



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

دور جينات *rol* لبكتريا *Agrobacterium* في تحفيز البناء الحيوي لمركبي
الابجيين والكamazولين في أنسجة نبات البابونج
Matricaria chamomilla L.

آلاء معاذ إبراهيم يونس العبيدي

رسالة ماجستير
علوم الحياة / علم النبات

بإشراف
الأستاذ الدكتور
أمجد عبد الهادي محمد



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

دور جينات *rol* لبكتريا *Agrobacterium* في تحفيز البناء الحيوي لمركبي
الابجيين والكamazولين في أنسجة نبات البابونج

Matricaria chamomilla L.

رسالة ماجستير تقدمت بها الطالبة
آلاء معاذ إبراهيم يونس العبيدي

إلى
مجلس كلية العلوم جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات
نيل شهادة الماجستير في اختصاص
علوم الحياة / علم النبات

بإشراف
الأستاذ الدكتور
أمجد عبد الهادي محمد

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ نَرْفَعُ دَرَجَاتٍ مِّنْ نَّشَأٍ وَفَوْقَ
كُلِّ ذِي عِلْمٍ عَلِيمٌ ﴾

صدق الله العظيم

(سورة يوسف، الآية: 76)

إقرار المشرف

أشهد أنّ إعداد هذه الرسالة " دور جينات *rol* لبكتريا *Agrobacterium* في تحفيز البناء الحيوي لمركبي الالبجنيين والكامازولين في أنسجة نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. " قد جرى تحت إشرافي في جامعة الموصل، وهي جزء من متطلبات شهادة الماجستير في علوم الحياة/ علم النبات.

التوقيع:

المشرف: أ. د. أمجد عبدالهادي محمد

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: / / 2024

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أنّ هذه الرسالة الموسومة " دور جينات *rol* لبكتريا *Agrobacterium* في تحفيز البناء الحيوي لمركبي الالبجنيين والكامازولين في أنسجة نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. " تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ماورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

الاسم: أ.م. د. حمد محمد فتحي

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ: / / 2024

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

بناءً على التوصيات المقدمة من قبل المشرف والمقوم اللغوي ، أرشح هذه الرسالة للمناقشة .

التوقيع:

المشرف: أ. د. أمجد عبدالهادي محمد

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: / / 2024

إقرار رئيس القسم

بناءً على التوصيات المقدمة من قبل رئيس لجنة الدراسات العليا، أرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع:

المشرف: أ. د. أمجد عبدالهادي محمد

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: / / 2024

قرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة قد اطلعنا على هذه الرسالة وناقشنا الطالبة
الاء معاذ إبراهيم يونس العبيدي في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 20 / 8 / 2024 وأنها
جديرة لنيل شهادة الماجستير في اختصاص علوم الحياة / علم النبات

التوقيع

أ.م.د. علاء حسين علي محمد
عضو

التوقيع

أ.د. رائد سالم احمد داؤد
رئيس اللجنة

التوقيع

أ.د. أمجد عبدالهادي محمد
عضو (المشرف)

التوقيع

م.د. زكريا سامي عبد الرزاق
عضو

قرار مجلس الكلية

اجتمع مجلس كلية العلوم بجلسته..... المنعقدة في / / 2024 م وقرر
التوصية بمنحه شهادة الماجستير في علوم الحياة / علم النبات.

التوقيع

عميد كلية العلوم

أ.د. هيام عادل ابراهيم

2024 / /

التوقيع

مقرر مجلس الكلية

أ.م.د. محمد صبحي حميد

2024 / /

الشكر والثناء

اللهم لك الحمد والشكر كما ينبغي لجلال وجهك وعظيم سلطانك، والصلاة والسلام على سيدنا
ونبينا محمد (صلى الله عليه وسلم) ومن سار على دبره واهتدى بهداه إلى يوم الدين.
أمّا بعد...

فلا يسعني وأنا أضع اللمسات الأخيرة في هذه الرسالة إلا وأن أتقدم بجزيل الشكر والإمتنان إلى
الأستاذ الدكتور أمجد عبد الهادي محمد لإشرافه على هذه الرسالة وابدائه الملاحظات القيمة وتوجيهاته
السديدة وعلى طول صبره وأخلاقه الطيبة، سائل الله تعالى أن يوفقه وجزاه الله عني خير الجزاء.

كما أتقدم بجزيل الشكر والعرفان إلى رئاسة جامعة الموصل وإلى عمادة كلية العلوم المتمثلة
بالسيدة عميد كلية العلوم الاستاذ الدكتورة هيام عادل إبراهيم، ورئاسة قسم علوم الحياة المتمثلة بالأستاذ
الدكتور أمجد عبد الهادي محمد ورئيس قسم الأدلة الجنائية الأستاذ الدكتور رائد سالم الصفار.
ويدفعني الواجب لأشكر مقرري القسم الدكتور علاء حسين والدكتور ريان مازن لتعاونهما معي
وتسهيلهما الحصول على الأنواع البكتيرية في قسم علوم الحياة التي أستخدمت في الدراسة. والشكر
موصول لجميع أساتذة ومنتسبي قسم علوم الحياة وزملائي وزميلاتي طلبة الدراسات العليا لما أبدوه من
تعاون وتشجيع طيلة مدة البحث، كما يطيب لي أن اتقدم بجميل عبارات الشكر والامتنان للأخ الفاضل
الدكتور تميم سليمان الجبوري لما قدمه لي من مساعدة ومعلومات ودعم طيلة مدة الدراسة الذي أدى
إلى تقديم رسالتي بأحسن صورة، فأسأل الله سبحانه وتعالى له التوفيق والنجاح.

ويسرني أن أتقدم بخالص الشكر وعظيم الأمتنان إلى من شرفني حمل أسمه .. إلى من علمني
العطاء دون انتظار أبي العزيز حفظه الله . وإلى أمي الغالية التي ساندتني بالدعاء وكانت دعماً لي
في الشدائد والأزمات أسئل الله ان يطول عمرهم ويحفظهم.

