تشخيص الفايسلين المعزول من الاوراق والمزارع النسيجية لكالس نبات كرز الارض *Physalis angulata* L.

مثنى محمد المهداوي[1] سارة مطشر حاتم

قسم علوم الحياة- كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى، العراق

[1] المسؤول عن النشر:sadeh1970@gmail.com

المستخلص

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 تقدير مركب الفايسلين احد نواتج الايض الثانوية لنبات كرز الارض *Physalis angulata* L. في اوراق النبات ومزارع الكالس المشتقة من السويقة تحت الفلقية Hypocotyl المفصولة من بادرات معقمة بعمر ثلاث اسابيع والمستحث على وسط موراشيج وسكوج MS المدعم بتركيز 0.3 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D متداخلا مع BA بتركيز 0.25 ملغم لتر$^{-1}$. اعتمدت نتائج كروماتوكرافيا السائل عالي الأداء HPLC في تشخيص الفايسلين المعزول وتقدير نسبة تواجده والتي بلغت 181.25 و155.53% لكل من فايسلين A وفايسلين B وعلى التوالي في اوراق النباتات البذرية. وتقارب نسبة تواجدهم في كالس بعمر 30 يوماً إذ بلغت 11.33 و12.25% على التوالي، ولوحظ زيادة مركب الفايسلين بزيادة عمر المزرعة الى 45 يوماً فقد بلغ نسب تواجده في هذه المزارع الى 18.77% لفايسلين A و250.60 % لفايسلين B، وان هذه القيم بدأت بالانخفاض مع تقدم عمر المزرعة اذ وصلت قيمهما الى 7.6 و66.52% على التوالي عند عمر 60 يوماً. وعموما تؤشر هذه البيانات ان هذه المزارع تمثل مصادر مستديمة مفضلة للحصول على الفايسلين.

الكلمات المفتاحية: Physalin, *Physalis angulata*, Callus induction , Micropropagation

المقدمة

ينتمي الجنس Physalis الى العائلة الباذنجانية Solanaceae ويعد النوع *Physalis alkekengi* اهم الانواع المنتشرة في مقاطعات معدودة من العراق (السامرائي، 1983) وقد سجل النوع *Physalis angulata* قيد الدراسة لأول مرة ضمن الموسوعة النباتية العراقية من قبل (العلاق، 2006). ان اصل تسميه النوع angulata لاتيني بمعنى زوايا دلاله على شكل الساق ويسمى النوع المدروس بالإنكليزية عدة تسميات هي Ballon, Cutleaf Ground - cherry, Goosberry, Hogweed cherry (Anonymous, 1969 وKarthikeyani وJanardhanan, 2003)، والنبات حولي صيفي له قيمه طبيه للشفاء من الامراض المختلفة حيث يعتبر مدر للبول وملين ويستخدم في علاج لدغات الافاعي (Silva وآخرون، 2005). وتستعمل ثمار هذا النبات لعلاج اضطرابات الطحال، وقد استخدم عصير الاوراق بخلطه مع زيت الخردل والماء كعلاج لوجع الاذن (Osho وآخرون، 2010)، وكيميائيا يحتوي النبات بصورة رئيسيه على القلويدات، الستيرويدات، الاحماض الدهنية، الاحماض الأمينية.

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 باستخدام تقانة الزراعة النسيجية لإنتاج النباتات المهمة عن طريق تقانة الإكثار الدقيق للنباتات التي تقوم على مبدأ الطاقة الكامنة للخلية Totipotency الذي اشار الية العالم G. Haberlandt (Sarin, 2005) تتميز النباتات الطبية عن غيرها باحتوائها مركبات وعناصر كيميائية ذات تأثير طبي

