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

عزل الفطر الداخلي *Alternaria alternata* L. ومقارنة خصائصه الحيوية ومحتواه من المركبات الفعالة مع مستخلص اوراق ومزارع المعلقات الخلوية لإكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* L.

أطروحة

مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى هي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه في علوم الحياة

من قبل

بتول محمد علوان دهموج

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2014
ماجستير علم النبات / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2017

بإشراف

أ.د. رباب مجيد عبد

1446هـ **2024 م**

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

Isolation of Endophytic Fungus *Alternaria alternata* L. and Comparison of its Biological Properties and Content of Active Compounds with Leaves Extract and Cell suspension cultures of *Rosmarinus officinalis* L.

A Dissertation

Submitted to the Council of the College of Education for Pure Science / University of Diyala in partial Fulfillment of the Requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Biology

By

Batoul Mohammed Alwan Dahmuj

Bachelor of Biology / College of Education for Pure Sciences / University of Diyala 2014

Master's degree in Botany / College of Education for Pure Science / University of Diyala 2017

Supervisor by

Prof.Dr. Rabab Majead Abed

1446 AH **2024 AD**

1- المقدمة:

الفطريات الداخلية Endophtic fungi هي نوع من العلاقات بين انواع معينة من الفطريات والنباتات، إذ تتعايش الفطريات داخل أنسجة النبات دون أن تسبب أي ضرر (Lata وآخرون، 2018 ; Chhipa و Deshmukh، 2019)، اذ تنمو داخل أو بين خلايا النبات وتقضي حياتها أو جزء من دورة حياتها دون أن تسبب أي أضرار أو تغيرات مظهرية في خلايا النبات (Gouda وآخرون، 2016). ان مصطلح Endophytes مشتق من كلمتين يونانيتين (endon = endo) بمعنى داخل و(phyte = phyton) بمعنى نبات وكانت اول اشارة الى هذه العلاقة من قبل De Barry (1866).

تنتقل الفطريات الداخلية من التربة الى النبات ولكن غالبا ما يحصل عن طريق البذور (White وآخرون، 2019). وفقا لفرضية التطور المشترك لفطريات النبات الداخلية التي أقترحها Ji وآخرون (2009) والتي تبين أن الفطريات الداخلية تساعد النبات في الدفاع الكيميائي اتجاه المسببات المرضية المختلفة عن طريق أنتاج مركبات أيض ثانوية نشطة بايولوجيا، كما وجد أن هذه المواد تكون مماثلة لتلك التي ينتجها النبات (Kusari وآخرون، 2009). العديد من المركبات التي تنتجها الفطريات الداخلية لها تطبيقات صيدلانية متنوعة وتستعمل في أنتاج المضادات الحياتية البكتيرية والفطرية والفايروسية، ومضادات الاكسدة، ومضادات السكري، ومضادات الالتهابات، والعديد من المركبات الاخرى (Manganyi و Ateba، 2020).

تم عزل العديد من المواد الفعالة من الفطريات الداخلية في السنوات القليلة الماضية باستعمال مجموعة من التحليلات المورفلوجية والتقنيات الجزيئية وتحليل الايض (d,Errico وآخرون، 2021 ; Gupta وآخرون، 2022). إذ تم اكتشاف اكثر من 50% من المركبات الفعالة الكيميائية من عام 1981 الى 2010 معزول من Endophytes (Newman و Gragg ، 2012) ولا زالت الدراسات

مستمرة في هذا المجال ومن المركبات الفعالة التي تنتجها الفطريات الداخلية: القلويدات Alkaloids والتربينات Terpenoids والستيرويدات Steroids والفينولات Phenols وغيرها(Dos Santos و Rodrigues، 2002 ; Hashem وآخرون، 2023).