أخص بالذكر وبالشكر والأمتنان إلى رفيق دربي وشريك حياتي زوجي العزيز الذي كان ولازال لي
سنداً وقُدوة ، وتحمل معي عبئ الدراسة وقاسمني آلمي وساعدني في أكمال مسيرتي العلمية حفظه الله
..والى أبنتي وقرة عيني تالين التي كان وجودها دافعاً حيزاً لأكمال هذا الأنجاز العلمي . وأشكر عائلتي
الثانية (أهل زوجي) لما قدموا لي من دعم ومساعدة ومحبة وجهد طيلة فترة الدراسة . وكذلك أشكر
أخي وأختي وجميع أحبتي وعائتي الجميلة لمساعدتي وتقديم المحبة والدعم... وأعتذر لمن لم يرد ذكر
اسمائهم فذكرهم باقي وفضلهم لن يُنسى ماحييت والله الموفق انه نعم المولى ونعم النصير.

الاء معاذ

الباحثة

الخلاصة

أدت الدراسة الحالية في إنتاج نبيتات البابونج *Matricaria chamomilla* L. بتقانة الزراعة النسيجية، وإخضاعه للتحويل الوراثي ببلازميدات (pRi) root inducing plasmid (pRi) المعزول من الناقل البكتيري *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 بواسطة الحقن المباشر. وكذلك قياس تركيز مركبات الأبينجينين Apigenin والكامازولين chamazulene في أنسجته المختلفة.

سجلت بذور نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. نسبة إنبات 90% بعد عشرة أيام مُنتجة بأدرات نامية ذات حيوية جيدة متميزة على وسط Murashige and Skoog (MS) الصلب. وأستحدث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية للبادات على وسط MS الصلب والمدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل من Naphthaleneacetic acid (NAA)، Benzyl adenine (BA)، 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) معاً بنسبة بلغت 100% وإنتاج مزارعه بعد 25 يوماً. ومن النتائج المميزة ظهور نموات خُضرية تلقائياً بعد 7 أيام من إعادة الزراعة الأولى للكالس التي تطورت لاحقاً إلى أفرع خُضرية تحمل أوراق حقيقية ، جُذرت بسهولة في وسط MS الصلب بكامل قوته التركيبية بنسبة 100% وأنتجت نبيتات كاملة بعد 21 يوماً.

تطرقت الدراسة الحالية إلى الكشف عن قدرة بلازميدات Ri المعزول من ATCC15834 لبكتريا *Agrobacterium rhizogenes* بعد مدد تحضين مختلفة لوحدها في إحداث التحويل الوراثي لنباتات البابونج .

أدت نتائج حقن تلك البلازميدات مباشرة في قطع السيقان تحت الفلقية للبادات بعمر 15 يوماً بطريقة الحقن المباشر إلى استجابتها ونشوء الجذور الشعرية. ومع تفوق التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ من الناقل البلازميدي في تحفيز أعلى نسبة بلغت 80% بعد 7 أيام من التلقيح. وأستمر نمو الجذور الشعرية بعد إستئصالها مُنفردة أو بهيئة تجمعات ووضعها على وسط free from plant growth regulators (MSO) الصلب وتكوينها مزارع جيدة، إذ إتُصفت هذه الجذور بسرعة نموها ولونها الأبيض وسليبيتها للانتحاء الأرضي.

أثبتت نتائج الترحيل الكهربائي في طبقة هلام الاكاروز 1% للحمض النووي الكروموسومي Deoxyribonucleic acid (DNA) المضخم بتقانة Polymerase chain reaction (PCR) والمُستخلص من الأنسجة المُلقحة بالناقل البلازميدي تحوّلها الوراثي دليلاً عن وجود

جين *rol A* في جينومها عند إستخدام بادئ متخصص للجين ذاته ، إذ أظهرت وجود حزمة واحدة بلغ حجمها الجزيئي 248pb وهو مايمثل الوزن الجزيئي للبادئ المستخدم للجين.

قدرت الدراسة تقدير تراكيز مركبي الأبجيين والكامازولين في أنسجة نبات البابونج المختلفة بتقانة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) High Performance Liquid Chromatography، وتميّزت الأفرع الخُضرية المحوَّلة وراثياً ببلازميدات *root inducing* (Ri) ذي التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ بمحتواها العالي من الأبجيين والكامازولين ،حيث بلغ 0.4451 ، 0.344318 مايكروغرام مل⁻¹ على التوالي متفوقاً عن باقي العينات والمقارنة .

أظهرت المستخلصات الأيثانول 75% الكحولية للمجموع الخُصري لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. كفاءة في تثبيط نمو الأنواع البكتيرية (*E.coli* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Enterococcus columbae* ، *Klebsiella pneumonia*) إذ أظهر المستخلص الكحولي للأفرع الخُضرية لنبات البابونج المحولة وراثياً بالناقل البلازميدي اعلاه تأثيراً واضحاً على نمو جميع الأنواع البكتيرية مع تفوق الحجم 100مل المضاف اليهما مساحة بأقطار بلغت 12,7,9,11 ملم على التوالي.

ثبت المحتويات

الصفحة	الموضوع
I-II	الخلاصة
III-VII	ثبت المحتويات
VIII	ثبت الجداول
IX-X	ثبت الأشكال
I-III	ثبت الملاحق
X-XI	ثبت المختصرات
3-1	الفصل الأول: المقدمة
الفصل الثاني استعراض المراجع	
4	1.2 نبات البابونج <i>Matricaria Chamomilla L.</i>
6	2.2 المركبات الكيميائية الطبية في نبات البابونج <i>Matricaria chamomilla L.</i>
8	1.2.2 الأبيجينين Apigenin
9	2.2.2 الكامازولين Chamazulene
11	3.2 الزراعة النسيجية لنبات البابونج <i>Matricaria chamomilla L.</i>
13	4.2 التحول الوراثي للنباتات
14	1.4.2 بكتريا <i>Agrobacterium rhizogenes</i> أحد أنظمة التحول الوراثي في النبات
16	5.2 بلازميدات Ri المحفزة للجذور الشعرية
18	6.2 الجذور الشعرية

