مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (40) العدد (3) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (40) No. (3) 2018

Effect of some growth regulators on the Micropropagation of *Hypericum perforatum*

Dr. Hussin Al-athba*

(Received 21 / 1 / 2018. Accepted 27 / 5 /2018)

□ ABSTRACT □

detailed in vitro multiplication system for rapid micropropagataion of the *Hypericum perforatum* L, has been developed by using tissue culture technique . The shoots (1-0.5cm) were cultured on MS (Murashige and Skoog 1962) then placed onto based medium containing a combination of growth regulators at different concentrations (BA , Kin , IBA) . After that they were placed into MS based medium containing NAA and IBA.

Results showed that the highest number of growth was 39.6 when (0.6 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA) were adding (MS3), also the highest of the growth was (3,81cm) in medium MS3 .The observed rooting was (7.1roots , 10,5 cm) length and %95 in percentage of rooting) in R5 (MS+1mg/l NAA) , and acclimatization was 85%

Key word: *Hypericum perforatum* , Tissue culture , Micropropagation, Growth regulators.

* **Assistant professor , Botany Department ,Faculty of science, Damascus University , Syria**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (40) العدد (3) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (40) No. (3) 2018

دراسة تأثير بعض منظمات النمو في الإكثار الدقيق لنبات العرن المثقب *Hypericum perforatum*

د. حسين العذبة *

(تاريخ الإيداع 21 / 1 / 2018. قبل للنشر في 27 / 5 / 2018)

□ ملخّص □

تم تطوير تقنية لإكثار نبات *Hypericum perforatum* في المختبر بإستعمال تقنية زراعة النسج النباتية من خلال عقل بطول (0.5 –1) سم والتي زرعت على وسط (Murashige and Skoog ,1962) (MS)وبعد ذلك تم إكثارها على وسط MS المضاف إليه منظمات نمو مختلفة (البنزيل أدنينBA ،الكينتين Kin وإندول بيوتريك أسيد IBA (حمض الزبدة)) . أوضحت النتائج أن أكبر نسبة لمتوسط النموات المتشكلة كانت 39.6 في المعاملة MS3 التي تحتويIBA (0.1 mg/l) + BA (0.6 mg/l) وكان أكبر طول للنموات أيضاً على المعاملة MS3 حيث بلغ أكبر طول للنموات 3.81 سم . تمت بعد ذلك عملية التجذير على أوساط MS المضاف إليها IBA أو NAA (نافتيل حمض الخل) و كانت المعاملة R5 التي تحتوي على NAA (1 mg/L) هي الفضلى حيث بلغت نسبة التجذير 95% و متوسط عدد الجذور 7.1 سم ، ومتوسط طولها 10.5 سم . بلغت نسبة الأقلمة 85% من عدد النموات التي أمكن الحصول عليها.

الكلمات المفتاحية : العرن المثقب ، زراعة النسج ، الإكثار الدقيق ، منظمات النمو

* مدرس – قسم علم الحياة النباتية ، كلية العلوم ، جامعة دمشق، سورية

مقدمة :

يضم جنس العرن *Hypericum* 360 نوعاً ، ينبت منها في سورية 21 نوعاً (Mouterd 1970) ، ينتمي إلى شعبة Magnoliophyta صف Magnoliopsida فصيلة Guttifera ، وهو نبات عشبي أو على هيئة جنبات يتراوح ارتفاعه بين 50 – 100سم، أوراقه متقابلة لاطئة ويلاحظ على حافة الأوراق على الغالب نقاط شفافة، أزهاره متجمعة في نورات محدودة إنتهائية على هيئة عناقيد خنثوية والثمرة عنبية. أما مرحلة إزهاره فهي تمتد لمعظم الأنواع بين شهري أيار وتموز ، والإثمار بين شهري آب وأيلول ، ويعد هذا النبات أحد النباتات الطبية لأنه يحتوي على مركبات كيميائية تستخدم في الصناعات الدوائية ، وتتمثل في تسع مجموعات هي الفلافونوئيدات ، الفلوروغلوسينولات ، النافتودي انترونات ، الألكانات، التانينات ، الكسانتونات ، الفينيل بروبان ، الزيت الأساسي وحموض أمينية .....ألخ ، (Todd , R.E 1977) .