استلام البحث: 2016/11/24
قبول النشر: 2017/4/19

وفسلجي نافع لجسم الإنسان في حالة المرض والتي تستعمل بالمقادير المحددة علميا والموصوفة طبيا والتي اغلبها مواد ايض ثانوي وتصنف المواد الفعالة على أساس خصائصها الكيميائية وصفاتها الطبيعية إلى القلويدات والكلايكوسيدات والفينولات وغيرها (العرقاوي، 2009). يتراكم Physalin بصورة رئيسيه في النباتات المكتملة النضج حيث نلاحظه في النباتات المثمرة والنباتات المزهرة وتختلف الأنسجة من حيث تراكم Physalin حيث يتراكم Physalin A في الفواكه الناضجة، Physalin B في الاوراق الناضجة وبراعم الازهار، Physalin D في براعم الازهار، Physalin F في الاوراق الناضجة (Azlan وآخرون، 2005). وقد اشار Azlan وآخرون (2002) عند دراسة الجذور الشعرية المستحثة على اجزاء نباتية مختلفة من نباتات *Physalis minima* L. عند تلقيحها ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* سلالة LBA9402 في اوساط غذائية مختلفة وعند تنميتها في ظروف الضوء والظلام، ان اعلى محتوى من مادة Physalin B وPhysalin F قد سجلت عند تنمية الجذور الشعرية في ظروف الظلام في وسط Gamborg (B5) إذ بلغت 1.83 و4.15 ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف وعلى التوالي، في حين سجلت الجذور الاعتيادية قيم بلغت 1.60-1.62 ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف لـ Physalin B و3.30- 3.75 لـ Physalin F عند تنميتها تحت نفس الظروف، ولم تكن القيم معنوية عند تنمية الجذور في ظروف الضوء. وذكر Azlan وآخرون (2005) عند دراسة تراكم مادة Physalin باختلاف المراحل التطورية لأجزاء النبات الكامل ومقارنتها مع تواجده في مزارع المعلقات الخلوية بان اعلى نسبة بلغت في تراكمها في النباتات المثمرة ثم النباتات عند الازهار وتليها النباتات في مرحلة الحداثة، وان محتوى هذه الانسجة في النبات الكامل تراوحت بين 0.07-9.89 ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف في حين انخفضت هذه القيم في مزارع المعلقات الخلوية من 2.2 – 11.5 مرة عن القيم السابقة.

تهدف الدراسة الحالية الى معرفة تأثير عمر مزارع الكالس في مستوى الفايسلين ومقارنتها في محتوى الاوراق الحقيقي من المركب.

المواد وطرائق البحث

المادة النباتية (بذور نبات)

عقمت بذور نبات *Physalin angulata* L. سطحياً بغمرها في محلول هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl بتركيز 6% بنسبة 1 حجم مادة معقمة: 2 حجم ماء معقم لمدة خمس دقائق مع التحريك للتخلص من الفقاعات، ومن ثَم غسلت بالماء المعقم ثلاث مرات بمعدل ثلاث دقائق مرة$^{-1}$ لإزالة أثار المادة المعقمة، زرعت البذور المعقمة بوضعها على سطح 20 مل من وسط MS (Murashige وSkoog, 1962) الصلب الخالي من منظمات النمو في قنانٍ زجاجية حجم 250 مل وبمعدل خمسة بذور قنينة$^{-1}$. حفظت العينات في الظلام لمدة ثلاثة أيام، وحين إنباتها نقلت إلى غرفة النمو بدرجة 25± 2 ْم وفي نظام الضوء والظلام المتعاقب (16 ساعة ضوء 8 ساعة$^{-1}$ ظلام) وشدة إضاءة 2000 لوكس.

استحثاث الكالس من السويقة تحت الفلقية

فصلت السيقان تحت الفلقية Hypocotyl من البادرات المعقمة بعمر ثلاثة اسابيع ونقلت الى قنانٍ زجاجية حجم 100 مل تحوي 20 مل من وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو كمعاملة مقارنة، فضلا عن اوساط الاستحثاث التي اعدت لدراسة تأثير 2,4-D بتركيز 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ متداخلا مع BA بتركيز 0.25 ملغم لتر$^{-1}$ في طبيعة استجابة الزروعات لاستحثاث الكالس. حفظت العينات بالظروف المشار أليها سابقاً. قدر الوزن الطري ونسبة الاستجابة لاستحثاث الكالس لعينات السيقان تحت الفلقية للتراكيز السابقة، وحصد الكالس المستحث على العينات النباتية لأفضل استجابة بعد 30, 45, 60 يوماً من الزراعة بغية تقدير مركب الفايسلين.

