الإكثار الدقيق لنبات *Hypericum perforatum*

فوزية عثمان[1] و سليم زيد[2] و حسين الزعبي[3]

تاريخ الإيداع 2013/09/18
قبل للنشر في 2013/12/22

الملّخص

وضعت طريقة دقيقة لإكثار نبات *Hypericum perforatum* في الزجاج من أجل الحصول على أعداد كبيرة من هذا النبات المهم طبياً. إذْ أخذت عقل مفردة تحوي قمماً نامية وبراعمَ جانبية من هذا النبات الذي جُمِعَ من محافظة طرطوس، وأُجريت عملية التطهير السطحي للأجزاء النباتية وزرعت في أنابيب اختبار تحوي وسطاً مغذياً MS (Murashige and Skoog 1962) وبعد ذلك أُكثرتْ على وسط MS مضاف إليه منظمات نمو مختلفة (البنزيل أمينو بيورين BAP، اندول بيوترك أسيد IBA، الجبريلين GA3) ثم زرعت النموات الخضرية الناتجة على وسط MS يحتوي تراكيز مختلفة من IBA من أجل تجذيرها. أوضحت النتائج تشكل أكبر عدد للنموات 39.6 في المعاملة MS3 التي تحتوي 1.33µm من BAP و1µm من IBA، في حين لوحظ أكبر طول للنموات 5.1 سم في المعاملة MS5 التي تحتوي GA3 2.4µm + 1.33µm BAP+1µm IBA. أمَّا في مرحلة التجذير فكانت المعاملة R3 التي تحتوي MS + 7.33µm IBA الفُضلى، إذْ كانت نسبة التجذير 64% وعدد الجذور 6.9، أمَّا طولها فكان 5.7 سم. وكانت نسبة الأقلمة 85% .

الكلمات المفتاحية: في الزجاج، الإكثار الدقيق، منظمات النمو

[1] طالبة ماجستير، [2] الأستاذ المشرف، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.
[3] الأستاذ المشرف المشارك، قسم التقانات الحيوية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.

Micropropagation of *Hypericum perforatum*

F. Othman[(1)], S. Zaid[(2)] and H. Alzoube[(3)]

Received 18/09/2013
Accepted 22/12/2013

ABSTRACT

A detailed *in vitro* multiplication system for rapid micropropagataion of the *Hypericum perforatum L. has been developed. Shoot tips and axillary buds excised from this* plant which were collected from Tartous explants and surface disinifected then cultured on MS (Murashige and Skoog 1962) medium then placed onto MS basel medium containing a combination of growth regulators at different concentrations (BAP IBA GA3), then placed onto MS basel medium containing IBA in different concentration. Results showed that the highest number of growth was 39.6 when (1.33µM BAP + 1µM IBA) were adding, while the highest of the growth was 5.1 cm in medium MS5 after adding (1.33µM BAP + 1µM IBA + 2.4GA3). The observed rooting was (6.9 roots, 5.7cm length and 64% in percentage of rooting) in R3 (MS+ 7.33µM IBA), and acclimatization was 85%.

Key word: Invitro, Micropropagation, Growth regulators.

[(1)] MCS., Student, [(2)]Superviser, Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus university, Syria.
[(3)] Associated Superviser, GCSAR, Biotechnology, Damascus, Syria.

مقدمة

يعدُّ نبات *Hypericum* أحد النباتات الطبية (الدوائية) المهمة في العالم، إذْ يحتوي العديد من المركبات الكيميائية تتمثل بتسع مجموعات رئيسة من المكونات الفعالة: الفلافونوئيدات، والفلووفلوسينولات، والنافتودي انترونات، والكونتونات، والتانينات، والكسانتونات، والزيت الأساسي، وحموض أمينية....إلخ (Todd,R.G.1977).

ينتمي جنس ***Hypericum*** إلى شعبة Magnoliophyta صف Magnoliopsida فصيلة Guttifera، ويظهرعلى شكل أعشاب أو جنبات،الأوراق متقابلة ويلاحظ على حافاتها غالباً نقاط شفافة، الأزهار تجتمع في نورات محدودة انتهائية على شكل عناقيد خنثوية والثمرة علبية. تمتد مرحلة الإزهار لمعظم الأنواع بين شهري أيار وتموز، والإثمار بين شهري آب وأيلول. يضم هذا الجنس 360 نوعاً يوجد منها في سورية 21 نوعاً منتشرة في أنحاء القطر كلّه (Mouterde 1970).