يعرف النوع ***Hypericum perforatum*** بعدة أسماء منها حشيشة القلب وبقلة يوحنا ، العرن المثقب (تريز وايفانز 2003) العرن ، الروحن ، الإدرار وحشيشة جونسون ، وهو من النباتات العشبية التي درست في السنوات الثلاثين الماضية لاختبارات سريرية ومخبرية مكثفة صنف من خلالها بأنه أحد أهم الأعشاب الطبية المستخدمة في أوروبا والولايات المتحدة الأمريكية لمعالجة أمراض كثيرة (خليفة 1998) لذلك صنف في أمريكا عام 1999 بالدرجة الثانية بعد نبات الجنكو *Genko* كأفضل نبات عشبي منتج في الأسواق (تريز وإيفاز 2003) ويحتوي على مواد فعالة منها الهيبريسين Hypricine والهيبرين Hyprine ، وبعض المركبات الفلافونية ومواد عفصية وراتنجية وزيت طيار وصابونين وكاروتين وفيتامين C .وقد استخدم هذا النبات في القديم كمادة مضادة للإسهال وفي علاج الأمراض الجلدية وتخفيف الحمى وقطع النزيف ومعالجة لسعات الأفاعي ، وكذلك استخدم لزيادة النشاط ورفع ضغط الدم (Gunther 1993) واستخدم أيضاً من قبل الكثير من شعوب العالم القديم لمعالجة الديدان وبعض الطفيليات (Kirreava *et al* , 1999) وفي معالجة الحلأ البسيط (Allest *et al* , 1996) .أ ما 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) ، يمثل استخدامه في ألمانيا 25% من إجمالي وصفات مضادات الاكتئاب. كما أن له استخدامات في الصباغة، وصناعة مستحضرات التجميل ضمن المراهم أو بالتغذية أو يضاف إلى المشروبات الكحولية .

ركزت 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 إ ذ 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* و الحصول على نموات جديدة وإنتاج الهيبرسين .وكان وسط الإكثار الأفضل باستخدام BA (بنزيل أدينين) بتركيز 4.5 مغ/ل وNAA (نافتيل حمض الخل) 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 ، إذ قام Oluk and Orhan (2009) بتحفيز الإكثار الدقيق لـ *Hypericum triquatrifolium* عن طريق إضافة TDZ (Thidiazuron) وقد كانت أفضل معاملات الإكثارعلى الوسط MS مضافاً إليه (TDZ) بتركيز 1.25 مغ/ل . ودرس Bacila *et al.* (2010) الإكثار الخضري الدقيق عند *Hypericum maculatum* وتحقّق أعلى معدل إكثار باستخدام الوسط MS مع الكينيتين Kin وTDZ و NAA بتركيز 0.5 مغ/ل لكل منهم . وحصل بهذا الوسط على 89 نمواً بدءاً من نمو واحد . أ ما وسط التجذير الأفضل فكانMS 1/2 مضافاً إليه IAA (إندول حمض الخل) بتركيز 1 مغ/ل .

أهمية البحث وأهدافه :

إن الأهمية الطبية التي ميزت هذا النبات والمساحات المحددة لإنتشاره وصعوبة الحصول عليه ، كان الهدف بإيجاد طريقة سهلة وسريعة للحصول على أعداد كبيرة وبتكاليف زهيدة من خلال تقانة زراعة النسج النباتية.

طرائق البحث و مواده :

تم تنفيذ هذا البحث في مخبر زراعة النسج النباتية بكلية العلوم – قسم علم الحياة النباتية – جامعة دمشق ، خلال الأعوام 2016–2017 حيث استخدمت عقلات من النبات بطول 0.5–1 سم حاوية على القمم النامية والبراعم الجانبية .