استخلاص وفصل الفايسلين

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Chiang وآخرون (1992) والتي ذكرها مع بعض التحوير 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 الظلام، 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 الدوارRotary evaporator, ثم خفف المستخلص ببعض الماء المقطر ونقل المستخلص إلى قمع فصل حجم 250 مل وفصل الفايسلين باستخدام Hexane (30 مل× 2) لمدة خمس دقائق لكل مرة للتخلص من صبغة الكلوروفيل والصبغات الخرى والحوامض الدهنية غسلت بعدها مستخلصات الكحولية بالكلوروفورم $CHCl_3$ (30 مل× 2) لمدة خمس دقائق لكل مرة، رُكز مستخلص الكلوروفورم الحاوي على الفايسلين والمشتقات الاخرى حتى الجفاف التام من خلال تبخيره بالمبخر الدوار (RE-52A) عند 40ْم، أذيب الراسب في 1.0 مل من الميثانول عندها أصبحت العينة جاهزة لعملية تشخيص وتقدير محتواها من الفايسلين.

التشخيص والتقدير الكمي للفايسلين بتقنية الكروماتوكرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC

أجريت عملية الفصل والتشخيص لمركب الفايسلين المستخلص من العينات باستعمال تقانة كروموتوغرافيا الغاز وباستخدام جهاز كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي (HPLC) نوع (Shimadzu 10AV-LC Japan) وباستخدام عمود فصل column معدني ذي المواصفات الآتية:

الطور الثابت..... Phenomenex C-8 طول العمود 50ملم

القطر الداخلي للعمود .... 2.0 ملم قطر حبيبات الحشوة..... 3 مايكرومترا

وأجريت عملية التشخيص وفق الظروف المحددة لكل مركب (الجدول1).

الجدول1. 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$^{-1}$
حجم العينة المحقونة	20 مايكروليتر
درجة حرارة الفصل	35ْم
نوع الكاشف	UV –Vis 10A –SPD spectrophotometer عند الطول الموجي 230 نانوميتر
حسب المصدر	(Azlan وآخرون، 2002)

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

تؤخذ 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:

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

إذ أنّ:

T: تمثل مساحة المنحنى للمركب المعزول من العينات المختبرة.

S: تمثل مساحة المنحني للمركب القياسي (المقارنة).