يشار إلى النوع *Hypericum perforatum* بأسماء عديدة منها بقلة يوحنا، حشيشة القلب، العرن المثقب (تريز وايفانز 2003).

يعدُّ النوع *Hypericum perforatum* من بين الأعشاب الطبية التي خضعت في السنوات الثلاثين الماضية لاختبارات سريرية ومخبرية مكثفة جعلته أحد أهم الأعشاب الطبية المستخدمة في أوروبا والولايات المتحدة الاميركية لمعالجة العديد من الأمراض (خليفة 1998).

صنف هذا النبات في الولايات المتحدة الأميركية خلال الأشهر الأولى من عام 1999 بالدرجة الثانية بعد الجينكو Genko كأفضل منتج عشبي مبيع في الأسواق (تريز وايفانز2003).

استخدم هذا النبات قديماً مادة مضادة للإسهال وعلاجاً للأمراض الجلدية ومخففاً للحمى وقاطعاً للنزف، وفي معالجة لسعات الأفاعي، كما كان يستخدم لزيادة النشاط ورفع ضغط الدم

(Gunther.1993)، والعديد من الشعوب القديمة استخدمته في معالجة الديدان وبعض الطفيليات (Kirreava *et al*., 1999)، وفي معالجة الحلأ البسيط (Albert *et al*., 1996).

أمّا استخداماته في الطب الحديث فتركزت على نواحٍ عديدة فقد استخدم كمضاد للأحياء الدقيقة مثل الفيروسات (Albert *et al*., 1996)، والجراثيم (Barnes *et al* .,2001)، والفطريات (Degar *et al*., 1992). ويستخدم بشكل واسع جداً عالمياً كمضاد للاكتئاب ويحدث التأثير المضاد للاكتئاب عن طريق زيادة وفرة النواقل العصبية عند المشبك العصبي (حرامي، 2005)، وفي ألمانيا يمثل استخدامه 25% من إجمالي وصفات مضادات الاكتئاب، إذ يذكر بعض الأطباء أن فعالية هذا النبات يفوق عشرين ضعفاً فعالية البروزاك الذي يعدُّ من مضادات الاكتئاب المهمة.

كما أن له استخدامات في الصباغة، وصناعة مستحضرات التجميل ضمن المراهم أو بالتغذية أو يضاف إلى المشروبات الكحولية.

ركزتْ معظم البحوث العالمية على دراسة التركيب الكيميائي للنبات وطرائق استخلاص المكونات الفعالة لكونه مصدراً للعديد من المكونات الفعالة المستخدمة صيدلانياً، وقد شغل إكثار هذا النبات مخبرياً العديد من الباحثين إذْ درس(Kirakosyan *et al*., 2000) محتوى نبات *Hypericum perforatum* من الهيبرسين والبسيدو هيبرسين في النبات المزروع في الزجاج.

كما درس (Astarita and Santarem, 2003) إمكانية تجديد*Hypericum perforatum* والحصول على نموات جديدة وإنتاج الهيبرسين. وكان وسط الإكثار الأفضل باستخدام BA بتركيز 4.5 مغ/ل وNAA بتركيز 0.05 مغ/ل.

كما قام (Hokkanen *et al*., 2007) بالاصطناع الحيوي للهيبوفورين في *Hypericum perforatum* المزروع نسيجياً. وجرى ذلك بإضافة الحمض الأميني التيروزين والحمض الأميني ايزولوسين إلى وسط الزراعة. وقد تناولت بحوث أخرى إكثار أنواع أخرى من جنس *Hypericum*، إذْ قام (Oluk and Orhan 2009) بتحفيز الإكثار الدقيق *Hypericum triquatrifolium* عن طريق إضافة TDZ. وقد كانت أفضل معاملات الإكثار الوسط MS مضافاً إليه TDZ بتركيز 1.25 مغ/ل.

