تقدير مركبات الفايسلين في مزارع الكالس ومزارع الخلايا المستمرة المغلقة والمزارع الكمية لنبات كرز الارض *Physalis angulata* L.

مثنى محمد المهداوي[1] **تلفان عناد احمد** **ضحى صباح نادر**

استاذ مساعد **استاذ مساعد**

قسم علوم الحياة- كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة ديالى

البريد الألكتروني: [1]Sadeh1970@gmail.com

المستخلص

نفذت هذه التجربة لفصل مركبات الستيرويدات (Steriods)، احد نواتج الايض الثانوي لنبات كرز الارض (*Physalis angulata* L.) من اوراق النبات عند مرحلة الازهار ومن الكالس المستحث من السيقان تحت الفلقية للبادرات المعقمة ومن الوسط الغذائي للمزرعة المستمرة المغلقة بعمر 7 أو 14 أو21 يوماً والخلايا المحصودة من المزارع الكمية، اذ اظهرت بيانات الكشف عن مستويات مركبات Physalin A و Physalin B في هذه المزارع، وجودها بدلالة قراءات كروموتوكرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC بمقارنتها مع العينات القياسية. بلغ تركيز Physalin A و Physalin B في كل من الاوراق 24.36 و34.18 مايكروغرام.مل$^{-1}$ على التوالي، وفي مزرعة الكالس بعمر 30 يوم بلغ تركيز 287.28 و 238.47 مايكروغرام.مل$^{-1}$ على التوالي، وفي عينات الوسط الغذائي السائل للمزارع المستمرة المغلقة للمراحل العمرية 7 أو 14 أو21 يوم بلغ تركيز Physalin A 97.67 أو 137.88 أو 85.79 ميكروغرام.مل$^{-1}$ على التوالي، و لـ Physalin B بلغت 103.36 أو194.19 أو40.96 مايكروغرام.مل$^{-1}$ على التوالي، وبلغ اقل تركيز لـ Physalin A و Physalin B في الخلايا المحصودة من المزارع الكمية 10.11 و 15.59 مايكروغرام.مل$^{-1}$ على التوالي. وهذه البيانات تشير الى حقيقة امكانية انتاج مركبات Physalin A و Physalin B في مزارع الانسجة كمصدر ثابت ودائم للحصول على نواتج االايض الثانوي وبديلا مناسبا عند النباتات الحقلية.

الكلمات المفتاحية: *Physalis angulata* L. نبات كرز الأرض، الكالس، الفايسلين

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثالث.

Estimation of Physalin in callus, closed continuous and batch cultures of *Physalis angulata* L.

Muthana Muhamad Al-Mahdawe[1] Talfan Anad Ahmad Dhuha Sabah Nadir
Assistant Professor Assistant Professor
[1] Department of Biology -College of Education for pure science-University of Diyala
E-mial address: [1]Sadeh1970@gmail.com

Abstract

This experiment was conducted steroids from leaves of *Physalis angulata* L. at the flowering stage and from callus derived from hypocotyle stems and from the nutrient medium for closed continuous culture at age of 7, 14, 21 days and from harvested cells of batch cultures. Using High Performance Liquid Chromatography Technique (HPLC), the data showed that these cultures were containing both Physalin A and B when compared with the standard samples. Physalin A and B constrations in leaves were 24.36 and 34.18 µg.ml^{-1} respectively and in callus culture at the age of 30 days the constrations of Physalin A and B were 287.28 and 238.47 µg.ml^{-1} respectively, while the samples of liquid medium of closed continuous cultures at the age 7, 14 and 21 days showed that Physalin A concetrations were 97.67, 137.88 and 85.79 µg.ml^{-1} respectively, whereas Physalin B constrations for the same age groups reached 103.36, 194.19 and 40.96 µg.ml^{-1} respectively. However, the lowest concetrations of Physalin A and B of the harvested cells from the batch cultures were 10.11 and 15.59 µg.ml^{-1} respectively. These data indicate that it is possible to produce Physalin A and B by using tissue cultures as a constant and continuous source for the production of secondary metabolites and considering the tissue cultures as an alternative source for the field plants.

Keywords: *Physalis angulata* L., Physalin, Callus.
This paper is a part of M. Sc. dissertation submitted by the third researcher.

المقدمـة:

ينتمي نبات كرز الأرض *Physalis angulata* L. الى العائلة الباذنجانية Solanaceae جاءت تسمية الجنس *Physalis* من الكلمة اليونانية التي تعني الاوراق الكآسية المنتفخة وجاءت تسمية النوع *angulata* من الكلمة اللاتينية والتي تعني زوايا للدلالة على شكل ساق النبات(9). للنبات اهمية طبية فضلا عن اهميته الصيدلانية لاحتوائه على العديد من مركبات الايض الثانوي المتمثلة بالقلويدات والفينولات والتانينات والاستيرويدات الصابونية. للفايسلين أهمية طبية يستخدم في علاج التهاب الكبد والربو ومشاكل المجاري البولية والروماتزم والتشنجات، ولأهمية النبات الغذائية تُأكل ثماره عند النضج لاحتوائها على الكربوهيدرات واللبيدات والعناصر المعدنية والفيتامينات (21 و6). تزايدت الحاجة خلال الآونة الاخيرة للعديد من المواد الطبية والصيدلانية والاصباغ (16)، مما استلزم استخدام تقانات الزراعة النسيجية إذ اصبحت زراعة الخلايا والانسجة