النتائج والمناقشة

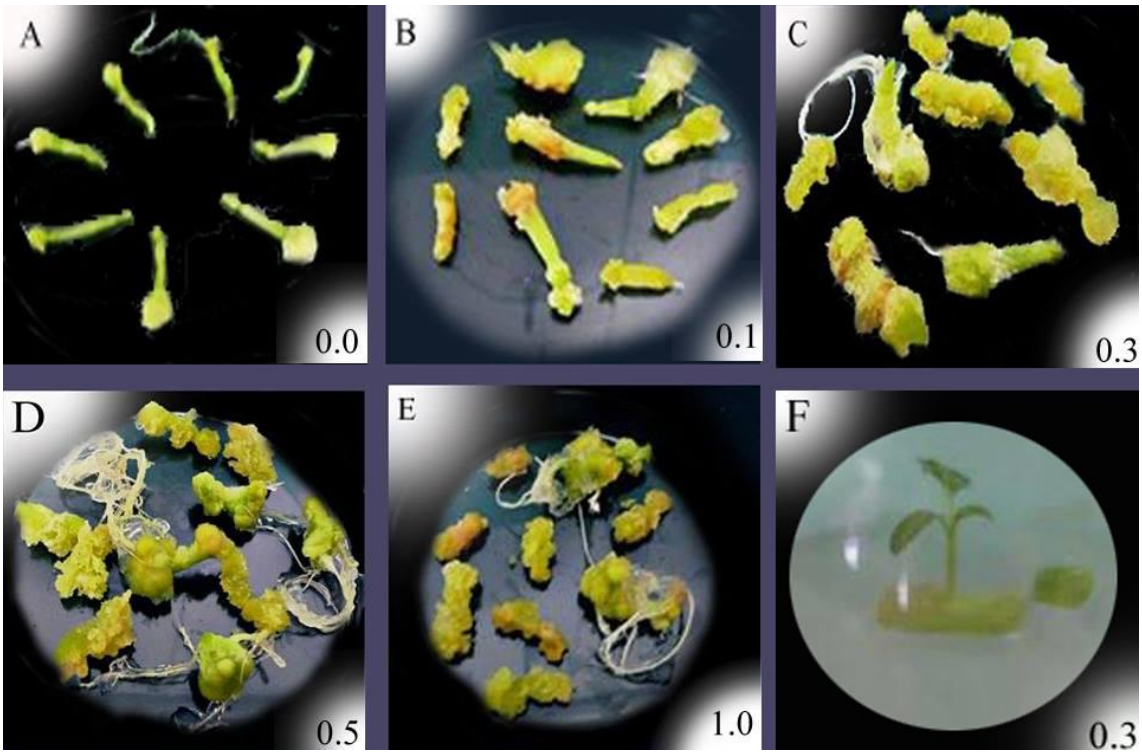
استحثاث الكالس من السيقان تحت الفلقية

يبين الجدول 2 تأثير تراكيز مختلفة من 2,4-D في استحداث الكالس من السويقة تحت الفلقية لنبات كرز الارض اذ أعطى التركيز 0.3 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D أعلى وزن طري للكالس بلغ 4.6 غم، والذي تفوق معنويا على باقي التراكيز المدروسة (شكل1:C) بينما اعطت معامله المقارنة اقل نسبه من وزن الكالس اذ لوحظ فيها انتفاخ في منطقه التاج وتمايز الجذور منها ولم تعط اي نسبة استجابة (شكل1:A)، في حين تكون الكالس في مناطق القطع ولم تفقد القطع شكلها في المعاملة 0.1 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D (شكل1:B)، بينما أعطت كل من المعاملة 0.5 و1.0 ملغم لتر$^{-1}$ نسبة استجابة 100% (شكل1:D وE) وبوزن طري بلغ 2.50 و2.13 غم على التوالي، ويلاحظ ان بعض عينات السويقة تحت الفلقية التي زرعت على وسط MS المدعم بتركيز 0.3 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D قد تمايزت إلى أفرع عرضية مباشرةً دون المرور بمرحلة الكالس (شكل1:F). ان قدرة تكوين الكالس تعتمد على وجود العضو وتأثره بنوع منظم النمو من حيث تركيزها وتجميعها في وسط النمو إذ ان استجابة الاعضاء المختلفة تختلف بحسب متطلباتها من الهرمونات وتركيزها، وكذلك فان الوسط الذي يحوي تراكيز عالية من الاوكسين مع تراكيز منخفضة من السايتوكاينين يعزز انقسام الخلايا مما يؤدي الى تكوين الكالس (Sheeba وآخرون، 2013).

الجدول 2. الوزن الطري للكالس (غم) الناتج من زراعة السويقة تحت الفلقية من نبات كرز الارض *Physalis angulata* على وسط MS المجهز بـ 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	+++

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



الشكل 1. استحثاث الكالس من السيقان تحت الفلقية لنبات *Physalis angulate* (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

التشخيص والتقدير الكمي لمركب الفايسلين

تشخيص Physalin A وتقدير نسبة وجوده في اوراق نبات كرز الارض البذرية ومزارع الكالس بوساطة HPLC

عبّرت المنحنيات الناتجة عن حقن العينات المختلفة في كروماتوكرافيا السائل عالي الاداء احتوائها ستيرويد Physalin بدلالة زمن الاحتباس المسجل لكل منها مع زمن احتباس العينة القياسية الفايسلين (شكل 2: A) وعلى النحو الاتي:

النباتات البذرية

أوضحت المنحنيات المسجلة بوساطة HPLC عن احتواء مستخلص عينات الاوراقPhysalin A اعتماداً على قيم زمن الاحتباس Retention time والبالغة 3.91 دقيقة مقاربةً مع قيم زمن احتباس عينة Physalin القياسية، الجدول 3.

وكشفت النتائج عن اختلافات واضحة في نسبة مساحة منحني Physalin القياسي مع نسب مساحة المنحنيات المسجلة Physalin A المعزول من عينات النباتات البذرية (شكل 2: B) واكدت البيانات وجود Physalin A في اوراق النباتات البذرية بنسبة بلغت 5.35%.