مراحل تنفيذ البحث :

1- تحضير الأجزاء النباتية وتعقيمها :

استخدمت الأوعية الزجاجية لجمع الأجزاء النباتية بعد غسلها مدة ساعة تحت الماء الجاري ثم عقمت بالمبيد الفطري أكوبسين 0.5% مدة 15 دقيقة وغسلت ثلاث مرات بالماء المعقم قبل أن تخضع للتعقيم السطحي تحت جهاز العزل الجرثومي حسب المعاملات الموضحة بالجدول 1.وقد أضيف محلول Tween 20 وبمعدل قطرة واحدة لكل 100 مل من محلول التعقيم من أجل خفض التوتر السطحي وزيادة تماس الأجزاء النباتية مع مادة التعقيم، وبعد ذلك خضعت الأجزاء النباتية للغسيل ثلاث مرات باستخدام الماء المقطر المعقم ولمدة خمس دقائق في كل مرة للتخلص من آثار

المادة المعقمة . ثم زرعت الأجزاء النباتية المعقمة بأنابيب اختبار على وسط الزراعة التأسيسية MS الخالي من منظمات النمو مدة أسبوعين حيث استبعدت خلالهما الأنابيب الملوثة (الشكل 1).

نبات ***Hypericum perforatum***

الشكل 1 - الزراعة التأسيسية

2- الأجزاء النباتية الخالية من الملوثات :

أخذت النموات الخضرية المتشكلة والخالية من الملوثات بعد أسبوعين وزرعت على عدة معاملات للإكثار (أوساط غذائية مدعمة بمنظمات النمو المختلفة) ، موضحة بالجدول 2 والشكلان 2 و3.

الجدول 1 – معاملات التعقيم المستعملة في مرحلة الزراعات الأولية

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

الجدول 2 – تأثير التوافقات من BA و Kin بوجود IBA في إكثار نبات *Hypericum perforatum* مخبرياً *in vitro*

رقم المعاملة /منظم النمو	BA ملغ/ ل	Kin ملغ/ ل	IBA ملغ/ ل
MS0	0	0	0
MS1	0.1		0.1
MS2	0.3		0.1
MS3	0.6		0.1
MS4	1		0.1
MS5		0.1	0.1
MS6		0.3	0.1
MS7		0.6	0.1
MS8		1	0.1

نفذت الزراعة بأوعية زجاجية وبمعدل 30 مكرراً / معاملة بإضافة 30 مل من الوسط المغذي إلى الوعاء ، تم بعدها حضنت الزراعات في غرفة النمو growth room بدرجة حرارة 24 ± 1 وبإتباع نظام الإضاءة التعاقبي (8 / 16) في أثناء النمو بشدة ضوئية 2000– 3000 لوكس .

3 – تجذير النموات الخضرية :

أخذت النموات الخضرية المتشكلة في مرحلة الإكثار السابقة بطول 4 – 5 سم وزرعت على أوساط غذائية أضيف إليها تراكيز هرمونية متنوعة من IBA موضحة بالجدول 3 .

الجدول 3 – تأثير تراكيز مختلفة من الأوكسينات في تجذير نبات *Hypericum perforatum* مخبرياً *in vitro*

رمز الوسط	الوسط MS + منظمات النمو	
	IBA ملغ/ ل	NAA ملغ/ ل
R1	0.5	0
R2	1	0
R3	2	0
R4	0	0.5
R5	0	1
R6	0	2
MS	0	0

أجريت عملية الزراعة بأوعية زجاجية وبمعدل 25 مكرراً / معاملة وإضافة 30 مل لكل وعاء من الوسط المغذي ، وبعد 15 يوماً نقلت الزراعات إلى وسط MS خال من الهرمونات وحضنت بإضاءة 16 ساعة و 8 ساعات ظلام حيث أخذت النتائج بعد أربعة أسابيع من الزراعة بالنسبة لعدد الجذور وطولها ونسبة التجذير

4 – تقسية النباتات :

أخذت النباتات من وسط الزراعة وغسلت جذورها بشكل جيد بالماء لتجنب تكاثر الفطريات والجراثيم التي تؤثر في نمو الجذور والنبات ، زرعت بعدها النباتات في أصص بلاستيكية نظيفة تحوي خليطاً معقماً من التورب والبرليت بنسبة 1/2(حجم /حجم) وغطيت بأكياس بلاستيكية شفافة للمحافظة على الرطوبة المناسبة العالية ، وحضنت بظروف غرفة النمو في درجة حرارة 24 ± 1 نهاراً و 16±1 م ليلاً ، وشدة إضاءة 2000 – 3000 لوكس ، ورطوبة 70% ، ولمدة أربعة أسابيع مع فتح تدريجي للأكياس حتى نهاية التقسية.