الصفحة	الموضوع
19	7.2 التفاعل التسلسلي البوليميرازي (PCR) Polymerase Chain Reaction
المواد وطرائق العمل	
22	1.3 الأوساط الغذائية المستخدمة
22	1.1.3 وسط MS (Murashige and Skoog, 1962)
23	2.1.3 وسط YEB (Yeast Extract Beef Medium) (Vincent, 1970)
23	3.1.3 وسط الأجار المغذي Nutrient Agar (Tille, 2017)
24	2.3 تعقيم بذور نبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. سطحياً ونمو بادرته
24	3.3 استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقة لبادرات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L.
25	4.3 إنتاج مزارع الكالس للسيقان تحت الفلقة وإدامتها
25	5.3 تمايز الأفرع الخضرية وتجديرها
25	6.3 إحداث التحول الوراثي لأنسجة نباتات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. بالحقن المباشر بالناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا <i>A. rhizogenes</i> ATCC15834
25	1.6.3 مصدر السلالة البكتيرية <i>A. rhizogenes</i> ATCC15834 وإدامتها
26	2.6.3 عزل الناقل البلازميدي pRi-DNA من السلالة البكتيرية <i>A. rhizogenes</i> ATCC15834
27	7.3 تلقيح قطع السيقان تحت الفلقة لبادرات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L.
27	8.3 إنتاج مزارع الجذور الشعرية المتكونة على قطع السيقان وإدامتها
28	9.3 التحري الجزيئي عن التحول الوراثي لنبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. بالناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا <i>A. rhizogenes</i> ATCC15834

الصفحة	الموضوع
28	1.9.3 إستخلاص الحمض النووي الكروموسومي DNA من أنسجة نبات البابونج المتوقع تحولها الوراثي بالناقل البلازميدي
30	2.9.3 تقدير تركيز ونقاوة الحمض النووي الكروموسومي DNA
30	3.9.3 الترحيل الكهربائي للحمض النووي الكروموسومي DNA المُستخلص من أنسجة نباتات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. المختلفة في الأكاروز 1%
31	4.9.3 التفاعل التسلسلي البوليميرازي PCR لإثبات التحول الوراثي في نباتات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. بالناقل البلازميدي Ri
33	10.3 تقدير تركيز مركبي الأبيجينين Apigenin والكامازولين Chamazulene في الأنسجة المختلفة لنبات البابونج بوساطة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC), High-performance liquid chromatography:
33	1.10.3 تحضير مُستخلصات أنسجة نبات البابونج وتجهيزها للقياس بجهاز HPLC
34	2.10.3 تحضير المحلول القياسي لكلا المركبين الأبيجينين Apigenin والكامازولين Chamazulene
34	3.10.3 تقدير تراكيز كلا المركبين باستخدام جهاز HPLC
36	11.3 تحضير مستخلصات أنسجة نبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. المختلفة لتحديد دورها في تحديد نمو الأنواع البكتيرية قيد الدراسة
36	1.11.3 تحضير المُستخلص الكحولي بالإيثانول 75%
36	2.11.3 التحري عن قدرة المُستخلصات الكحولية للمجموع الخضري لنبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. البري والمحوّلة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri قيد الدراسة ضد نمو انواع بكتيرية مختلفة
4. النتائج والمناقشة	
38	1.4 إنتاج نبيتات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية في الوسط الزراعي
38	1.1.4 كفاءة التعقيم السطحي للبذور وإنتاج البادرات المعقمة

الصفحة	الموضوع
39	استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقة لبادرات البابونج. <i>Matricaria chamomilla</i> L. وتكوين مزارعه
41	التكوين التلقائي للأفرع الخضرية من كالس السيقان تحت الفلقة لبادرات البابونج. <i>Matricaria chamomilla</i> L.
42	تجذير الأفرع الخضرية المتكونة تلقائياً
43	التحول الوراثي لنبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. بالناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا <i>A. rhizogenes</i> ATCC15834 وإثباته جزيئياً
43	تقدير تركيز ونقاوة الناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا <i>A. rhizogenes</i> ATCC15834
44	نشوء الجذور الشعرية من قطع السيقان تحت الفلقة لبادرات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. الملقحة بالناقل البلازميدي pRi لبكتريا <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC 15834
47	تكوين مزارع الجذور الشعرية
49	الإثبات الجزيئي لنجاح التحول الوراثي لنبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. بالناقل البلازميدي Ri المعزول من <i>A. rhizogenes</i> ATCC15834 جزيئياً بواسطة التفاعل البوليميرازي المتسلسل (PCR) Chain Reaction
49	تركيز ونقاوة الحمض النووي الكروموسومي DNA المستخلص من الأنسجة المختلفة لنبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L.
51	الحمض النووي DNA المضخم بتقانة PCR والمستخلص من الأنسجة المحولة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا <i>A. rhizogenes</i> ATCC15834 والأنسجة المقارنة
52	تقدير تراكيز مركبي الأبينين والكامازولين في الأنسجة المختلفة لنباتات البابونج. <i>Matricaria chamomilla</i> L. بتقانة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC
52	مركب الأبينين Apigenin القياسي

الصفحة	الموضوع	
53	الأفرع الخُضرية المفصولة من نبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. البري ومن بادراته الاعتيادية والمحوّلة وراثياً	2.3.4
56	مُرْكَب الكامازولين chamazulene القياسي	3.3.4
61	كفاءة المُستخلصات الكحولية للمجموع الخُصري لنبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. قيد الدراسة في تثبيط نمو أنواع بكتيرية مُختلفة	4.4
	الاستنتاجات والتوصيات	
65	الاستنتاجات	
66	التوصيات	
90-66	المصادر	
A	Abstract	