المزارع النسيجية

اظهرت نتائج التشخيص بوساطة HPLC وجود Physalin A في مستخلصات مزارع الكالس بعمر 30 و45 و60 يوما المشتق من السويقة تحت الفلقية بدلالة زمن الاحتباس للفايسلين A المعزول منها (جدول 3)، وقد سجل الكالس المستحث بعمر 30 يوما ارتفاعا ملحوظا عن النسبة المئوية لمساحة المنحني المسجل

للأوراق (شكل 2: A)، وازدادت هذه النسبة عند العمر 45 يوما (شكل 2: B) ثم بدأت بالانخفاض بتقدم عمر المزرعة الى 60 يوما (شكل 2: C).

الجدول 3. قيم زمن الاحتجاز Physalin A المعزول ونسب وجوده في أوراق نبات *Physalis angulata* البذرية ومزارع الكالس بأعمارها المختلفة

مصدر الفايسلين		زمن الاحتجاز (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 من السيقان تحت الفلقية	30 يوماً	3.91	60.21	11.33
	45 يوماً	3.25	11.13	18.77
	60 يوماً	3.63	8.65	7.60

تشخيص Physalin B وتقدير نسبة وجوده في اوراق نبات كرز الارض البذرية ومزارع الكالس بوساطة HPLC

عبّرت المنحنيات الناتجة عن حقن العينات المختلفة في كروماتوكرافيا السائل عالي الاداء احتوائها ستيرويد Physalin بدلالة زمن الاحتباس المسجل لكل منها مع زمن احتباس العينة القياسية الفايسلين وعلى النحو الاتي:

النباتات البذرية

أوضحت المنحنيات المسجلة بوساطة (HPLC) عن احتواء مستخلص عينات الاوراق Physalin B اعتماداً على قيم زمن الاحتباس Retention time والبالغة 5.00 دقيقة مقاربة مع قيم زمن احتباس عينة Physalin القياسية، جدول 4.

وكشفت النتائج عن اختلافات واضحة في نسبة مساحة منحني Physalin القياسي مع نسب مساحة المنحنيات المسجلة Physalin B المعزول من عينات النباتات البذرية (شكل 2: A) واكدت البيانات وجود Physalin B في اوراق النباتات البذرية بنسبة وجود بلغت 3.8%.