5 – التحليل الإحصائي :

استخدم البرنامج الإحصائي SPSS لتحليل النتائج وفق اختبار دونكان لمقارنة المتوسطات ، حيث قورنت متوسطات 30 عينة نباتية لكل معاملة إكثار و 25 عينة نباتية لكل معاملة تجذير مع العلم أن التجارب كررت ثلاث مرات وقورنت المتوسطات عند مستوى المعنوية 0.05 % .

النتائج والمناقشة

التعقيم السطحي للأجزاء النباتية :

تبين أن أفضل النتائج التي تم الحصول عليها بشكل عام من خلال المقارنة الموضحة بالجدول 4 التي استخدم فيها الايتانول 70% مدة 2 دقائق حيث كانت النسبة المئوية للبراعم الحية الخالية من التلوث 64.70، وأظهرت النتائج أن الإيتانول 70% أكثر كفاءة في التعقيم من الكلوركس (هيبوكلوريت الصوديوم) بشكل واضح ، إذ وصل متوسط النسبة المئوية للبراعم الحية غير الملوثة 49.11% عند استخدام الإيتانول 70% ولم يتجاوزالمتوسط 24.11% باستعمال الكلوركس،بدأت عملية النمو بعد أسبوعين من زراعة البراعم الحية.

الجدول 4 – يوضح كفاءة معاملات التعقيم المستخدمة في مرحلة الزراعات الأولية

رقم المعاملة	معاملات التعقيم	عدد البراعم المزروعة	عدد البراعم الملوثة	عدد البراعم الميتة	عدد البراعم الحية	البراعم الحية %	متوسط النتائج حسب نوع مادة التعقيم %
1	كلوركس20% لمدة 10 د	85	13	57	15	17.64	24.11
2	كلوركس 20% لمدة 5 د	85	20	45	20	23.52	
3	كلوركس15% لمدة 10 د	85	14	46	25	29.41	
4	كلوركس15% لمدة 5 د	85	19	44	22	25.88	
5	كلوركس10% لمدة 10 د	85	23	38	24	28.23	
6	كلوركس10% لمدة 5 د	85	25	35	25	29.41	
7	إيتانول 70% لمدة 1 د	85	17	13	55	60	49.11
8	إيتانول 70% لمدة 2 د	85	13	12	60	64.70	
9	إيتانول 70% لمدة 4 د	85	13	20	52	61.59	
`10	إيتانول 70% لمدة 6 د	85	20	14	51	60	

يعد الحصول على زراعات معقمة من أهم مراحل الإكثار بالنسج وأكثرها صعوبة بسبب تلوث وموت البراعم، فكان من الضروري البحث عن أفضل وسيلة تعقيم نستطيع من خلالها التخلص من الجراثيم والفطريات النامية على الأجزاء النباتية المستخدمة وخاصة النسج النباتية(Fiorino and Loreti,1987) . وإن أكثر المواد المستعملة في التعقيم هي هيبوكلوريت الصوديوم Naocl وكلوريد الزئبق، وبشكل عام تشير العديد من البحوث إلى أهمية استعمال هيبوكلوريت الصوديوم في عملية التعقيم السطحي للعينات النباتية (Jones and Hoopgood،1979) إلا أن الدراسة الحالية بينت أن استعمال الإيتانول 70% دون إضافة الكلوركس أعطى نتائج أفضل حيث زاد في عدد البراعم الحية ، وهذا لا يتفق مع ما توصل إليه Astarita and Santarem (2003) في نتائجهما إ ذ كانت معاملة التعقيم الفُضلى كلوركس 15% مدة 20 دقيقة. مع إنه عند استعمال الكلوركس حتى بتراكيزه الضعيفة مع الكحول 70 % أدى إلى نقصان عدد البراعم الملوثة لكن لا يمكننا اعتباره المعقم الأفضل بهذه الدراسة، حيث أدى إلى زيادة عدد البراعم الميتة بشكل واضح ويمكن تفسير هذا كون النبات عشبي وبراعمه حساسة جداً للمعقمات، وهذا يتوافق مع ما

نصح به الرفاعي والشويكي (1987) باستعمال الإيتانول 70% للأجزاء النباتية رقيقة النسج وبوضعها في الإيتانول مدة لا تتجاوز خمس دقائق .