ثبت الجداول

الصفحة	العنوان	الجدول
32	مكونات مزيج تفاعل PCR	1
32	عدد الدورات وظروفها للتفاعل التسلسلي البوليميرازي PCR	2
43	تركيز ونقاوة الناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا <i>A. rhizogenes</i> ATCC15834 المُحضّنة مسبقاً للفترات 24، 48 و 72 ساعة	3
44	نشوء الجذور الشعرية من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. المُلقحة بالناقل البلازميدي Ri لبكتريا <i>A. rhizogenes</i> ATCC15834 بعد 28 يوماً	4
49	تركيز ونقاوة الحمض النووي الكروموسومي DNA المُستخلص من الأنسجة المختلفة لنبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L.	5
53	زمن الإحتباس ومساحة المنحني وتركيز الأبجيين في العينة القياسية ومُستخلصات الأفرع الخُضرية لنباتات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. البري، البادرات الاعتيادية، المتميزة من الكالس والمحوّلة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا <i>A. rhizogenes</i> ATCC15834	6
57	زمن الإحتباس ومساحة المنحني وتركيز الكامازولين <i>chamazulene</i> في العينة القياسية ومُستخلصات الأفرع الخُضرية لنباتات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. والبادرات الاعتيادية والمحوّلة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا <i>A. rhizogenes</i> ATCC15834	7
61	تأثير أحجام مُختلفة من مُستخلصات الافرع الخضرية المحولة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri لنبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. ذي التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر ⁻¹ على نمو الأنواع البكتيرية قيد الدراسة	8
63	تأثير أحجام مُختلفة من مُستخلصات نباتات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. البري على نمو الأنواع البكتيرية قيد الدراسة	9

ثبت الاشكال

الصفحة	العنوان	الشكل
5	أزهار نبات البابونج	1
8	التركيب الكيميائي لمركب Apigenin	2
10	التركيب الكيميائي لمركب chamazulene	3
38	بادرة البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. النامية في وسط MSO الصلب بعمر 10 أيام	4
39	أنتاج مزارع الكالس من نبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. على وسط MS الصلب المزود بأضافة 1.0 ملغم لتر ⁻¹ لكل من NAA ، BA و 2,4-D بعد 25 يوماً	5
41	التمايز التلقائي لأفرع الخضرية من قطع الكالس المزروع على وسط MS الصلب الحاوي 1.0 ملغم لتر ⁻¹ لكل من NAA ، BA ، 2,4-D بعد 30 يوماً	6
42	تكوين نبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. الكامل من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية وتجذيره في الوسط الزرعي	7
45	نشوء الجذور الشعرية من سيقان تحت الفلقية لبادرات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. الملقحة بالناقل البلازميدي Ri لبكتريا <i>A.rhizogenes</i> ATCC15834	8
48	مزرعة الجذور الشعرية المتطورة من خصلها المستأصلة من اماكن تكوينها على قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. الملقحة بالناقل البلازميدي Ri لبكتريا <i>A.rhizogenes</i> ATCC15834 بتركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر ⁻¹ بعد 25 يوماً.	9
50	الترحيل الكهربائي للحمض النووي الكروموسومي DNA المستخلص من أنسجة نبات البابونج المختلفة على هلام الأكاروز 1%	10
51	الترحيل الكهربائي لنواتج التفاعل التسلسلي البوليميرازي للحمض النووي لنبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. على هلام الاكاروز 1% المضخم والمستخلص من	11
52	منحني الأبجيين Apigenin القياسي	12
55	منحنيات الأبجيين لمستخلصات الأفرع الخضرية المختلفة من نبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L مقاسة بجهاز HPLC	13

الصفحة	العنوان	الشكل
56	مُنحني الكامازولين Chamazulene القياسي	14
58	مُنحنيات الكامازولين لمُستخلصات الأفرع الخُضرية المُختلفة من نباتات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. بإستعمال HPLC	15
62	التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي للأفرع الخُضرية لنبات البابونج المحولة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri ذو التركيز 1214.32 نانوغرام مايكرو لتر ⁻¹ على نمو الأنواع البكتيرية المُختلفة	16

ثبت الملاحق

الصفحة	العنوان	الملحق
I	المكونات الداخلة في تحضير لتر واحد من وسط MS (Murashig and Skoog, 1962)	1
II	المكونات الداخلة في تحضير لتر واحد من وسط YEB	2
II- III	المحاليل المُستعملة في عملية عزل بلازميدات Ri من بكتريا <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC15834	3

ثبت المختصرات

المختصر	المصطلح
%	Percent
$\mu\text{g/g}^{-1}$	Microgram / gram
$\mu\text{g/ml}^{-1}$	Microgram / milliliter
BA	Benzyl adenine
NAA	Napthaleneacetic acid
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
K	Kinetin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
MS	Murashige and Skoog (1962) medium
MSO	MS free from plant growth regulators
YEB	Yeast Extract Beef medium
g / mol	Gram / mole
SsDNA	Single-Stranded DNA
FITC	Fluorescein isothiocyanate
WHO	World Health Organization
mg/ L	Milligram / Liter
KOH	Potassium hydroxide
NaOCl	Sodium hypochlorite
IBA	indole -3- butyric acid
Nm	Nanometer
Ph	$-\text{Log } 10(\text{H})^+$
RNA	Ribonucleic acid
<i>et al</i>	And others
UV	Ultra violet
UK	United Kigdom
NA	Nutrient Agar
IPTase	Isopentenyltransferase
<i>A.rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AMP	Adenosine monophosphate
RT	Retention time
D. water	Distilled water
pRi-DNA	Hairy root inducing plasmid DNA
<i>iaaH</i> genes	Indole acetic acid H genes
<i>iaaM</i> genes	Indole acetic acid M genes
Kbp	Kilo base pair
LT-DNA	Left transferred-DNA
MTCC	Microbial Type Culture Collection
ATCC	American Type Culture Collection

المختصر	المصطلح
μl	Microliter
mg L^{-1}	Milligram per Liter
O.D	Optical density
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNase	Ribonuclease
RT-DNA	Right transferred-DNA
Ri	Root inducing plasmid
<i>Rol</i>	<i>Root loci</i>
SPP	Species
Spcr	Specific Polymerase Chain Reaction
T-DNA	Transferred-DNA
TBE	Tris borate EDTE
TE	Tris HCl EDTA buffer
Ti	Tumor Inducing Plasmid
<i>vir</i> -genes	Virulence genes
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
سم	سنتيمتر
غم	غرام
كغم	كيلوغرام
ملغم	ملغرام
مل	مليلتر
ملم	مليمتر
ملغم مل ⁻¹	مليغرام لكل مليلتر
مايكروغرام مل ⁻¹	مايكروغرام لكل مليلتر
ملغم لتر ⁻¹	مليغرام لكل لتر