ودرس (Bacila *et al*., 2010) الإكثار الخضري الدقيق *Hypericum maculatum*. وتحقّق أعلى معدل إكثار باستخدام الوسط MS مضافاً إليه BA بتركيز 0.5 مغ/ل مع K وTDZ وNAA بتركيز 0.5 مع/ل لكل منهم، وحصل بهذا الوسط على 89 نمواً بدءاً من نمو واحد. أمَّا وسط التجذير الأفضل فكان 1/2MS مضافاً إليه IAA بتركيز 1 مع/ل.

أهمية البحث وأهدافه

نظراً إلى الأهمية الطبية التي يتميّز بها هذا النبات وصعوبة الحصول عليه والمساحة المحدودة لظهوره هدف هذا البحث إلى إيجاد طريقة سهلة وسريعة للحصول على أعداد كبيرة من هذا النبات وبكلفة منخفضة؛ وذلك من خلال تقانة زراعة الأنسجة النباتية (Tissue culture).

مواد البحث وطرائقه

مكان تنفيذ البحث: نُفّذ البحث في مختبر زراعة الأنسجة النباتية بكلية العلوم/ قسم علم الحياة النباتية خلال الأعوام 2011–2013.

المادة النباتية: استخدمت لهذه التجربة أجزاء نباتية أخذت من نبات *Hypericum perforatum* النامي في طرطوس بشكل طبيعي (منطقة خربة فرس)، إذْ أخذت عقل مفردة بطول 0.5–1 سم تحوي البراعم الجانبية والقمم النامية.

مراحل تنفيذ البحث:

1- تحضير الأجزاء النباتية وتعقيمها:

جمعت الأجزاء النباتية ووضعت في أوعية زجاجية ثم غسلت تحت الماء الجاري مدة ساعة، ثم عُقّمتْ بالمبيد الفطري اكوبسين بتركيز 0.5% مدة 15 دقيقة، وغسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات، وذلك قبل إخضاعها للتعقيم السطحي تحت جهاز العزل الجرثومي بحسب المعاملات الموضحة في الجدول (1). وقد أضيف محلول Tween 20 وبمعدل قطرة واحدة إلى كلّ 100 مل من محلول التعقيم من أجل خفض التوتر السطحي وزيادة تماس الأجزاء النباتية مع مادة التعقيم، وبعد التعقيم غسلت الأجزاء النباتية ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم مدة خمس دقائق لكل مرة للتخلص من آثار المادة المعقمة.

الجدول (1) معاملات التعقيم المستعملة في مرحلة الزراعات الأولية

رقم المعاملة	معاملات التعقيم	عدد البراعم المزروعة
1	كلوركس 20% مدة 10 دقائق	85
2	كلوركس 20% مدة 5 دقائق	85
3	كلوركس 15%مدة 10 دقائق	85
4	كلوركس 15% مدة 5دقائق	85
5	كحول 70% مدة 2دقيقة	85
6	كحول 70% مدة 4دقائق	85
7	كحول 70% مدة 6 دقائق	85

زرعت الأجزاء النباتية المعقمة بطول 0.5-1 سم في أنابيب الاختبار على وسط الزراعة التأسيسية MS والخالي من منظمات النمو؛ وذلك مدة أسبوعين إذْ استبعدت خلالهما الأنابيب الملوثة (الشكل 1).

الشكل (1) الزراعة التأسيسية

2 -إكثار الأجزاء النباتية الخالية من الملوثات:

بعد أسبوعين من الزراعة التأسيسية أخذت النموات الخضرية المتشكلة والخالية من الملوثات وزرعت على عدة معاملات إكثار (أوساط غذائية مضاف إليها تراكيز من منظمات النمو المختلفة) موضحة بالجدول (2) والأشكال (2 و3). جرت الزراعة بأوعية زجاجية وبمعدل 30 مكرراً/معاملة إذْ أضيف إلى الوعاء 30 مل من الوسط المغذي. حضنت الزرعات في غرفة النمو growth room بدرجة حرارة 23 ± 1 مْ وباتباع نظام الإضاءة التعاقبي (8/16) في أثناء النمو وكانت شدة الإضاءة نحو 2000- 3000 لوكس.