النباتية المصدر النموذجي الاسرع في انتاج المركبات الصيدلانية خارج الجسم الحي وبكميات كبيرة وبصورة مستمرة بعيدا عن التقيد بالظروف البيئية وعدم تداخلها مع مركبات اخرى ، كما يحصل عند عزلها من النبات الكامل (12). تعد المفاعلات الحيوية نظاما زراعيا ديناميكيا الغاية منه توفير بيئة مسيطر عليها لغرض نمو الخلايا وتكوين نواتج الايض الثانوي مثل المواد الصيدلانية والمضادات الحيوية واللقاحات والتحويل الحيوي للفضلات العضوية (19و23). ومن خلال ما تتميز به المفاعلات الحيوية من زيادة في سرعة انقسام الخلايا ونموها في الوسط الغذائي السائل المدعم بمنظمات النمو لذا تستخدم على نطاق واسع لزراعة الكتلة الحيوية للخلايا النباتية، لدراسة التمايز الخلوي. ودراسة تأثير السيطرة المستمرة وشبه المستمرة على الظروف الداخلية على النمو وتكوين المنتجات الثانوية. (15و 14). تهدف الدراسة الحالية الى استخلاص وكشف وتقدير مركب Physalinمن المزارع النسيجية ومزارع المعلقات الخلوية المستمرة المغلقة والخلايا المحصودة من المزارع الكمية لنبات .*Physalis angulata* L .

المواد وطرق العمل:

استحثاث الكالس وانشاء مزارع المعلقات الخلوية:

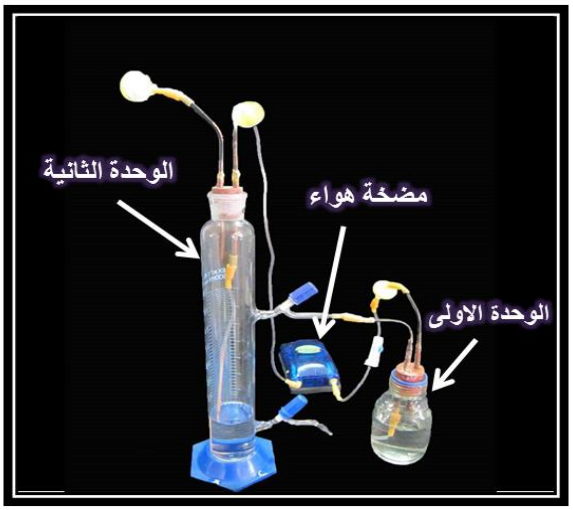
نفذت هذه التجربة في مختبر زراعة الأنسجة التابع لقسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصرفة بجامعة ديالى خلال المدة من أيلول /2016 ولغاية ايار /2017، استخدمت السيقان تحت الفلقية Hypocotyl المفصولة من بادرات معقمة بعمر 3 اسابيع وبطول 1.0 سم.قطعة$^{-1}$ كاجزاء نباتية للحصول منها على الكالس (1، 6،11).

تقدير محتوى الفايسلين Physalin في المزارع النسيجية :

تحضير العينات : قدرت مستويات الفايسلين في مستخلص الانسجة التالية:

- الكالس المستحث من السويقة تحت الفلقية للبادرات المعقمة النامي على وسط 3.0 ملغرام.لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغرام.لتر$^{-1}$ Kin بعمر 30 يوماً.
- انسجة اوراق النباتات البذرية النامية في الحقل عند مرحلة الازهار، اذ جففت العينة لمدة يومين في درجة حرارة 60 °م ومن ثم سحقت باستخدام هاون خزفي.
- الوسط الغذائي للمزارع المستمرة المغلقة Closed continuous cultures:

نميت مزارع المعلقات الخلوية بحجم 5 مل (22) في الوسط الغذائي MS المدعم بتركيز 3.0 ملغرام.لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغرام.لتر$^{-1}$ Kin بنظام المزارع المستمرة المغلقة باستخدام مفاعل حيوي (شكل:1) من تصميم مختبرنا، والذي تم تصنيعه في معمل زجاج (الخالد لصناعة وصيانة الزجاجيات – بغداد/ باب المعظم) (17).



الشكل 1: المفاعل الحيوي المستخدم في تنمية المزارع المستمرة المغلقة

- **الخلايا المحصودة من المزارع الكمية Batch cultures.**

علق 5 مل من الخلايا المترسبة في وسط MS السائل المزود بتركيز 3.0 ملغرام.لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغرام.لتر$^{-1}$ Kin في دوارق حجمها 250 مل حاوية على 50 مل من الوسط وتركت في الحاضنة الهزازة لمدة شهر دون ان يجرى لها اعادة زراعة اسبوعية، حصدت الخلايا النامية في المزرعة الكمية المغلقة بطردها مركزيا، تم التخلص من الوسط الغذائي (الراشح) واخذت الخلايا المترسبة وجففت من الوسط الغذائي على ورق ترشيح.