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

المقدمة

نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. هو أحد أشهر أجناس العائلة النجمية Asteraceae والتي تُعرف كذلك باسم العائلة المُركَّبة Compositae وتضم حوالي 1600 جنس وحوالي 25000 نوع (Rolnik and Olas, 2021). وتعد أكبر العائلات النباتية المُزهرة ولها انتشاراً واسعاً ومنها الأعشاب والشجيرات والأشجار الصغيرة ونباتات الزينة والنباتات التي تستزرع وتستخدم في المجال الطبي (Araújo et al., 2016). ونبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. اهمية طبية كبيرة ومعروفة بحيث يُعد الملك المُتوج على عرش النباتات الطبية والعطرية، ويمتلك العديد من المُركبات المهمة طبياً والنشطة بيولوجياً وأهمها الزيت الطيار، ومركبات الفلافونويد، والتيربينويدات، والكومارين المسؤولة عن خصائصه الطبية (Amit et al., 2022)، يستوطن مناطق متنوعة على مستوى العالم (Abd-Allah and Salah-Eldin., 2021)، وحديثاً دمج العلماء والدارسون بين تقانة زراعة الأنسجة النباتية والتحول الوراثي المُختلفة لتشكيل أداة قوية تدعم نقل جينات معينة ذات صفات مرغوبة ودمجه في جينوم نبات آخر لتحسين صفاته كافة، ويعرف التحول الوراثي في النبات على أنه إدخال جينات خارجية ذات صفات مرغوبة إلى الخلايا، الانسجة، الأعضاء النباتية وتضمينها داخل الجينوم ويعرف الجين المدخل بالجين المحور transgene (Wilson and Coverley, 2017) وتتم بإستعمال طرائق مباشرة أو غير مباشرة (Udayabhanu et al., 2022).

يعد استخدام بكتريا *Agrobacterium* من أنجح الطرائق المُتبعة في احداث التحول الوراثي في النباتات وتعود إلى عائلة Rhizobiaceae ولها نوعان رئيسيان، الأول: *Agrobacterium rhizogenes* المسببة لمرض الجذور الشعرية hairy roots لإمتلاكها بلازميدات Ri (Root-inducing plasmid) (Shreni, 2022). والثاني: *Agrobacterium tumefaciens* والمُسببة لمرض الأورام التاجية Crown gall لإحتوائها على بلازميدات Ti (Tumer-inducing plasmid) (Bahramnejad et al., 2019). إن الأساس الجزيئي في عملية التحول الوراثي للنبات بوساطة الناقل البكتيري *A. rhizogenes* هو إحداث قطع لمجموعة الجينات الموجودة على بلازميدات pRi وتُعرف باسم T-DNA (Transfer-DNA) ودخولها الخلايا ثم اندماجها داخل جينومها ونجاح التعبير الجيني لها مُنتجةً الجذور الشعرية (Niazian et al., 2022; Bahari et al., 2020). وقد نجح الناقل البلازميدي Ri لبكتريا *A. rhizogenes* في إحداث التحول الوراثي للعديد من النباتات؛ ومنها عنب الذيب

(Al-Mallah and Salih, 2001)، والحلبة (المهداوي، 2013)، والسهم (الطائي، 2013)، والبنجر السكري (AL-Mallah and Al-Nema, 2016)، والجزر (الملاح ومحمد، 2019)، واللهاة (مسيب والملاح، 2019)، والبروكلي (Sultan and Mohammed, 2020)، ونبات زهرة الشمس (السنجري، 2022) ونبات اللافندر (الطائي، 2022)، ونبات الشيح (الجبوري، 2024). ونجحت دراسة حديثة التي قام بها الباحثون في إحداث التحول الوراثي لنبات البابونج الألماني *Matricaria chamomilla* L. ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes*، وأعطت نسبة تكوين الجذور الشعرية 100% بعد 7 أيام (Yuling et al., 2023). واستخدمت دراسة أخرى (Ali et al., 2020) الجسيمات النانوية لنقل الجينات الى جينوم نبات البابونج لحل بعض الصعوبات في إحداث التحول الوراثي، وأظهرت النتائج ان الأنايبب النانوية الكربونية لديها القدرة على التفاعل مع الحمض النووي ويمكن ان تحميه بشكل فعال من التلف الناتج عن الموجات فوق الصوتية والأنزيمات الهاضمة، وكذلك لديها القدرة في نقل ssDNA-FITC الى خلايا البابونج الألماني، وحققت زيادة في إنتاج مركب الأبجينين (Apigenin) في الجذور الشعرية والأنسجة المحولة وراثياً. إن ظهور الجذور الشعرية على الأجزاء المصابة ببكتريا *A. rhizogenes* هو دلالة نجاح التعبير الجيني لجينات T-DNA المتواجدة على بلازميداتنا ويحوي القسم الأيسر من T-DNA على مجموعة جينات *rol* (root locus) “موضع الجذور” (Mashiguchi et al., 2019). واتضح خلال التطفير *mutagenesis* إن مرض الجذور الشعرية يُعزى إلى وجود أربعة أنواع من جينات *rol* التي هي A,B,C,D وتكون كل مجموعة من هذه الجينات المسؤولة عن حالة معينة عند تعبيرها جينياً في النسيج (Habibi et al., 2018).

أهداف الدراسة

أُجريت الدراسة من أجل تحقيق هذه الأهداف:

- 1- إنتاج نباتات البابونج *Matricaria chamomilla* L. من تمايز كالس قطع السيقان تحت الفلقية لبادراته في الوسط الزراعي .
- 2- بيان إمكانية نقل جينات T-DNA الموجودة في الناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا *A. rhizogenes* ATCC15834 وتضمينه داخل جينوم نباتات البابونج *Matricaria chamomilla* L. ونجاح التحول الوراثي وإنشاء مزارع الجذور الشعرية.
- 3- إثبات حدوث التحول الوراثي على مستوى البيولوجي الجزيئي باستخدام تقانة التفاعل التسلسلي البوليميرازي (PCR).