الجدول (2) التوافقات الهرمونية المستعملة في إكثار نبات *Hypericum* مخبرياً *in vitro*

GA3 (µM)	IBA(mM)	BAP(mM)	منظم النمو / رمز المعاملة
0	0	0	**MS0**
0	1	0.44	**MS1**
0	1	0.88	**MS2**
0	1	1.33	**MS3**
0	1	22.2	**MS4**
2.4	1	1.33	**MS5**
2.4	1	2.22	**MS6**

الشكل (2) الوسط MS0 بعد شهر

الشكل (3) وسط MS1

3- تجذير النموات الخضرية:

زرعت النموات الخضرية المتشكلة في مرحلة الإكثار السابقة وبطول 4-5 سم على عدة معاملات (أوساط غذائية مضاف إليها تراكيز هرمونية متنوعة من IBA) موضّحة بالجدول (3). جرت عملية الزراعة بأوعية زجاجية وبمعدل 25 مكرراً/معاملة إذْ أضيف إلى الوعاء 30 مل من الوسط المغذي وبعد 15 يوماً نقلت إلى وسط MS خال من الهرمونات وحضنت الزراعات مع وجود الإضاءة بمعدل 16 ساعة والظلام 8 ساعات. أخذت النتائج بعد أربعة أسابيع من الزراعة بالنسبة إلى عدد الجذور وطولها ونسبة التجذير.

الجدول (3) المعاملات المستعملة في تجذير نبات *Hypericum* مخبرياً (*in vitro*)

منظم النمو / رمز المعاملة	IBA(mM)
R1	2.4
R2	4.9
R3	7.3
R4	9.8
R0	0

4- تقسية النباتات:

غسلت جذور النباتات الناتجة من عملية التجذير بالماء غسلاً جيداً بعد نزعها من وسط الزراعة؛ وذلك لتجنب تكاثر الفطريات والجراثيم التي تؤثر في نمو الجذور ومن ثمَّ نمو النبات، زرعت النباتات في أصص بلاستيكية نظيفة تحوي خليطاً معقماً من التورب والبرليت بنسبة 1/2 (حجم/حجم) وغطيت بأكياس بلاستيكية شفافة للمحافظة على الرطوبة العالية، وحضنت بظروف غرفة النمو في درجة حرارة 23 ± 1 ْم نهاراً

و16 ± 1 مْ ليلاً، وشدة إضاءة 2000 – 3000 لوكس، ورطوبة 70%. وذلك مدة أربعة أسابيع مع فتح تدريجي للأكياس حتى إزالتها تماماً بهدف تقليل الرطوبة تدريجياً.

5- التحليل الإحصائي:

حُلّلت النتائج باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS وفق اختبار دونكان لمقارنة المتوسطات، إذ قورنت متوسطات 30 عينة نباتية لكل معاملة إكثار، و25 عينة نباتية لكل معاملة تجذير علماً أنَّ التجارب أعيدت ثلاث مرات، وقورنت المتوسطات عند مستوى المعنوية % 0.05.

النتائج والمناقشة

التطهير السطحي للأجزاء النباتية:

بشكل عام وبمقارنة النتائج الموضّحة بالجدول (4)، تبين أن أفضل نتيجة تم الحصول عليها عند استخدام الإيتانول 70% مدة أربع دقائق إذْ وصلت النسبة المئوية للبراعم الحية والخالية من التلوث 70.59%، كما تظهر النتائج أن الإيتانول 70% أظهر كفاءة تعقيم أفضل من الكلوركس (هيبوكلوريت الصوديوم) بشكل واضح، إذْ وصل متوسط النسبة المئوية للبراعم الحية وغير الملوثة 49.11% عند استعمالنا الإيتانول 70% في حين لم يتعدَ المتوسط 24.11% عند استعمال الكلوركس، بدأت البراعم الحية وغير الملوثة بالنمو بعد أسبوعين من زراعتها.

الجدول (4) كفاءة معاملات التعقيم المستخدمة في مرحلة الزراعات الأولية

رقم المعاملة	معاملات التعقيم	عدد البراعم المزروعة	عدد البراعم الملوثة	عدد البراعم الميتة	عدد البراعم الحية	النسبة المئوية للبراعم الحية%	متوسط النتائج بحسب نوع مادة التعقيم%
1	كلوركس20%مدة10 دقائق	85	13	57	15	17.64	24.11
2	كلوركس 20%مدة 5 دقائق	85	20	45	20	23.52	
3	كلوركس15%مدة10 دقائق	85	14	46	25	29.41	
4	كلوركس 15%مدة 5 دقائق	85	19	44	22	25.88	
5	إيتانول 70%مدة 2 دقيقة	85	17	13	55	64.70	49.11
6	إيتانول 70%مدة 4 دقائق	85	13	12	60	70.59	
7	إيتانول 70%مدة 6 دقائق	85	13	20	52	61.17	