استخلاص وفصل الفايسلين:

اجريت عملية الاستخلاص حسب الطريقة الموصوفة من قبل(4)، مع بعض التحوير من قبل (3) إذ سحق 1.0 غرام من النسيج الطري للكالس ومن الأوراق الجافة و5 مل من الخلايا المحصودة من المزارع الكمية في النتروجين السائل وأخذ المسحوق النهائي لعينة الكالس وعينة الأوراق الجافة والخلايا المحصودة و3 عينات بحجم 40 مل من الوسط الغذائي السائل، وأُستخلصت كل عينة بالرج باستخدام صفيحة هزازة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة في 20 مل من ميثانول مخفف بالماء المقطر بنسبة 75:25 (حجم:حجم)، رشح المستخلص من خلال طبقة من ورق الترشيح (Whatman No.1) لفصل المستخلص من بقايا العينة، أُعيد استخلاص الراسب مرتين في 20 مل من الميثانول لكل مرة لمدة 4 ساعات لكل مرة، ثم جمعت الرواشح مع بعضها ونقلت المستخلصات إلى قمع فصل حجم 250 مل وفصلت باستخدام 60 مل من الهكسان Hexane لمدة 5 دقائق، أُهمل الهكسان ثم تم إستخلاص مستخلص الميثانول بإضافة 60 مل من الكلوروفورم، أُخذ مستخلص الكلوروفورم وركز إلى مسحوق جاف باستخدام تيار من النتروجين السائل. تم وزن 10 ملغرام من

المسحوق وأُذيب في 1 مل من الميثانول، ثم رشح المستخلص باستخدام مرشحات حجم 25 مايكرومول قبل حقن العينات في وحدة الحقن لجهاز HPLC.

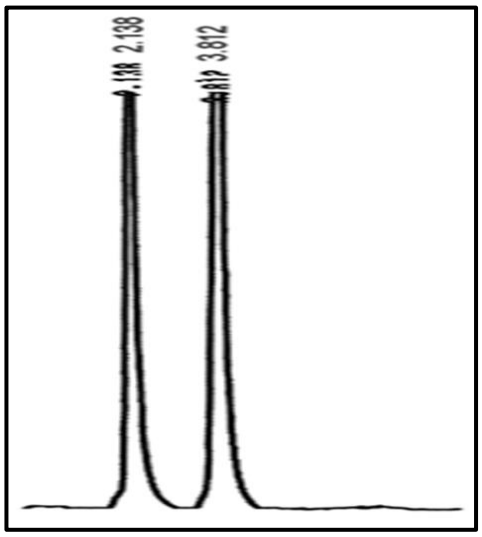
التشخيص والتقدير الكمي للفايسلين باستخدام تقنية كروماتوغرافي السائل العالي الكفاءة HPLC:

اجريت عملية الفصل والتشخيص لمركب الفايسلين المستخلصة من العينات المنتخبة باستعمال جهاز كروماتوغرافي السائل ذي الاداء العالي HPLC نوع Shimadzu 10 AV-LC-Japan المزود بمضختين ترددية نوع LC-10A shimadzu باستخدام عمود فصل column معدني ذي المواصفات الاتية: الطور الثابت C18-DB وطول عمود 50ملم و القطر الداخلي للعمود 4.6 ملم وقطر حبيبات الحشوة 3 مايكرومتر (17).

واجريت عملية التشخيص وفق الظروف المحددة للمركب (3).

نفذت عملية تشخيص الفايسلين في مختبرات وزارة العلوم والتكنولوجيا ،اعتمادا على زمن الاحتباس Retrention time للعينة القياسية (شكل 2)، وقدرتركيز المادة حسب المعادلة التالية:

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



الشكل 2: منحنيات الفايسلين A وB للعينة القياسية

النتائج والمناقشة:

التشخيص والتقدير الكمي لمركب الفايسلين بواسطة HPLC:

التشخيص والتقدير الكمي Physalin A:

اوضحت المنحنيات المسجلة من حقن العينات المختلفة في كروموتوغرافيا السائل العالي الاداء **(HPLC)** احتوائها ستيرويد Physalin بدلالة زمن الاحتباس البالغة 2.13 دقيقة المسجل لكل منها مع زمن احتباس العينة القياسية البالغة 101774 للفايسلين وعلى النحو الاتي:

- **اوراق النباتات البذرية:**

اوضحت المنحنيات المسجلة بواسطة HPLC عن احتواء مستخلص عينة الاوراق على Phyaslin A اعتمادا على قيم زمن الاحتباس (Retention time) والبالغة 2.15 دقيقة المقاربة مع قيم زمن احتباس عينة الفايسلين القياسية البالغة 2.13 دقيقة (جدول:2) واشارت نتائج التحليل الى اختلافات واضحة في نسبة مساحة منحني فايسلين القياسي مع نسب مساحة المنحنيات المسجلة Physalin A المعزول من عينة النباتات البذرية (شكل:A3) اذ بلغت قيم وجوده في اوراق النباتات البذرية 24.36 مايكروغرام.مل$^{-1}$.