4- إمكانية أستخلاص مركبي الأيجينين والكامازولين من مُستخلصات الأفرع الخُضرية المختلفة للنبات باستخدام تقانة High Performance Liquid Chromatography (HPLC) وتقدير تراكيزه .

5- كفاءة مُستخلصات الكحولية الايثانول 75% لأنسجة الأفرع الخُضرية لنباتات البابونج في تثبيط نمو أنواع مُختلفة من البكتريا (E.coli ، Pseudomonas aeruginosa ، Enterococcus columbae ، Klebsiella pneumonia) .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

استعراض المراجع

1.2 نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L.

يعود نبات البابونج إلى العائلة النجمية Asteraceae والتي أيضاً يُطلق عليها العائلة المُركبة Compositae (Shams *et al.*, 2012)، وهي من أكبر العائلات النباتية المزهرة وأكثرها تنوعاً في العالم وتشمل الأعشاب، الشجيرات، الأشجار الصغيرة، نباتات الزينة والنباتات التي تستزرع وتستخدم في المجال الطبي (Santos *et al.*, 2016). وتضم أكثر من 1600 جنس و25000 نوع موجودة في جميع أنحاء العالم (Rolnik and Olas, 2021).

أن التصنيف العلمي لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. هو :

Kingdom: Plantae

Super division: Spermatophyta

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Asterales

Family: Asteraceae

Genus: *Matricaria*

Species: *chamomilla*

(Chauhan *et al.*, 2021)

نبات البابونج عشبي سنوي يصل ارتفاعه إلى 50-60 سم وينمو بجميع أنواع التربة (Lim., 2014)، هو ذو جذور رفيعة مغزلية الشكل، الأوراق ضيقة وطويلة ثنائية إلى ثلاثية مركبة، ازهاره ذات رؤوس مُعنقة، غير متجانسة، موضوعة بشكل منفصل ويبلغ قطرها من 10 إلى 30 ملم ويبلغ طول الزهيرات الأنبوبية الصفراء الذهبية ذات 5 أسنان من 1.5 إلى 2.5 ملم، وتنتهي دائماً بأنبوب عُدي (الشكل، 1)، تبدأ في التفتح اعتباراً من الأسبوع الثاني من شهر مارس (Singh *et al.*, 2011).



الشكل (1): ازهار نبات البابونج (Mohamedsalih and Sabir.,2020)

موطنه الأصلي جنوب وشرق أوروبا وشمال وغرب آسيا، كما تم إدخاله في العديد من البلدان وفي بريطانيا وأستراليا وأمريكا الشمالية (Abd-Allah and Salah-Eldin.,2021) وفي الوقت الحاضر يتم زراعته على نطاق واسع (Parveen *et al.*,2023).

يُعد نبات البابونج من أشهر النباتات الطبية على مر العصور لدرجة أنه يعد الملك المتوج على عرش النباتات الطبية والعطرية لكونه مصدر أساسي للحصول على الدواء من المركبات النشطة بيولوجياً المعزول منه، وأهمها الزيت الطيار، مركبات الفلافونويد، التيربينويدات، الكومارين المسؤولة عن خصائصه الطبية (Amit *et al.*, 2022)، أن الفعالية الدوائية والعلاجية تكون في الزيت وهو سائل لزج من الزيوت الفردية المختلفة وهو ثقيل ذو لون غامق يتجمد عند 5 درجات مئوية وله خصائص مُضادة للالتهابات ومُسكنة ومُطهرة. وتشير الدراسات إلى أن النبات يمتلك فعالية في خفض الحمى وكذلك فعالية مضادة للالتهابات، الأفلونزا، للتشنج، للأكسدة وتعالج عسر الهضم (Kimura *et al.*, 2023).

أظهرت منظمة الصحة العالمية (WHO) أن حوالي 80 % من سكان العالم مازالو يعتمدون على الطب التقليدي وأن المنتجات الطبيعية لاتزال تلعب دوراً مهماً للغاية في الطب (Boy et al., 2018). ولإحتواء البابونج على أكثر من 120 نوعاً من المكونات الطبية الفعالة بما في ذلك 56 نوعاً من الأحماض العضوية و36 نوعاً من الفلافونويدات و28 نوعاً من التربينويدات ومركبات أخرى (Lei Dai et al., 2022).

2.2 المركبات الكيميائية الطبية في نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L.

يعرف النبات الطبي plant medicinal بأنه النبات الذي يحتوي على عدد من مركبات الأيض الثانوي ذات التأثير الطبي تجاه مرض ما (مخمي، 2014). وتحتوي النباتات الطبية على مركبات وعناصر كيميائية لها تأثيرات مفيدة للإنسان ويتم إستعمالها بجرع محددة ومعظمها مواد أبيض ثانوي (HO et al., 2016). وقد أدى التدخل البشري في البيئة الطبيعية للنباتات إلى إنخفاض كبير في أعدادها، وللتغلب على هذه المشكلة اتجه العلماء إلى إستعمال تقنيات زراعة الأنسجة لإنتاج النباتات الطبية المهمة عن طريق الأكتار السلافي السريع لها والذي يعتمد على مبدأ الطاقة الكامنة للخلية (Totipotency) الذي يُشير إلى قدرة الخلايا على إنتاج نباتات كاملة منها (Malik and Riveiro and Brickman, 2020). (Wang, 2022).

إن كثرة مركبات الأيض الثانوية الموجودة في نباتات العائلة النجمية مثل الفينولات Phenolic، القلويدات Alkaloids، التربينويدات Terpenoids والبولي أسيتيلين polyacetylenes وغيرها (Heinrich et al., 1998) منحها أهمية كُبرى على الصعيدين الكيموحيوي والدوائي. وتضم هذه العائلة عدداً من الأنواع المعروفة مثل زهرة الشمس *Helianthus annuus* L.، الخس *Lactuca sativa* L.

فضلاً عن نبات الشيح *Artemisia*، والبابونج *Matricaria chamomilla* L. (Rolnik and Olas, 2021) وغيرها التي تحوي هذه المركبات المهمة .