إن الحصول على زراعات معقمة من أهم مراحل الإكثار بالأنسجة وأكثرها صعوبة؛ وذلك بسبب مشكلتي التلوث وتماوت البراعم ولذلك فإنه من الضروري البحث لإيجاد أفضل وسيلة تعقيم آمنة نستطيع من خلالها التخلص من الجراثيم والفطريات من النسيج النباتي (Fiorino and Loreti, 1987). هناك العديد من المواد التي تستعمل في عملية التعقيم ولعل أكثرها استعمالاً هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl وكلوريد الزئبق HgCl2، عموماً تشير العديد من البحوث إلى أهمية استعمال هيبو كلوريت الصوديوم في التطهير السطحي للعينات النباتية (Jones and Hoopgood, 1979)، إلا أن نتائج الدراسة الحالية

تبيّن أنَّ استخدام الإيتانول 70% دون إضافة كلوركس (هيبوكلوريت الصوديوم) أعطى نتائج أفضل حيث زاد عدد البراعم االحية، وهذا لا يتفق مع نتيجة (Astarita and Santarem, 2003) إذْ كانت معاملة التعقيم الفُضلى كلوركس 15% مدة 20 دقيقة. مع أنه عند استعمال الكلوركس حتى بتراكيزه الضعيفة مع الكحول 70% أدى إلى نقصان عدد البراعم الملوثة لكن لا يمكننا عدَّهُ المعقم الأفضل بدراستنا الحالية، فقد أدى إلى زيادة عدد البراعم الميتة بشكل واضح ويمكن تفسير هذا بأنَّ النبات عشبي وبراعمه حساسة جداً للمعقمات، وهذا يتوافق مع ما نصح به (الرفاعي والشويكي، 1987) بأنه يُستعمل الايتانول 70 % للأجزاء النباتية رقيقة الأنسجة حيث توضع هذه الأجزاء في الإيتانول مدة لا تتجاوز خمس دقائق.

تكاثر النموات الخضرية مخبرياً:

دُرس تأثير توافقات هرمونية مختلفة من البنزيل أمينو بيورينBAP، مع إندول بيوترك أسيد IBA والجبريلين GA3 في متوسط عدد النموات الجديدة المتشكلة وطولها. ويوضّح الجدول (5) هذه النتائج.

الجدول (5) تأثير التوافقات الهرمونية المختلفة في تكاثر النموات الخضرية لنبات *Hypericum* (متوسط 30 جزءاً نباتياً ± الخطأ المعياري SE)

رمز الوسط	تركيب الوسط (mm)	متوسط طول النموات (سم)	متوسط عدد النموات/خزعة
MS0	MS	4.1± 0.02 b	2.6±0.02c
MS1	MS + 0.44BAP + 1IBA	1.35 ± 0.07 c	19.78 ± 0.08 bc
MS2	MS + 0.88 BAP + 1IBA	1.43 ± 0.06 c	25.3 ± 0.01b
MS3	MS + 1.33 BAP + 1IBA	3.81 ± 0.05 bc	39.61 ± 0.01a
MS4	MS +2.22 BAP + 1IBA	2.42 ± 0.04 cb	29.22 ± 0.07b
MS5	MS + 1.33 BAP + 1IBA+2.4GA3	5.11 ± 0.01 a	39.61± 0.01a
MS6	MS + 2.22 BAP + 1IBA+2.4GA3	3.08 ± 0.08 bc	29.21± 0.07 b

الأرقام ذات الحروف المختلفة في العمود نفسه يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى معنوية 0.05%.

يتبيّن من خلال النتائج المتحصل عليها أن المعاملة MS5 وMS3 (الأشكال 4 و5) أعطت أفضل النتائج من حيث تأثيرها في متوسط عدد النموات الجديدة المتشكلة، إذْ بلغ متوسط عدد النموات 39.61 كل أربعة أسابيع بدءاً من نمو واحد. وكانت الفروق معنوية مع المعاملة MS1 والمعاملة MS2، وأظهرت النتائج تفوق المعاملات جميعها المضاف إليها هرمونات وبفروق معنوية واضحة على معاملة الشاهد MS0 الخالي من الهرمونات.