- **مزرعة الكالس:**

اظهرت نتائج التشخيص بواسطة HPLC وجود Physalin A في مستخلص مزرعة الكالس بعمر 30 يوما المشتق من السويقة تحت الفلقية بدلالة زمن الاحتباس للفايسلين A المعزول منها (جدول:2) فقد سجل الكالس المستحث بعمر 30 يوما ارتفاعا ملحوظا (شكل:B3) عن النسبة المئوية لمساحة منحني العينة القياسية. مسجلا وجوده قيمة بلغت 287.28 مايكروغرام.مل$^{-1}$.

- **المزارع المستمرة المغلقة:**

اظهرت نتائج التشخيص بواسطة HPLC وجود Physalin A في المزارع المستمرة المغلقة بعمر 7، 14، 21 يوم بدلالة زمن الاحتباس للفايسلين A المعزول منها والبالغ 2.14، 2.10، 2.16 دقيقة بالمقارنة بزمن احتباس العينة القياسية (جدول:1) فقد سجل الوسط الغذائي بعمر 7 ايام ارتفاعا ملحوظا (شكل:C3) في قيمة وجود مركب فايسلين A المفروز الى الوسط اذ بلغت قيمته 79.67 مايكروغرام.مل$^{-1}$، وازدادت قيم تواجد مركب الفايسلين A في الوسط الغذائي عند عمر 14 يوم من زراعة خلايا المعلق الخلوي في المفاعل الحيوي اذ سجلت قيم بلغت 137.88 مايكروغرام.مل$^{-1}$ (شكل:D3). ثم بدأت هذه القيم بالانخفاض مسجلة قيمة بلغت 85.79 مايكروغرام.مل$^{-1}$ في الوسط الغذائي بعد 21 يوما من عمر المزرعة (شكل:3 E).

- **الخلايا المحصودة من المزارع الكمية:**

اوضحت المنحنيات المسجلة بواسطة HPLC عن احتواء مستخلص عينات الخلايا المحصودة من المزارع الكمية على Physalin A اعتمادا على زمن الاحتباس والبالغة 2.15 دقيقة مقارنة مع قيم زمن احتباس عينة Physalin القياسية (جدول:1). وكشفت النتائج عن انخفاض واضح في مساحة المنحنيات المسجلة Physalin A المعزول من عينات المزارع الكمية (شكل:F3) بالمقارنة مع مساحة منحنى العينة القياسية الامر الذي انعكس على نسب تواجد المركب والبالغة قيم تواجده 10.11 مايكروغرام.مل$^{-1}$.

جدول 1: قيم زمن احتباس Physalin A المعزول ونسب وجوده في اوراق نبات *P. angulata* البذرية ومزرعة الكالس والوسط الغذائي لمزارع المعلقات الخلوية المستمرة باعمارها المختلفة والخلايا المحصودة من المزارع الكمية.

مصدر الفايسلين		عدد مرات التخفيف	زمن الاحتباس (دقيقة)	مساحة المنحني	وجود الفايسلين (مايكروغرام.مل$^{-1}$)
اوراق النباتات البذرية		2	2.15	49588	24.36
الكالس المستحث من السيقان تحت الفلقية بعمر 30 يوما		10	2.15	116951	287.28
الوسط الغذائي السائل المأخوذ من المزارع المستمرة المغلقة	7 يوم	8	2.14	49706	79.67
	14 يوم	8	2.10	70168	137.88
	21 يوم	10	2.16	34927	85.79
الخلايا المحصودة من المزارع الكمية		1	2.15	41178	10.11

التشخيص والتقدير الكمي Physalin B:

اوضحت المنحنيات المسجلة من حقن العينات المختلفة في كروموتوغرافيا السائل العالي الاداء (HPLC) احتوائها ستيرويد Physalin بدلالة زمن احتباس البالغة 3.18 دقيقة المسجل لكل منها مع زمن احتباس العينة القياسية البالغة 132230 للفايسلين وعلى النحو الاتي:

- **اوراق النباتات البذرية:**

اوضحت المنحنيات المسجلة بواسطة HPLC عن احتواء مستخلص عينات الاوراق على Phyaslin B اعتمادا على قيم زمن الاحتباس (Retention time) والبالغة 3.81 دقيقة مقارنة مع قيم زمن احتباس عينة الفايسلين القياسية البالغة 3.81 (جدول2) واشارت نتائج التحليل الى اختلافات واضحة في نسبة مساحة منحني فايسلين القياسي مع نسب مساحة المنحنيات المسجلة Physalin B المعزول من عينات النباتات البذرية (شكل: A3) اذ بلغت قيم وجوده في اوراق النباتات البذرية 34.18 مايكروغرام.مل$^{-1}$.