يعد نبات اكليل الجبل .*Rosmarinus officinalis* L من النباتات التي تنتمي الى صنف Dicotyledon رتبة Tubiflorae عائلة Lamiacea، وهو من النباتات العطرية يستعمل على نطاق واسع في الاطعمة، يستوطن مناطق البحر الابيض المتوسط في أوربا وشمال افريقيا، ويزرع في اسبانيا وايطاليا وفرنسا والجزائر والمغرب والبرتغال (Almasoody و Florin، 2015). يحتوي نبات اكليل الجبل على العديد المركبات الفينولية التي يعد بعضها مضادات اكسدة فعالة بسبب وجود مجموعات الهيدروكسيل الفينولية الخاصة بها ولكنها تمتلك ايضا الكثير من الاثار المفيدة الاخرى مثل الانشطة المضادة للميكروبات والفيروسات والالتهابات والمضادة للسرطان ومن المعروف ايضا انها عامل فعال وقائي كيميائي (Al sereiti وآخرون، 1999). كما يستخدم اكليل الجبل على نطاق واسع كتوابل للطهي ويستخدم ايضا عطره في الصابون ومستحضرات التجميل، وتحتوي أوراق اكليل الجبل على 1.0– 2.5 % زيوت اساسية و يتميز الزيت العطري بكونه عديم اللون واحيانا يكون ذي لون اصفر شاحب مع رائحة منعشة مميزة (Aguilar وآخرون،2008). كما أن نبات اكليل الجبل هو أحد اشهر الأعشاب الطبية الغنية بالبوليفينول (حامض الكارنوسيك وحامض الروزمارينك) والفلافونويد (Bourhia وآخرون،2019). كما ان حامض الروزمارينك هو استر لحامض الكافيين 3,4– dihydroxyphenyllactic acid (Rene وآخرون، 2011). ان وجود هذا المركب المستخرج من نبات اكليل الجبل معروف جيدا في جنس *Salvia*، كما يمتاز هذا المركب بعدد من انشطة البيولوجية والدوائية كمضادات الالتهابات والحساسية.(Petersen و Simmonds، 2003).

تلعب المركبات الايضية دورا متعدد الوظائف في عمليات النمو والتطور للنباتات، وكبح أنواع الاوكسجين التفاعلي (ROS)، والاستجابة للإجهادات البيئية (Lucini وآخرون، 2016). فضلا عن ذلك اظهرت العديد من الدراسات التجريبية في العقود الماضية، جنبا الى جنب مع بعض التجارب السريرية، ان الزيوت الاساسية لها خصائص قوية كمضادة للأكسدة ومعدلة للمناعة، ومضادة للالتهابات ومضادة للميكروبات، والتي تقدم طرقا واعدة لتخليق وتطوير عقاقير جديدة (Javed وآخرون، 2021).

لهذا أصبح الحاجة الى الاستفادة من تقانة الزراعة النسيجية كتوظيف مزارع الكالس أو المعلقات الخلوية لزيادة إنتاجية النباتات من هذه المواد(نادر، 2021). تمثل المعلقات الخلوية نظاماً جيدا ينتج جميع نواتج الايض الاولية والثانوية، تتكون من مجموعة خلايا تشتق من الكالس الهش، وتمتلك هذه الخلايا القدرة على الانقسام والقيام بالفعاليات الايضية المختلفة، ويفضل الكالس الهش غير المتماسك والسريع النمو في أنشاء مزارع المعلقات الخلوية لانً خلاياه يسهل تفككها إلى خلايا احادية بواسطة التحريك في الوسط الغذائي السائل (علوان، 2016)، ويعتمد نجاح هذه التقانة على كثافة الخلايا المزروعة ونوع الوسط الزراعي (رشيد وقاسم، 2006).

تهدف الدراسة الحالية الى:

1- عزل وتشخيص الفطريات الداخلية من اوراق نبات اكليل الجبل.L *Rosmarinus officinalis* .

2- تقدير محتوى مستخلص الفطريات الداخلية من المركبات الفعالة ومقارنته بمحتواها في المستخلص المائي ومستخلص المزارع النسيجية لنبات اكليل الجبل.

3- دراسة الخصائص الحيوية (البيولوجية) لكل من مستخلص الفطريات الداخلية والمستخلص المائي ومزارع المعلقات الخلوية لنبات اكليل الجبل.