الشكل (4) وسط MS3

الشكل (5) وسط MS5

أمّا بالنسبة إلى متوسط طول النموات فكانت المعاملة MS5 هي الفُضلى، إذْ بلغ متوسط طول النموات على هذا الوسط 5.11 سم لكل نمو بعد أربعة أسابيع بدءاً من نمو واحد، وكانت الفروق معنوية مع باقي المعاملات.

يعتمد تشكل النموات الخضرية الجديدة اعتماداً كبيراً على وجود السيتوكينينات في الوسط الغذائي إذْ تؤدي الستوكينينات دوراً مهماً ورئيساً في زيادة تشكل النموات الخضرية الجديدة كما يؤدي دوراً في التثبيط الكلي أو الجزئي لتشكل الجذور، كما تشجع السيتوكينينات نمو البراعم الإبطية؛ وذلك بتخفيض السيادة القمية للبراعم خلال مرحلة الإكثار (Nordstorm and Eliasson, 1986).

إن وجود الأوكسينات في أوساط الإكثار ضرورية لتعزيز دور السيتوكينينات في زيادة عدد النموات الخضرية الجديدة، إذْ إنَّ وجود الأوكسينات والسيتوكينينات معاً يعدُّ مهماً من أجل تنظيم النمو والتشكل المورفولوجي في زراعة الأنسجة النباتية، إذْ يقوم الأوكسين بتعديل النظام الأسموزي والنفاذية الخلوية كما يزيد من نسخ المادة الوراثية وتكوين البروتينات (Rossignol *et al.*,1990). وقد أوضح (Christison and Warnick, 1988) أن التشكل يجري تحت سيطرة العلاقة بين الأوكسين والسيوكينين.

إن إضافة الجبريلين GA3 إلى أوساط الإكثار يؤدي إلى زيادة في طول النموات، ويختلف تأثير هذا الهرمون باختلاف الأنواع النباتية، كما أن له دوراً في زيادة مساحة سطح الورقة (Christison and Warnick, 1988).

أدى استعمال (BAP) بتركيز 1.33 ميكرومولاً مع (IBA) بتركيز 1 ميكرومول مضافاً إليهما 2.4 ميكرومول (GA3) إلى الحصول على أفضل معدل نمو، إذْ وصل متوسط عدد

النموات الجديدة المتشكلة بدءاً من برعم واحد إلى 39.61 نمواً ومتوسط طولها إلى 5.11 سم، وهذه النتيجة لا تتفق مع ما توصل إليه (Astarita and Santarem, 2003) إذْ كان وسط الإكثار الأفضل خالياً من الجبريلين. كما كانت نتائجنا غير متفقة مع نتائج (Oluk and Orhan 2009) الذي حصل على أفضل معدل نمو بإضافة TDZ .

تجذير النموات المكاثرة مخبرياً:

جرت دراسة تأثير تراكيز مختلفة من IBA في نسبة التجذير، وعدد الجذور المتشكلة، وطولها (جدول6).

الجدول(6) تأثير المعاملات المختلفة في تجذير نبات *Hypericum* مخبرياً (متوسط 25 جذراً نباتياً ± الخطأ المعياري SE)

رمز الوسط	تركيب الوسط	النسبة المئوية للتجذير	متوسط طول الجذور(سم)	متوسط عدد الجذور
R1	MS + 2.4µm IBA	22%	3.6 ± 0.01 c	3.2.± 0.04 b
R2	MS + 4.9µm IBA	40%	3.1 ± 0.04 c	3.4 ± 0.06 b
R3	MS + 7.3µm IBA	**64%**	5.7 ± 0.01b	6.9 ± 0.02 a
R4	MS + 9.8µm IBA	49%	6.3 ± 0.04 a	4.9 ± 0.03 b
R0	MS	0%	0	0

تختلف المتوسطات عن بعضها عند مستوى المعنوية % 0.05.

يتبيّن من خلال النتائج المتحصل عليها أن أعلى نسبة التجذير 64% قد تم الحصول عليها على وسط يحوي IBA بتركيز 7.3 µm وبلغ متوسط عدد الجذور 6.9 ومتوسط طول الجذور 5.7 سم فكانت المعاملة R3 هي الفضلى وبفروق معنوية عن بقية المعاملات (الشكل 6).