- **مزرعة الكالس:**

اظهرت نتائج التشخيص بواسطة HPLC وجود Physalin B في مستخلص مزرعة الكالس بعمر 30 يوما المشتق من السويقة تحت الفلقية بدلالة زمن الاحتباس للفايسلين B المعزول منها (جدول2) فقد سجل الكالس المستحث بعمر 30 يوما ارتفاعا ملحوظا (شكل: B3) عن النسبة المئوية لمساحة منحني العينة القياسية مسجلا وجوده قيمة بلغت 238.47 مايكروغرام.مل$^{-1}$.

- **المزارع المستمرة المغلقة:**

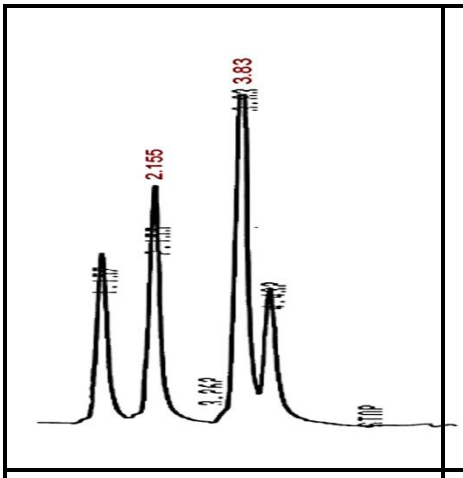
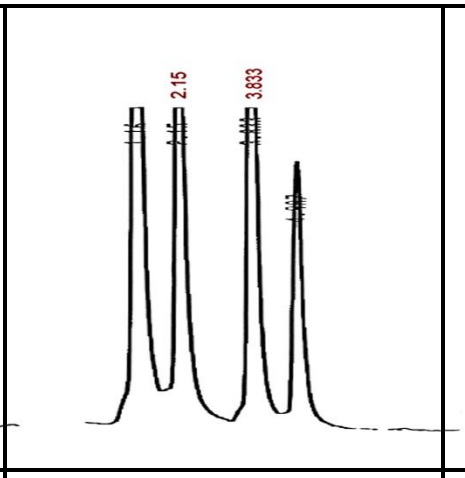
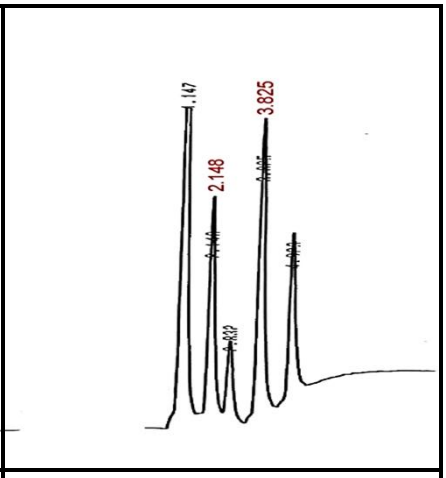
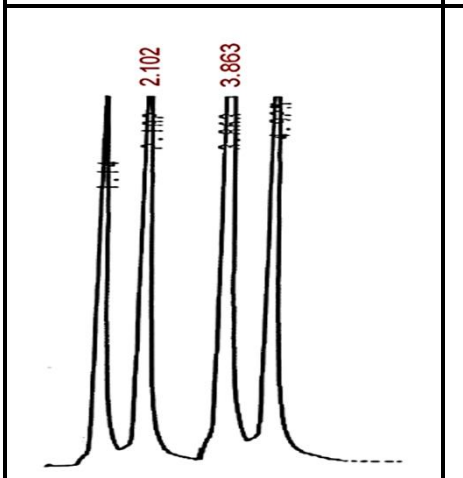
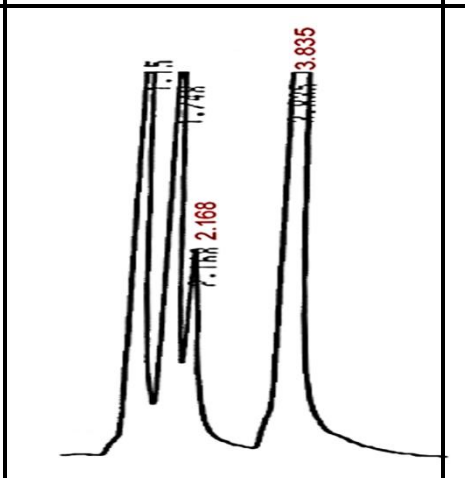
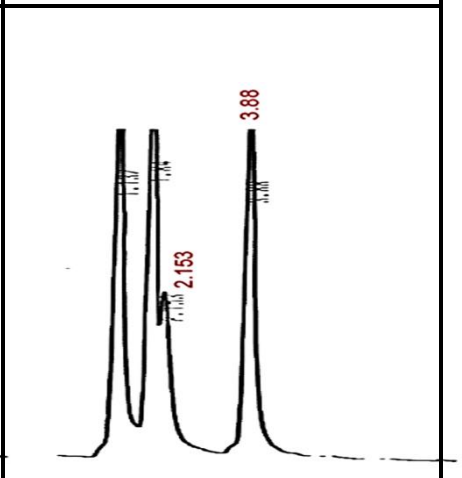
اظهرت نتائج التشخيص بواسطة HPLC وجود Physalin B في المزارع المستمرة المغلقة بعمر 7، 14، 21 يوم بدلالة زمن الاحتباس للفايسلين B المعزول منها والبالغ 3.82 ، 3.86 ، 3.83 دقيقة بالمقارنة بزمن احتباس العينة القياسية (جدول2) فقد سجل الوسط الغذائي بعمر 7 ايام ارتفاعا ملحوظا (شكل: C3) في قيمة وجود فايسلين B المفروز الى الوسط اذ بلغت قيمته 103.36 مايكروغرام.مل$^{-1}$، وازدادت قيم تواجد مركب الفايسلين B في الوسط الغذائي عند عمر 14 يوم من زراعة خلايا المعلق الخلوي في المفاعل الحيوي اذ سجلت قيم بلغت 194.19 مايكروغرام.مل$^{-1}$ (شكل:D3). ثم بدأت هذه القيم بالانخفاض مسجلة قيمة بلغت 40.96 مايكروغرام.مل$^{-1}$ في الوسط الغذائي بعد 21 يوما من عمر المزرعة (شكل:E3).