Summary

This study was conducted in the Mycology and the Plant Cell and Tissue Culture Laboratories of the Department of Biology at the College of Education for Pure Sciences - University of Diyala during the period from 2/1/2023 to 1 /7/2023, with the aim of isolating and diagnosing Endophytic fungi from the leaves of the Rosemary plant *Rosmarinus officinalis* L. and estimating the content extract of endophytic fungi from the active compounds and comparing it to content in the aqueous extract and extract of cell suspensions of the rosemary plant and studying the biological effectiveness as antioxidants and anti-diabetics for each of them. And the results were as follows:

1- 70% of Rosemary leaves contained a single isolate of the endophytic fungi, one fungal colony for each piece of the plant leaf. The results of the phenotypic and microscopic examination of the endophytic fungi isolates showed that they belong to the same species, which is *Alternaria alternata* was confirmed using PCR reaction, and the isolates were compared with global isolates registered in Gen Bank (Gen Bank MF099865.1 and OQ764793.1) and were 100% identical.

2- The highest induction of callus consisting of 100% plant leaves was when treated with a concentration of 2.0 $mg.L^{-1}$ NAA compared to the control treatment in which no induction occurred, and the highest average fresh weight of callus was when treated with 2.0 $mg.L^{-1}$ NAA alone or in combination with different concentrations of BA, the callus induced when treated with 2.0 $mg.L^{-1}$ NAA + 0.0 $mg.L^{-1}$ BA was characterized by its brittle texture. Its average fresh weight was 1.1280 $gm.pc^{-1}$, which showed its suitability for cell suspension cultures, which contain large numbers of single cells and the absence of cell masses. This medium encouraged the growth of cells and their initiation of the first division after 24 hours of suspension and increased the density of the cell suspension culture, to continue. Its divisions followed a gradual pattern in its growth, as its density reached 29.5 x 10^5

cells/cm^3 16 days after its creation. It also showed the results of detecting active compounds in the cell suspensions, which included alkaloids, phenols, flavonoids, terpenes, steroids, and rosmaric acid. The concentration and percentages of these compounds increase with the increase in the time period of the cell suspension, which is estimated in number of days. It was noted that these compounds gave the highest percentages after 21 days had passed from the formation of the cell suspension compared to their content after 7 and 14 days. The results of the evaluation of the biological effectiveness of the plant extract also showed a biological effect. As an antioxidant, it increases with increasing concentration and time period of the cell suspension by increasing the rate of suppression of the effect of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), as it was found that the highest percentages were 21 days after the formation of the cell suspension, reaching 86.900% at the concentration 500 ppm. The results also showed that the extract of the cell suspension of the plant has an anti-diabetic role through its ability to inhibit the activity of the α-amylase enzyme, and that the effect of the extract increases with increasing concentration and duration of time of the cell suspension. The highest effect was observed after 21 days on the formation of the cell suspension, amounting to 77.100% at a concentration of 0.5 ppm.

3- The results of comparing the content of the extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* with the aqueous extract and the extract of 21-day-old cell suspensions of the plant showed the active compounds. The endophytic mushroom extract recorded the highest percentages and concentrations, including alkaloids, 6.55%, phenols, 117.25 mg.g^{-1}, flavonoids, 104.35 mg.g^{-1}, terpenes, 6.65%, steroids, 6.05%, and rosmaric acid, 154.7%, compared to its content in the aqueous extract and cell suspensions at 21 days of plant life.

4- The results of evaluating the biological activity of the endophytic mushroom extract, the aqueous extract, and the extract of 21-day-old cell suspensions of

the plant showed that they all possessed vital properties as antioxidants by suppressing the activity of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and its ability to inhibit the activity of alpha amylase enzyme and therefore it works as an anti-diabetic. We notice that the suppression effect increased with increasing concentration of the extracts, which reached its highest level at the concentration of 500 ppm and 0.5 ppm. The internal mushroom extract recorded the highest average suppression of free radical activity by 68.800% compared to the aqueous extract and the suspension extract. Cellular. While the effect of the plant's 21-day-old cell suspension extract was superior to that of the fungus *A. alternata* and the aqueous extract, as it achieved the highest average inhibition of alpha-amylase activity by 53.908%.