الشكل (6) تجذير وسط R3

إن عدم إضافة IBA إلى وسط الزراعة أدى إلى عدم حدوث تجذير في النموات المزروعة نهائياً، وهذا يعني ضرورة إضافة IBA إلى وسط التجذير. إلا أنَّ زيادة التركيز من هذا الأوكسين لم يؤدِ إلى تشكل الجذور بنسبة أفضل على العكس من ذلك إذْ انخفضت نسبة التجذير إلى 49% بالمعاملة R4.

تمتلك الأوكسينات دوراً أساسياً في التحكم بتشكيل الجذور (Hu and Wang, 1983). ويختلف تأثير الأكسين في عملية التجذير بحسب تركيز الأكسين المستخدم ونوعه، كما يؤدي وجود عدة أوكسينات في الوسط –أحياناً- إلى تجذير أفضل في العديد من النباتات (Nabors *et al*.,1983)، لما له من دور مباشر في زيادة معدل التبادل الأيوني وزيادة الهيدروجين والهيدروكسيل نتيجة دوره في تحريض وزيادة نشاط أنزيمات ATPase في الجدر الخلوية (Rossignol *et al*., 1990). ومن ثمَّ تحريض النبات على تشكل الجذور (Sharma *et al*., 1981). وقد تبيّن في تجاربنا أن استعمال IBA بتركيز 4.9 ميكرومول أعطى أفضل نسبة تجذير وصلت حتى 64 %، وهذه النتيجة لا تتفق مع نتيجة (Astarita and Santarem, 2003) إذْ وصلت نسبة التجذير إلى 98%؛ وذلك على وسط 1/2MS مضاف إليه 4.5 ميكرومول IBA.

أقلمة النباتات الناتجة عن عملية التجذير:

كانت نسبة نجاح الأقلمة 85% التي يمكن عدُّها نسبة جيدة توضّح إمكانية تطبيق البروتوكول المقدم بهذا البحث بشكل جيد ودون أي إعاقة (الأشكال 7 و8).

الشكل (7) في أثناء الأقلمة

الشكل (8) بعد نجاح الأقلمة

تعدُّ عملية الأقلمة من أكثر مراحل زراعة الأنسجة أهمية؛ وذلك بسبب حساسية النباتات الموجودة في الزجاج، ومن ثم يجب أن تجري عملية النقل بين غرفة النمو والظروف الخارجية تدريجياً لتجنيب النبات الجفاف (kozai,1991)، تتعرض بعض النباتات التي تنقل إلى البيت الزجاجي أو الحقل إلى الموت أو ضعف النمو بسبب تغيّر الشروط المحيطة بالنباتات، إذْ تنقل من رطوبة مرتفعة وإضاءة منخفضة *in vitro* إلى شروط بيئية معاكسة *ex vitro* (Preece, 2010). وبسبب مراعاة هذه الشروط في هذا البحث نجحت عملية الأقلمة بنسبة جيدة.

الاستنتاجات والمقترحات

1- أدت الزراعة على وسط MS + (1.33µM BAP + 1µM IBA+2.4µM GA3) إلى أفضل وسط للإكثار الخضري من حيث عدد النموات وطولها.

2- أدت الزراعة على وسط MS + (7.3µM IBA) إلى أفضل وسط للتجذير من حيث نسبة التجذير وعدد الجذور.

3- يوصى باستخدام هذه الطريقة تجارياً للحصول على أعداد كبيرة من هذا النبات بهدف استخلاص المواد الفعالة منه بعد زراعته مخبرياً.

4- كما يوصى بإجراء دراسة مفصلة للمكونات الكيميائية للنبات الناتجة عن الزراعة المخبرية.

REFERENCES المراجع

الرفاعي، عبدالرحيم توفيق والشويكي، سمير عبد الرازق. (1987). تقنيات القرن 21 لتحسين النبات باستخدام زراعة الأنسجة'كتاب ص 116

تريز وايفانز. (2003). علم العقاقير، المركز العربي للتعريب والترجمة والتأليف والنشر بدمشق ص 459 - 462.