ويعد نبات البابونج من النباتات الطبية المهمة إذ أُستعمل نبات البابونج في الطب الشعبي القديم وذلك لفعاليته لعدد من الأمراض ومنها استخدامه كمُهْدء ومُسكن للآلام وعلاج للقلق والاكتئاب والأفلونزا، وأُجريت العديد من الدراسات في هذا المجال التي بينت أن الأزهار لنبات البابونج هي المصدر الفعالة للعلاج (Joumaa and Borjac., 2022). يتم تحضير أزهار البابونج على شكل منقوع أو مغلي لعلاج مرض السكري (Mrabti et al., 2021) والاضطرابات العصبية والإسهال والذبحة الصدرية وقرحة المعدة والخراج والإلتهابات والحيض المؤلم (Idm'hand et al., 2020). ففي إسبانيا يتم استخدام البابونج كحقن ضد العديد من الأمراض بما في ذلك آلام المعدة، واضطرابات الجهاز الهضمي وحصوات الكلى (Benítez et al ., 2010). فضلاً عن ذلك يمكن إستخدام النبات كمسكن ومُطهر ومُضاد للقيء ضد الغثيان ومُضاد للالتهابات ضد اضطرابات المعدة والأمعاء وكذلك في تهيج العين (Parada et al., 2009). وفي الطب التقليدي الإيطالي، تم إستخدامه على نطاق واسع ضد الالتواء، كسور العظام، التهيج، آلام العضلات أو الجهاز الهضمي (Menale et al., 2021).

أظهرت مُستخلصات البابونج الروماني نشاطاً مضاداً للأورام كما تحتوي مُستخلصات البابونج الألماني على العديد من الخصائص المُضادة للبكتيريا والفطريات والمُطهرة. يتم استخدامه ضد أنواع مختلفة من البكتيريا مثل المكورات العنقودية الذهبية، المكورات العنقودية الجلدية، المكورات العقدية، العقدية الرئوية، المكورات الدقيقة النيابية والمقيحات، الزائفة الزنجارية (Poudineh et al., 2021).

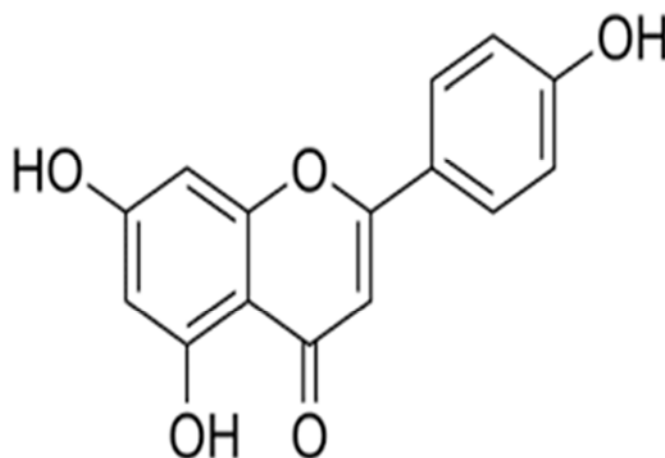
ولنبات البابونج مجموعه مختلف من المركبات النشطة بايولوجياً ، إذ يحتوي على الزيوت الطيارة التي تتكون من مجموعة من الزيوت المنفصلة عندما تتعرض لبخار التقطير وأن اهم هذه الزيوت هي

azulenes, bisabolo, chamazulene, وجميعها تمتلك فوائد علاجية بوصفها مُضادة للبكتريا والفيروسات ولها فعالية مُضادة للالتهابات ومسكنة للآلام ومضادة للتأكسد (Ganzera *et al*., 2006). (Mak *et al*., 2006). (Gardiner, 2007)، ويحتوي البابونج كذلك على 36 نوعاً من الفلافونيدات. إن المجموعة الكبرى للمركبات المهمة طبياً المكونة لأزهار البابونج الالمانى تتضمن Apigenin و Chamazulene و Spathulenol و bisabolol oxidase و Flavonoids و Comarins و mucilages (Amiri *et al*., 2014).

وأشارت إحدى الدراسات إلى أن نسبة الأبيجينين Apigenin 16.8% والكامازولين Chamazulene 15-1% من النسبة الكلية للكتلة الجافة للنبات (Catani *et al*., 2021).

1.2.2 الأبيجينين Apigenin

الأبيجينين هو الفلافونويد الأكثر وفرة طبيعياً في أزهار البابونج وفي سيقان النباتات الوعائية بما في ذلك الفواكه والخضروات وبراعم القمح (Mushtaq *et al*., 2023). كما يعد نبات الكرفس مصدراً جيداً للأبيجينين إذ يحتوي على 108 ملغم من الوزن الجاف للنبات (Choo *et al*., 2012). وأن الصيغة البنائية للأبيجينين هي $C_{15}H_{10}O_5$ (الشكل، 2)



الشكل 2: التركيب الكيميائي لمركب Apigenin (Ali *et al*., 2017)

والأبجيين مركب غير قابل للذوبان عملياً في الماء ولكن بشكل معتدل يذوب في الكحول الساخنة وكذلك في محلول KOH المخفف، ويتواجد بشكل رئيس في شكل جلوكوزيد أبجيين ومشتقاته الأخرى (Zhao,2018). ونظراً لخصائصه العديدة ، وجد إمتلاكه مجموعة واسعة من الأنشطة البيولوجية والعلاجية، بما في ذلك تأثيرات مُضادة للأكسدة ، الالتهابات ، السرطان، الحساسية ، الاحياء المجهرية والميكروبات وتأثيرات وقائية للأعصاب وواقية للقلب. هذه الخصائص جعلت من الأبجيين مادة مثيرة للاهتمام لإستخدامها في العديد من المنتجات الدوائية والغذائية (Kashyap *et al.*,2022). كما وجد انه يمتلك دوراً في علاج الارق والاكتئاب والألم والقلق والتي بدورها تساهم بشكل كبير في الشيخوخة والصحة (2023 ، *et al* . Holzhausen).