إكثار النموات الخضرية مخبرياً :

درس تأثير التوافقات الهرمونية المختلفة من البنزيل أدنين BA والكينتين Kin مع إندول بيوتريك أسيد IBA بتراكيز مختلفة حيث أظهرت النتائج تفوق BA من حيث عدد النموات المتشكلة وطولها مقارنة مع الكينتين ، وبلغت أكبر نسبة للنموات المتشكلة 39.6 وبطول 3.81 سم أثناء استخدام البنزيل أدنين بالمعاملة رقم MS3 (الشكل 4)، بينما كانت أعلى نسبة لتشكل النموات أثناء استخدام الكينتين 27.1 بطول 3.06 سم بالمعاملة رقم MS8 مما يدل على أن BA افضل من الكينتين فيما يتعلق بعدد وطول النموات المتشكلة كما في الجدول رقم 5 .

الجدول 5- تأثير التوافقات الهرمونية المختلفة في إكثار النموات الخضرية لنبات *Hypericum perforatum*

(متوسط 30 جزءاً نباتياً ± الخطأ المعياري SE)

رمز الوسط	MS+ منظمات النمو (ملغ/ ل)	متوسط طول النموات المتشكلة / سم	متوسط عدد النموات
MS		4.1± 0.02 b	2.6±0.02c
MS1	0.1 BA + 0.1 IBA	1.35 ± 0.07 c	19.78 ± 0.08 bc
MS2	0.3 BA + 0.1 IBA	1.43 ± 0.06 c	25.3 ± 0.01b
MS3	0.6 BA + 0.1 IBA	3.81 ± 0.05 bc	39.61 ± 0.01a
MS4	1 BA + 0.1 IBA	3.61±0.05 c	37.2 ± 0.02c
MS5	0.1 Kin+ 0.1 IBA	1.33 ± 0.05c	20.8 ± 0.08bc
MS6	0.3Kin + 0.1 IBA	1.4± 0.07c	24.6 ± 0.01b
MS7	0.6Kin + 0.1 IBA	2.8 ± 0.05c	26.0 ± 0.02c
MS8	1Kin + 0.1 IBA	3.06 ± 0.02 b	27.1 ± 0.06c

يعتمد تشكل النموات الخضرية الجديدة اعتماداً كبيراً على وجود السيتوكينينات في الوسط الغذائي إذ تؤدي السيتوكينينات دوراً مهماً ورئيساً في زيادة تشكل النموات الخضرية الجديدة كما تؤدي دوراً في التثبيط الكلي أو الجزئي لتشكل الجذور ، و تشجع السيتوكينينات نمو البراعم الإبطية 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 ، إ ذ إن وجود الأوكسينات والسيتوكينينات معاً يعد مهماً من أجل تنظيم النمو والتشكل المورفولوجي في زراعة النسج النباتية ، حيث يقوم الأوكسين بتعديل النظام الأسموزي والنفاذية الخلوية كما يزيد من نسخ المادة الوراثية وتكوين البروتينات ،(Rossignal *et al* 1990) .وقد أوضح Christison and Warnick (1988) أن التشكل يجري تحت سيطرة العلاقة بين الأوكسين والسيوكينين .

تجذير النموات مخبرياً :

أظهرت النتائج تفوقاً معنوياً لمركب NAA على IBA عند التركيز المستعمل في جميع المعاملات (الشكل 6). وقد وصلت أعلى نسبة تجذير إلى 95% ومتوسط عدد الجذور 7.1 على الوسط الذي يحوي 1ملغ / ل من NAA، بينما كانت أعلى نسبة تجذير 90% على الأوساط المحتوية على 2 ملغ / ل من IBA ، كما لوحظ ازدياد عدد الجذور بزيادة تركيز الأوكسينات ثم تناقص عند التركيز2 ملغ / ل ، كما تفوقت جميع الأوساط المحتوية على الأوكسينات بفروق معنوية عن الوسط MS الخالي من منظمات النمو حيث كانت نسبة التجذير بحدود 5% وعدد الجذور 1.1. أما من حيث الطول فكانت جميعها ذات طول جيد حيث وصل أفضلها إلى 10.5 و10.3 سم ، على الوسط الحاوي (1 ملغ / ل من NAA و IBA)على الترتيب ، بينما كان أصغر طول 7.1 سم على الوسط MS كما في الجدول رقم 6 .