المزارع النسيجية

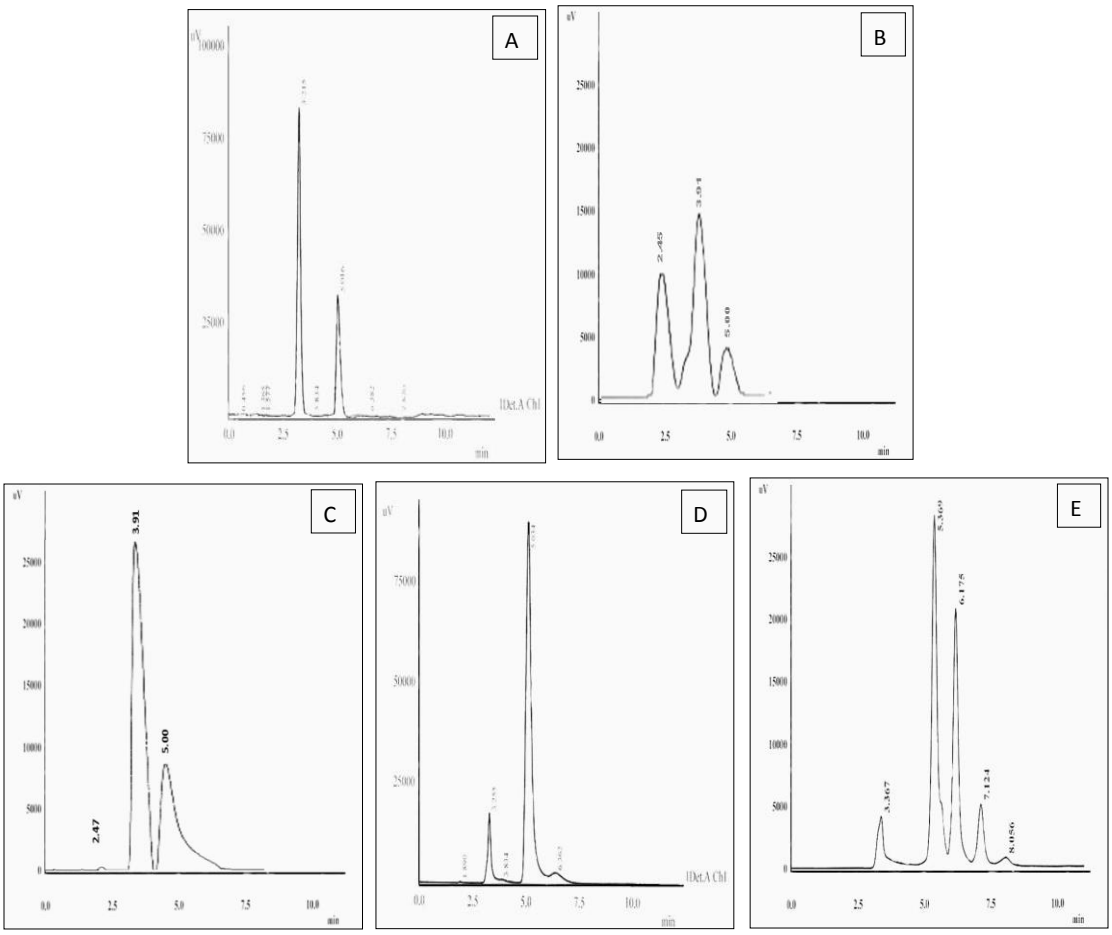
أظهرت نتائج التشخيص بوساطة HPLC وجود Physalin B في مستخلصات مزارع الكالس بعمر 30 و45 و60 يوما المشتق من السويقة تحت الفلقية بدلالة زمن الاحتباس للفايسلين B المعزول منها (جدول 4) ارتفاعا ملحوظا في مزارع الكالس بعمر 30 يوما عن النسبة المئوية لمساحة المنحني المسجل للأوراق (شكل 2: A)، وازدادت هذه النسبة عند العمر 45 يوما (شكل 2: B) ثم بدأت بالانخفاض بتقدم عمر المزرعة الى 60 يوما (شكل 2: C).

الجدول 4. قيم زمن الاحتجاز Physalin B المعزول ونسب وجوده في أوراق نبات *Physalis angulata* البذرية ومزارع الكالس بأعمارها المختلفة

مصدر الفايسلين		زمن الاحتجاز (دقيقة)	مساحة المنحني (%)	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	5.00	36.48	12.25
	45 يوماً	5.03	83.27	250.60
	60 يوماً	5.36	42.42	66.52

ان الزيادة في نسب تواجد مركب الفايسلين A وB مع تقدم عمر المزرعة في النتائج المشار اليها انفا قد يكون بسبب ان منحني نمو المزارع النباتية الذي يأخذ شكل الحرف S يمر بثلاثة اطوار هي: طور التباطؤ والذي خلاله ينعدم النمو تقريبا ،ويتبعه الطور الاسي الذي تزداد خلاله نواتج الأيض الاولية ويتضاعف النسيج بسرعة مستهلكا مغذيات الوسط وبالنتيجة قلة مركبات الأيض الثانوية، وتصل بعدها المزارع الى الطور الثالث المتمثل بطور الاستقرار وهي المرحلة التي تسجل ارتفاعا في نواتج الأيض الثانوي نتيجة لتوقف معدل الأيض الاولي واستغلال المخزون من النواتج الايضية الاولية لبناء النواتج الايضية الثانوية (Ramawat، 2008).

ان سبب انخفاض كمية مواد الأيض الثانوي مع كبر عمر الكالس وصولا الى 8 اسابيع ربما يعود الى كبر عمر المزرعة وحاجتها الى اعادة الزراعة وتحولها الى المرحلة الاخيرة وهي مرحلة عدم القدرة على التطور culture unviability نتيجة لنفاد المواد الغذائية في الوسط وزيادة تراكيز المواد السامة فيه وما يميز هذه المرحلة تحول لون المزارع والاوساط الى اللون البني الناتج عن زيادة المواد الفينولية.