- **الخلايا المحصودة من المزارع الكمية:**

اوضحت المنحنيات المسجلة بواسطة HPLC عن احتواء مستخلص عينات الخلايا المحصودة من المزارع الكمية على Physalin B اعتمادا على قيمة زمن الاحتباس والبالغة 3.81 دقيقة مقارنة مع قيم زمن احتباس عينة Physalin القياسية (جدول2). وكشفت النتائج عن انخفاض واضح في مساحة المنحنيات المسجلة Physalin B المعزول من عينات المزارع الكمية (شكل: F3) بالمقارنة مع مساحة منحنى العينة القياسية الامر الذي انعكس على نسب تواجد المركب والبالغة قيم تواجده 15.49 مايكروغرام.مل$^{-1}$.

جدول 2: قيم زمن احتباس Physalin B المعزول ونسب وجوده في اوراق نبات *P. angulata* البذرية ومزرعة الكالس والوسط الغذائي لمزارع المعلقات الخلوية المستمرة باعمارها المختلفة والخلايا المحصودة من المزارع الكمية.

مصدر الفايسلين		عدد مرات التخفيف	زمن الاحتباس (دقيقة)	مساحة المنحني	وجود الفايسلين (مايكرو غرام.مل$^{-1}$)
اوراق النباتات البذرية		2	3.83	83510	34.18
الكالس المستحث من السيقان تحت الفلقية بعمر 30 يوما		10	3.83	116506	238.47
الوسط الغذائي السائل المأخوذ من المزارع المستمرة المغلقة	7 يوم	8	3.82	63123	103.36
	14 يوم	8	3.86	118594	194.19
	21 يوم	10	3.83	200123	40.96
الخلايا المحصودة من المزارع الكمية		1	3.88	75712	15.49

		
(A): منحنيات فايسلين A وفايسلين B المعزول من اوراق النبات في مرحلة البلوغ.	**(B): منحنيات فايسلين A وفايسلين B المعزول من كالس السيقان تحت الفلقية بعمر 30 يوما.**	**(C): منحنيات فايسلين A وفايسلين B المعزول من الوسط الغذائي السائل للمزارع المستمرة المغلقة بعمر 7 يوم.**
		
(D): منحنيات فايسلين A وفايسلين B المعزول من الوسط الغذائي السائل للمزارع المستمرة المغلقة بعمر 14 يوم.	**(E): منحنيات فايسلين A وفايسلين B المعزول من الوسط الغذائي السائل للمزارع المستمرة المغلقة بعمر 21 يوم.**	**(F): منحنيات فايسلين A وفايسلين B المعزول من الخلايا المحصودة للمزارع الكمية.**

شكل 3: منحنيات فايسلين A وفايسلين B المعزولة من المزارع النسيجية المختلفة لنبات *Physalis angulata* بواسطة تقنية HPLC.

اشارت النتائج السابقة الى وجود مركب Physalin A و Physalin B في مزرعة الكالس بعمر 30 يوما إذ بلغت 287.28 و238.47 مايكروغرام.مل$^{-1}$ لفايسلين A وفايسلين B على التوالي بالمقارنة بمحتوى الاوراق من المركبين والتي بلغت 24.36 و34.18 مايكروغرام.مل$^{-1}$ لفايسلين A وفايسلين B على التوالي. هذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه (10) من تشخيص وتقدير فايسلين A وفايسلين B في عينات الكالس

المشتق من السيقان تحت الفلقية لنبات *Physalis angulata* بالمراحل العمرية 30 أو 45 أو 60 يوماً، حيث أشار إلى ان نسبة تواجد المركبين ولجميع المراحل العمرية للكالس قد سجلت قيم اعلى من نسب تواجد المركبين في الأوراق للنباتات الطبيعية عند مرحلة الازهار. وقد يعزى السبب الى الدور الذي تؤديه تركيز الاوكسين المضاف للسايتوكاينين في تنظيم نمو وتطور مزارع الانسجة والاعضاء النباتية بالإضافة الى انتاج الكتلة الحيوية بمقدار مرتين (8). واشار (18) ان للتداخل دور في ايض حامض الميفالونيك (MVA) الضروري للتخليق الحيوي للمركبات الستيرويدية بالاضافة الى الدور الكبير لـ 2,4-D في تكوين المركبات الستيرويدية.