جدول 6 – مقارنة تأثير IBA و NAA في تجذير النموات الخضرية المتشكلة لنبات *Hypericum perforatum* بعد أربع أسابيع من الزراعة

رمز الوسط	Ms + منظمات النمو ملغ/ ل	النسبة المئوية للتجذير	متوسط عدد الجذور المتشكلة	متوسط طول الجذور المتشكلة (سم)
R1	(0.5) IBA	80	4.3 ± 0.118 d	8.2 ± 0.081 d
R2	(1) IBA	85	5.8 ± 0.1bc	10.3 ± 0.101 a
R3	(2) IBA	90	3.9 ± o.159 d	9.2 ± 0.103 b
R4	(0.5) NAA	85	5.5 ± 0.179 c	8.8 ± 0.099 bc
R5	(1) NAA	95	7.1 ± 0.201 a	10.5 ± 0.089 a
R6	(2) NAA	90	6.2 ± 0.179 b	9.1 ± 0.072 b
R0	MS	5	1.1 ± 0.152 c	7.1 ± 0.03 a

تلعب الأوكسينات دوراً أساسياً في التحكم بتشكيل الجذور (Hu and Wang, 1983) . ويختلف تأثير الأوكسين في عملية التجذير حسب تركيز الأوكسين المستخدم ونوعه، كما يؤدي وجود أوكسينات متعددة في الوسط أحياناً إلى تجذير أفضل في العديد من النباتات (Nabors *et al* 1983) لما لها من دور مباشر في زيادة معدل التبادل الأيوني وزيادة الهيدروجين والهيدروكسيل نتيجة دورها في تحريض وزيادة نشاط أنزيمات ATPase في الجدر الخلوية (Rossignol *et al* 1990) . ومن ثم تحريض النبات على تشكل الجذور (Sharma et al 1981) .

أقلمة النباتات الناتجة عن عملية التجذير :

كانت نسبة نجاح الأقلمة 85% التي يمكن اعتبارها نسبة جيدة، و توضح إمكانية تطبيق البروتوكول المقدم بهذا البحث بشكل جيد ودون أي إعاقة (الشكلان 7 و8) . تعد عملية الأقلمة من أكثر مراحل زراعة النسج أهمية ، بسبب حساسية النباتات الموجودة في الزجاج، ومن ثم يجب أن تجري عملية النقل بين غرفة النمو والظروف الخارجية تدريجياً لتجنيب النبات من الجفاف (kozai 1991) . تتعرض بعض النباتات التي تنقل إلى البيت الزجاجي أو الحقل إلى الموت أو ضعف النمو بسبب تغير الشروط المحيطة بالنباتات، إذْ تُنقل 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 والتوصيات

1–أعطت الزراعة على وسط MS +IBA (0.1 ملغ/ل) + BA (0.6 ملغ/ل) أفضل نتيجة للإكثار الخضري من حيث عدد النموات وطولها .

2– كان وسط MS + NAA (1 ملغ/ل) أو على وسط MS + IBA (1ملغ/ل) 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 للنباتات الناتجة عن الزراعة المخبرية .

الشكل 2- الوسط MS0 بعد شهر

الشكل 3- الوسط MS1

الشكل 4- وسط MS3

الشكل 5- وسط MS5

الشكل 6- تجذير وسط R3

الشكل 7- أثناء الأقلمة

الشكل 8- بعد نجاح الأقلمة

المراجع :

1-الرفاعي، عبدالرحيم توفيق والشويكي، سمير عبد الرازق. (1987). تقنيات القرن 21 لتحسين النبات باستخدام زراعة الأنسجة'كتاب ص116 .

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

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

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

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

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

7- 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.

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

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

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

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

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

13- 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.

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

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

16 - 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.

17- 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.

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

19- 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.

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

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

22- 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.

23- .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.

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

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

26 - 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

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

28- Organ culture.

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