية ومن ثم سحقت يدوياً بواسطة هاون خزفي.

3- أنسجة مزارع الكالس وأشتملت على كالس جاف نامي مسبقاً على وسط MS مضاف له تركيز من -2,4 D بمقدار 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ متداخلا مع 0.5 من Kin تم تجفيفهُ هوائياً وجمعهُ لإستخلاص الهلام.

3-10-2 : عزل المادة الهلامية الخام من نبات (*Plantago lanceolata* L.) :

(Isolation of the crude mucilage from *Plantago lanceolata* L.) :

عزلت المادة الهلامية لكل من البذور الناضـجة والأوراق الجافة والكالس الجاف لنبات لسـان الحمل السهمي *P. lanceolata* L. حسب الطريقة الموصوفة من قبل Sharma و Koul (1986)، حيث أخذ 1 غم من البذور والأوراق الجافة والكالس الجاف وتم سحقها على هيئة مسحوق باستخدام المطحنة الكهربائية وخلط مع 10 مل من 0.1 N حامض HCl، ثم غلي الخليط لمدة 5 دقائق وتم ترشـيحه، تم أسـتخلاص الراسب (المتبقي بعد عملية الترشيح) باستخدام 5 مل من الماء المغلي مرتين (5 مل كل مرة) وبعد ذلك تم ترشـيحه وخلط الراشـح مع 60 مل من كحول الأيثانول بتركيز 96% وحفظ في الثلاجة لمدة 5 سـاعات. بعدها أزيل الرائق العلوي وأخذ الهلام المترسـب حيث تم وزن الهلام المترسـب ثم جفف في الفرن عند درجة حرارة 50 مْ لمدة 12 سـاعة. وتم وزن المادة المترسـبة التي تمثل كمية الهلام الموجود في 1 غم لكل من البذور والأوراق الجافة والكالس الجاف.

3-10-3 : قياس السكريات والأحماض الدهنية والأمينية (Measurement of carbohydrates, fatty acids and amino acids) :

1-3-10-3 : فصل وتشخيص الكربوهيدرات (Carbohydrate in *Plantago lanceolata* L.):

فصلت السكريات المتعددة الخام لكل من البذور والأوراق المجففة والكالس المجفف بالطرد المركزي بسرعة 2000 دورة بالدقيقة لمدة 15 دقيقة، وغسلت المادة الخام المترسبة من السكريات بكحول الأيثانول المائي المخفف بتركيز 70%، وعلق في الماء ورشحت بعملية الديلزة (Dialyzed) ضد الماء المقطر لمدة ثلاثة أيام في الغرفة الباردة بدرجة 4 مْ، وركز المحلول في كيس الديلزة تحت ضغط منخفض مقداره وجفف بالتجميد ليعطي ناتجاً ذي لون مائل الى اللون البني وبلغ الناتج 16 ملغرام. (Kardosova ، 1992).

المحصول (الناتج) من الأوراق = $\frac{\text{16 ملغم}}{1000} \times 100 = 1.6$ % (Farzan وآخرون ، 2014)

فصل المستخلص المائي بطريقة الكروماتوغرافي السريعة (FLC) على عمود ODSB ذي مواصفات mm I.D 4.6 × 50 ، حجم الجزيئات 3 مايكرومتر، ولقد تم الفصل والتشخيص للسكريات في دائرة البحوث – وزارة العلوم والتكنلوجيا – بغداد بواسطة جهاز الكروماتوغرافي السائل Shimadzu 10AV-LC

مجهز بمضخة توصيل نوع LC–10A Shimadzu وأجريت عملية التشخيص وفق الظروف المحددة. المذكورة في الجدول (3).

الجدول (3): ظروف تشخيص النموذج القياسي للسكريات من المادة الهلامية المفصولة من العينات المدروسة

الظروف	طبيعة الظروف
الطور المتحرك	ماء لا أيوني
سرعة جريان الطور المتحرك	0.1 مل / دقيقة
حجم العينة المحقونة	20 مايكرولتر
درجة حرارة الفصل	30 مْ ، 40 مْ
نوع الكاشف	كاشف معامل الأنكسار جهاز Shimadzu RID–10A
المصدر	(Kardosova ، 1992) و (Sharma و Koul ، 1986)

قورنت قراءات المساحة تحت المنحنى وزمن الأحتجاز Retention time للعينات مع المساحة تحت المنحنى وزمن الأحتجاز للعينة القياسية الشكل (5) والذي يمكن من خلاله تشخيص الكربوهيدرات الموجودة في المادة الهلامية، حسب المعادلة التالية (Okamura و Fujimote ، 1994).

$$\text{تركيز المادة} = \frac{\text{مساحة حزمة النموذج}}{\text{مساحة حزمة القياس}} \times \text{التركيز القياسي} \times \text{عدد مرات التخفيف}$$

التوقيع :