استخدمت مزارع المعلقات الخلوية كنظام انموذجي لانتاج المركبات الستيرويدية في العديد من نباتات العائلة الباذنجانية (13). وبينت النتائج ان انتاج مركب فايسلين A وفايسلين B في المزارع المستمرة المغلقة للمفاعل الحيوي أعلى من المزارع الكمية وأقل من مزرعة الكالس اذ بلغت أعلى قيمة في عمر 14 يوم في المزرعة المستمرة المغلقة لفايسلين A التي سجلت 137.88 مايكروغرام.مل$^{-1}$ ولفايسلين B البالغ 194.19 مايكروغرام.مل$^{-1}$، وان تواجد المركبين وبجميع المراحل العمرية للمزرعة المستمرة المغلقة قد سجلت قيم أعلى من تواجد المركبين في اوراق النباتات الناضجة والمزارع الكمية (الخلايا المحصودة).

فقد اشار (2) ان نمو الخلايا يحصل في المزارع النسيجية عند توفر مستلزمات الانقسام والنمو لها من مغذيات ومنظمات نمو واية اضافات اخرى والتي تؤثر جميعا على الفعاليات الايضية داخل الخلايا، ولتحقيق انتاجية مثلى من مركبات الايض الثانوي، يفضل انتاج الخلايا في وسط يكون الامثل في زيادة الكتلة الحيوية (2). ان الوسط المثالي لتحفيز استحثاث الكالس والمستخدم في انشاء مزارع خلوية نموذجية، كان مناسباً ايضا في انتاج المركبات الثانوية، ولعل هذا يعود الى نوع منظمات النمو النباتية الاوكسين والسايتوكاينين المستخدم وتراكيزهما، ودورهما في انتاج مركبات الايض الثانوية من المزارع النسيجية. كما تؤدي كثافة الخلايا (عدد الخلايا في السنتيمتر المكعب الواحد) دورا كعامل محدد حرج لنمو مزرعة المعلق الخلوي فضلا عن التأثير الكبير على انتاج مركبات الايض الثانوية، وتعتمد الكثافة الحرجة على نوع الخط الخلوي ومكونات وسط النمو ويلاحظ ان الخلايا لا تنمو عندما تكون كثافتها قليلة او قد تستغرق وقتا طويلا لبدأ الانقسام في مرحلة التلكؤ Lag phase. كما ان استخدام الكثافة الحرجة العالية قد يؤدي الى حذف طور التلكؤ، وبالتالي يصبح معدل النمو الابتدائي مساوي لأقصى معدل سرعة نمو وبالتالي الحصول على اعلى تحفيز لتخليق مركبات الايض الثانوي نتيجة لتأثير الانزيمات المسؤولة عن التخليق الحيوي لهذه المركبات (7).

ان تحديد الكثافة الملائمة لنمو مزارع المعلقات الخلوية واستخدامها في المزارع المستمرة المغلقة واستبدال الوسط الغذائي القديم الخارج (out flow) بوسط جديد والسماح للخلايا بالركود قبل استبدال الوسط، الامر الذي ادى الى الزيادة المستمرة في الكتلة الحيوية في نظام المزارع المستمرة المغلقة المستخدمة، كل هذه العوامل مجتمعة كان لها دور اساسي في زيادة انتاج مركب فايسلين A وفايسلين B. ان انخفاض مركب فايسلين A

وفايسلين B في الخلايا المحصودة من المزارع الكمية للمعلقات الخلوية بالنظام المغلق قد يعزى الى تزامن انقسام الخلايا ونموها مع زيادة الكتلة الحية Biomass والتي تأخذ منحنى النمو الثابت مارة بفترة الفتور ثم مرحلة النمو الاسي ثم مرحلة النمو الخطي وصولا الى مرحلة الفتور المستمر الذي تتوقف الخلايا فيه عن النمو والانقسام (20). اذ تؤدي الظروف البيئية مثل نقص المواد الغذائي او قلة تجهيز الاوكسجين او تراكم الاثلين او نفاذ منظمات النمو المضافة او التغيرات في العوامل الفيزيائية والكيميائية وغيرها (2)، دورا مهما كعوامل محددة في نمو المزارع الخلوية. وتمتاز هذه المزارع بتحول لونها الى اللون البني نتيجة لازدياد المواد الفينولية وبالتالي افراز المركبات الايضية الثانوية من الخلايا الى الوسط الغذائي السائل كرد فعل للظروف غير الملائمة في المزرعة (11). فضلا عن قابلية الخلايا على افراز مركب فايسلين A وفايسلين B الى الوسط والذي اشارت اليه نتائج تحليل الوسط الغذائي للمزارع المستمرة.