الشكل 2. منحنيات الفاسلين للعينة القياسية (A) والمعزول من اوراق (B) وكالس السيقان تحت الفلقية بعمر 30 يوم (C) والكالس بعمر 45 يوم (D) والكالس بعمر 60 يوم (E) لنباتات *Physalis angulata* L. بوساطة HPLC

المصادر

السامرائي، خلود وهيب عبود. 1983. توزيع القلويدات في بعض الانواع البرية من العائلة الباذنجانية Solanoceae في العراق. رسالة ماجستير. جامعة بغداد. كلية العلوم.

العرقاوي، نبيل. 2009. موسوعة النباتات الطبية المصورة. الطبعة الأولى. اتحاد الناشرين السوريين.

العلاق، سناريا عباس جعفر. 2006. دراسة مظهريه وتشريحيه لأنواع بريه مختارة من العائلة الباذنجانية (Solanaceae) في العراق. رساله ماجستير. جامعه بغداد. كليه العلوم للنبات.

Anonymous, 1969. The welth of India. Publication and information directorate. Vol. 8. *CSIR*, New Delhi.

Azlan, G. J., M. Marziah, M. Radzali and R. Johari. 2005. Accumulation of physalin in cell and tissues of *Physalis minima* L. *Acta. Hort*., 2: 53-59.

Azlan, G. J., M. Marziah, M. Radzali and R. Johari. 2002. Establishment of *Physalis minima* hairy roots culture for the production of physalins. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*., 69: 271-278.

Chiang, H. C., S. M. Jaw and P. M. Chen. 1992. Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells *in vitro*. *Anticancer Research*, 12: 1155-1162.

Karthikeyani, T. P. and K. Janardhanan. 2003. Ethno-Medico-Botanical studies of the tribals of lower palani hills, south India. *Asi. J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci*., 5: 467 - 497.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant*., 15: 473-497.

Osho, A., T. Adetunji, S. O. Fayemi and D. O. Moronkola. 2010. Antimicrobial activity of essential oils of *Physalis angulate* L. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med*., 7(4): 303-306.

Ramawat, K. G. 2008. Plant Biotechnology. S. Chand and Company Ltd. 3rd edition, New Delhi, India.

Sarin, R. 2005. Useful metabolites from plant tissue cultures. *Biotech*., 4: 79-93.

Sheeba, E., S. Palanivel and S. Parvathi. 2013. Effect of plant growth regulators on callus induction in *Physalis minima* L. *Intern. J. of Innovative Res. in Sci. Engineering and Technology*, 2(9):4847-4851.

Silva, M. T., S. M. Simas, T. G. Batista, P. Cardarelli and T. C. Tomassini. 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.

IDENTIFICATION OF PHYSALIN ISOLATED FROM LEAVES AND CALLUS TISSUES CULTURES OF *Physalis angulata* L

Muthana M. I. Al-Mahdawe[1, 3] **Sarah. M. Hatam[2]**

Dept. of Biology-College of Education for Pure Sciences-Univ. of Diyala, Iraq.

[1] Corresponding author: sadeh1970@gmail.com

ABSTRACT

This study was conducted in the plant tissue and cell culture laboratory department of Biology at the College of Education for Pure Sciences, University of Diyala, during the period October 2015 – 2016 May. The aim was to estimate of physalin one of the secondary metabolic product in *Physalis angulata* L. plants from leaves and callus culture derived from hypocotyl of sterile three weeks old seedlings and induction on MS medium supplemented with 0.3 mg l^{-1} 2,4-D +0.25 mg.l^{-1}BA . Chromatography adopted the results of high performance liquid HPLC in the diagnosis of isolated physalin and estimate the proportion of its presence amounting to 181.25, and 155.53% for each of the physalin A and B respectively and leaves of seed plants. The convergence of their presence ratio in callus age of 30 days, amounting to 11.33 and 12.25%, respectively. Increasing of physalin was observed with increasing the age of culture to 45 days, and its presence ratios reached in these culture 18.77% for physalin A and 250.6% for physalin B. It was observed that these values began to decline with advancing age of the culture which reached their values to 7.6 and 66.5%, respectively, at the age of 60 days. Overall, these data indicate that these cultures represent a sustainable favorite sources for physalin.

Key words: Physalin, *Physalis angulata*, Callus induction, Micropropagation.