الاسم : د. ماهر زكي فيصل

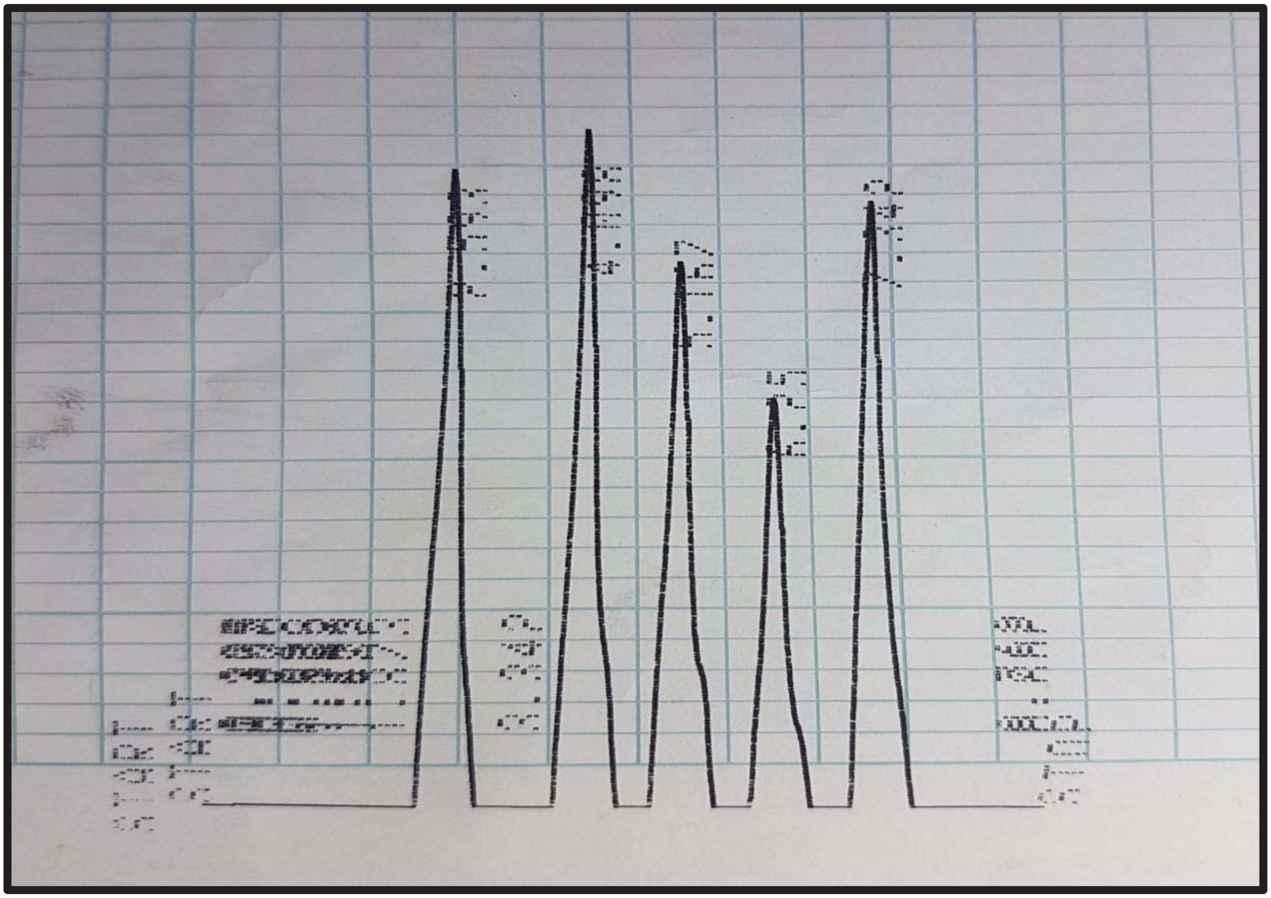
كلية التربية للعلوم الصرفة (أبن الهيثم)

جامعة بغداد

التاريخ : / / 2020 م

الخلاصة

أُجريت الدراســة الحالية في مختبر زراعة الخلايا والأنســجة النباتية التابع لقســم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصــرفة بجامعة ديالى خلال المدة من تشــرين الثاني /2018 الى كانون الثاني /2020 بهدف دراســة الأكثار النســيجي لنبات لســان الحمل الســهمي *Plantago lanceolata* L. ذي الأهمية الطبية والصيدلانية من خلال نشوء وتضاعف الأفرع من الجذور النامية من البادرات المعقمة بعد زراعتها على وسط موراشــيج وســكوج (MS) المزود بتراكيز مختلفة من Benzyl adenine (BA) و Kinetin (Kin)، ثم جُذرت الأفرع الناتجة بعد التضــاعف على نفس الوســط المزود بتراكيز مختلفة من 3-Indole Butyric Acid (IBA) وأقلمة النباتات الناتجة من مرحلة التجذير، فضـــلاً عن إســتحثاث الكالس من زراعة العرق الوســطي للأوراق لبادرات معقمة ناتجة من الزراعة النســيجية على وســط MS المزود بتراكيز مختلفة من 2,4- Dichloro phenoxy Acetic Acid (2,4-D) و Kinetin (Kin)، نُفذت التجارب بالتصـــميم



الشكل (5): منحنى السكريات للمادة االهلامية في العينة القياسية بواسطة جهاز الـHPLC

الجدول (4) تسلسل ومساحة المنحنى وزمن الاحتباس والتركيز للسكريات بواسطة جهاز الـHPLC

تسلسل المنحنى	زمن الأحتجاز (دقيقة)	مساحة المنحنى	التركيز (مايكروغرام. مل$^{-1}$)	السكريات
1	2.59	131108	20.9583	D- galacturonic acid
2	4.09	136239	21.7786	D-galactose
3	5.16	123715	19.7765	Mannose
4	6.25	105205	16.8175	Rhamnose
5	7.34	129298	20.6691	Arabinose