الاستنتاج:

أشارت الدراسة إلى امكانية توظيف المفاعل الحيوي في إنتاج مركب الفايسلين A والفايسلين B من الخلايا النامية في المزارع الخلوية المستمرة المغلقة.

Reference:

1. **Al-Mahdawe, M. M.; Ahmad, T. A.; Nadir, Dh. S. (2017)** Effected of different cell suspension culture densities of *Physalis angulata* L. by using plating or embedding methods on the callus formation. Accepted for publication in the *Journal of Biotechnology Research center*.
2. **Al-Sumaidai, K. M. I. (2017)** Plant technological application, Vol. 1, Ministry of Higher Education and Scientific Research
3. **Azlan, G.J.; Marziah, M.; Radzali, M. and Johari, R. (2002)** Establishment of *Physalis minima* hairy roots culture for the production of physalins. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 69: 271-278.
4. **Chiang, H. C. Jaw, S. M. and Chen, P. M. (1992)** In hibitory effects of Physalin B and Physalin F on various human Leukemia cells *in vitro*. *Anticancer Research*, 12:1155-1162.
5. **Dixon, R.A.(1985)** Plant Cell Cultures. A Practical Approach. IRL Press, Oxford,UK.
6. **Elisalva, G.; Milena, L.; Luana, S.; Ivon, R.; Therezinha, C.; Ricardo, S.; Washington, S. and Milena, S. (2009)** Activity of physalin purified from *Physalis angulata* in *in-vitro* and *in vivo* models of Cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64:84-87.
7. **Find, N.; kristensen, M. H.; Nergard, N. and Krogstrup, P. (1998)** Effect of culture period and cell density on regrowth following cryopreservation

of embryogenic suspension culture of Norway spruse and Sitlka spruse. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53:26-33.

8. **Gaspar, T.; Kevers, C.; Penel, C.; Greppin, H.; Reid, D. M. and Thorpe, T. A. (1996)** Review plant hormones and plant growth regulation in plant tissue culture. *In Vitro Cell and Development Biology-Plant* ,32: 272-289.
9. **Hall, D. W.; Vandiver, V. V. and Sellers, B. A. (2003)** Cut Leaf Groun Cherry (*Physalis angulata* L.), Florida Cooperative axtension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences Univ. of Florida.
10. **Hatam, S. M. (2016)** Callus induction and the medical plant formation of *Physalis angulata* L. and the detection of Physalin in the callus and its differentiatedplants. M. Sc. Dissertation, College of Education for pure Sciences, University of Diyala
11. **Kanokwaree, K. and Doran, P. M.(1997)** Effect of inoculum size on growth of *Atropa belladonna* hairy roots in shake flask. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84:378-381.
12. **Karuppusamy, S.(2009)** Areview on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue , organ and cell cultures. *Journal Medical plant Research*, 3: 1222-1239.
13. **Kittipongatana, N.; Hock, R. S. and Porter, J.R. (1998)** Production of solasadine by hairy root, callus, and suspension culture of *Solanum aviculare*. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*. 52:133-143.
14. **Lipksy, A. K. H. (1992)** Problems of optimization of plant cell culture Process. *Journal of Biotechnology*, 26:83-87.
15. **Michael, M.O. ; Bapat V.A. and Schieder O. (1982)** Protoplast culture of three legumes: *Arachis hypogaca*, *Melilotus officinalis*, and *Trifolium resupinatum*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiol,* 106: 173-177.
16. **Mulabagal, V. and Tsay ,H. S. (2004)** Plant cell cultures – an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International *Journal of Applied Science and Engineering*, 2: 29-48.
17. **Nadir, Dh. S. (2017)** Initiation of cell suspension cultures and detection of Physalin in *Physalis angulata* L. M. Sc. Thesis submitted to the College of Education for pure science Diyala university, Diyala, Iraq. Pp 98.
18. **Nishi, A. and Tsuritani, I. (1983)** Effect of auxin on the metabolism of mevalonic acid in suspension culture carrot cells. *Phytochemistry*, 22:399-401.
19. **Payne, G.; Bringi, V.; Prince, C. and Shulter, M. (1991)** Plant Cell and tissue culture in Liquid systems, 197-205.

20. **Ramawat, K. G. (2008)** Plant Biotechnology. S. Chand and Company Ltd. third edition, New Delhi, India.
21. **Silva, M.T.; Simas, S.M. ; Batista, T.G. ; Cardarelli, P. and Tomassini, T.C. (2005)** Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memordum Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 100(7): 779-782.
22. **Sultana, R. S. and Rahman, M.(2012)** Cell structure and morphogenesis of embryonic aggregates in suspension culture of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *International Journal of Bioscience*, 2(3):97-105**.**
23. **Wang, S. J. and Zhong, J. J. (2007)** Bioprocessing for value-added products from renewable resources Amsterdam: *Elsevier*. 131-161.