حرامي، ثناء. (2005). دراسة عقاقيرية لأنواع من جنس *Hypericum* في بعض مناطق سورية.أطروحة دكتوراه، قسم علم الحياة النباتية، جامعة دمشق.

خليفة، انطون بشارة. (1998). النباتات صيدلية الطبيعة، الجزء الأول، المركز الثقافي العربي، ص 306 - 309.

Albert, Y; Foster steven. (1996). Encyclopedia of common natural ingredients, second edition, A. wily- interscience publication John wily and Sons, INC.

Astarita, L and Santarém E. (2003). Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L.and hypericin production *Porto Alegre, RS, Brasil*.

Barnes Joanne; Linda, A; Anderson,J; Philipson David. (2001). St Jones wort (*Hypericum perforatum*): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties, journal of pharmacy and pharmacology 53, London P583-600.

Bacilia, A, Coste, A, Halmagy, A, Deliu, C. (2010). Micropropagation of Hypericum maculatum an important medicinal plant Romanian Biotechnolgical Letters No. 1.

Christison, M. L. and Warnick, D. A. (1988). Organogenesis *in vitro* as a developmental process Hort.Science vol 23 (3): 115-119.

Degar, S; Price, A.M; Pascual, D. (1992). AIDS. Res. Hum.retroviruses, P1929-1939.

Fiorino, P.and Loreti, F. (1987). Propagation of fruit tree by tissue culture in Italy. HortScience, 22:353-358.

Gunther, R. T. (1993). The Greek herbal of Dioscorides, Hafner Pub. CO.

Hu, Y. C. and Wang, J. P. (1983). Meristem, shoot tip and bud cultures. In: Hand book of plant cell culture, (Eds): D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato and Y. Yamado, vol. I.Macmillan Publishing company, NY. PP. 177-227.

Hokkanen, J. Karppinen, K. Mattila, S. (2007). Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of Hypericum perforatum. Phytochemistry 68.

Hutchinson, J. F. (1984). Factors affecting shoot in organ culture of the apple. northen spy. Sci.hort.22:347-358.

Jones, O. P. and Hoopgood, M. E. (1979). The successful propagation *in vitro* of two rootstocks of prunus. J. Hort Sci 54(1): 63-66.

Kirakosyan A, Vardapetyan RR, Charchoglyan AG (2000). The content of hypericin and pseudohypericin in cell cultures of Hypericum perforatum. Russ. J. Plant Physiol. P47:270-273.

Kireeva, T. B., Sharanov, V. L., Letchamo, W. (1999). Biochemical and ecophysiological studies on Hypericum Spp, ASHSpree, Alexandria, VA, P467-468.

Kozai, T. (1991). Autotrophic Micropropagation p.313–343. In: Bajaj Biotechnology in agriculture and foresty 17:High tech and Micropropagation I Springer-Verlag, N. Y.

Mouterd Paul.(1970). Nouvlle Flore du Liban et de la Syria, Tom II Dar el-Machreq- Bayrouth. P 129 – 134.

Murashage, T and Skoog, F. (1962). A revised medium forpid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant.15, 473-497.

Nabors, M. W., Heyser, J. W., Dykes, T. A. and Demott, K. J. (1983). Long duration high frequency plant regeneration from cereal tissue culture. Planta, 157: 385-391.

.Nordstrom, A. C. and Eliasson, L. (1986). Uptake and translocation of C14-labeleb benzylamino purine inapple shoots grown *in vitro* in realation to shoot development. Physiolplantarium 68(3): 431-435.

Oluk, E and Orhan, S. (2009). Thidiazuron induced micropropagation of Hypericum triquetrifolium Turra. African Journal of Biotechnology

Preece, J. E. (2010). Acclimatization of plantlets from in vitro to the ambient environment. Wieley Online Library: Book abstract. DOI:10.1002/9780470054581. eib593.

Rossignal, M., Santoni,V., Szponaki, W and Vansuyt, G. (1990). Differential sensititivty to auxin at the plasma membrane level in Nij Kamp *et al*., (eds) 1990(g.v). .pp4983

Sharma A, Prasad R, Chaturvedi H. (1981). Clonal propagation of Boungainvillea Magnifica through shoot apex culture. Plant Cell, Tissue and Organ culture.

Todd, R. G. (1977). Martindale pharamacopoeia, the pharmaceutical press, London.