وأكتسب الأبجيين أهمية في السنوات الأخيرة كعامل مفيد ومعزز للصحة، بسبب سميته الجوهريّة المنخفضة وتأثيراته المُذهلة على الخلايا الطبيعية مقابل الخلايا السرطانية، مُقارنة بالفلافونيدات الأخرى التي تشابه التركيب الكيميائي له (Madunić *et al* ., 2018). يعد الأبجيين جزءاً من فئة من الجزيئات التي يتم إمتصاصها بشكل رئيس في الأمعاء الدقيقة، اذ يتم امتصاص 5-10% من إجمالي الكمية المُبتلعة من الأبجيين، معظمها في أشكال أحادية أو ثنائية (Zuzuarregui and During., 2020).

2.2.2 الكامازولين Chamazulene

هو مركب عضوي هيدروكاربوني طبيعي من مشتقات الازولين موجود بشكل رئيس في زهرة البابونج (Al-Dabbagh *et al.*, 2019). ومركب حيوي نشط يتمتع برائحة قوية موجود بشكل طبيعي في مُستخلصات الزيوت العطرية للعديد من النباتات الطبية ، وأن الزيوت المحتوية على الكامازولين لها تأثير في موت الخلايا المبرمج على خلايا سرطان الجلد الخبيث ، فضلاً عن خصائصه المُضادة للأكسدة، والالتهابات، وكاسحاً للجذور الحرة وتنشيط إنزيم الأكسدة الحلقية (Zhou *et al.*, 2022).

ومن أكثر النباتات التي تحتوي زيوتها على نسبة عالية منه هي نوعان من الشيح *Artemisia*

siversiana , *Artemisia jacutic* (Zhigzhitzhapova *et al.*, 2015).

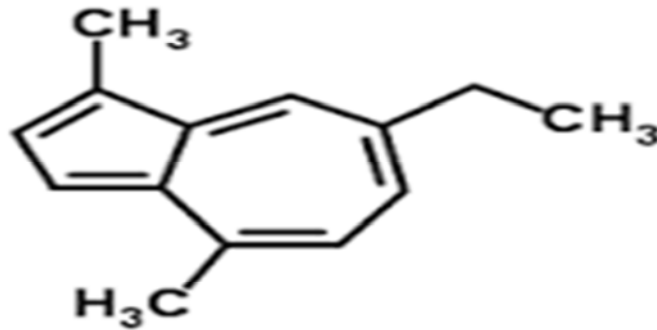
يعد هذا المركب ثنائي الحلقة ويُعد أحد المنتجات التي تتشكل من اللاكتونات المهيكلة للسيسكويتيربين

sesquiterpene مثل الماتريسين (matricin) ويتم إنتاجه في درجات حرارة عالية أثناء التقطير المائي

للقمم المزهرة للبابونج ويكون لونه أزرق (SAHIN and Ramazan., 2023). وأُجريت دراسة من قبل

الباحثين (Ma *et al.*, 2020a) لتقييم التأثيرات المثبطة للكامازولين على التهابات المفاصل العظمية في

كل من النماذج المُختبرية داخل الجسم الحي، وأن الصيغة الجزيئية لمركب الكامازولين هي $C_{14}H_{16}$.



الشكل 3: التركيب الكيميائي لمركب chamazulene (Gabbanini *et al.*, 2024)

3.2 الزراعة النسيجية لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L.

تعني تقانة زراعة الأنسجة النباتية Plant tissue culture استئصال أي جزء من نسيج أو خلية أو عضو نباتي وتعقيمه، ثم زراعته على وسط غذائي مُعقم مُخصص تحت ظروف مُعقمة ومن ثم تنميته في غرف نمو خاصة تحت ظروف معينة من الحرارة والضوء والرطوبة (Chimdessa, 2020). ولأهمية نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. للاستعمالات الطبية وعدم توفره طبيعياً إلا في موسم معين ضمن السنة فقد لجأ الباحثون إلى هذه التقانة لتوفيره على مدار السنة (Hemant, 2020). إن إكثار النبات يعتمد على القدرة الكلية، أو كثرة الخلايا النباتية التي لها القدرة على التجدد وعلى تمايز مجموعة معينة من الأنسجة أو الأعضاء من الخلية التي تتأثر بعوامل متعددة، بما في ذلك استخدام مُنظمات النمو النباتية (Gerdakaneh et al., 2020) ومكونات الوسط الأساسي ونوع النسيج المزروع (Minutolo et al., 2020). ومُنحت زراعة الانسجة النباتية أبواباً مشرقة لإنبثاق الثروة الخضراء الثابتة التي استخدمت فيها التحورات الجينية والتقانات الحياتية من أجل توظيفها في مجال التربية وتحسين النباتات كما ونوعاً (Sundararajan et al., 2017).

لا تعتمد هذه التقانة على مساحات شائعة وتمتاز بزيادة الكميات المُنتجة وكذلك تتميز باحداث تغيرات وراثية على الجزء النباتي المزروع للحصول على صفات مرغوبة أكثر (Almemary, 2020 ; et al., 2023). (Sharma).

وأشارت الدراسات إلى نجاح هذه التقانة على العديد من الأنواع النباتية العائدة إلى العائلة النجمية التي أهمها نبات الأقحوان وعباد الشمس و الخس (Boutigny et al., 2020 ; Darqui et al., 2017) والشاي (الجبوري، 2024) وغيرها من النباتات.

وللأهمية الطبية لنباتات البابونج فقد أُجريت عليها العديد من البحوث، لغرض زيادة إنتاجه وتحسين صفاته الزراعية من مزارعه النسيجية أو من أنسجته المحولة وراثياً، ونجحت دراسة من إستحداث الكالس بنسبة بلغت 100% بعد 7 ايام من قطع سيقان بادراته وتمايظه إلى أعداد كبيرة من النباتات الكاملة على وسط MS الصلب ومدعماً باضافة 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل من NAA و BA و 2,4-D (Hassanpour and Ghanbarzadeh., 2021). وتمكنت دراسة أخرى من زيادة كفاءة دمج البروتوبلاست للنبات باستخدام التحفيز الكهربائي Electrostimulation الذي ثبت أنه يسرع في إنقسام البروتوبلاست ويؤدي إلى زيادة في إنتاج تجمعات الخلايا منه (Salih., 2001). وكشفت النتائج التي توصل اليها الباحثون (Ahmad *et al.*.,2021) ان أعلى وزن لإستحداث الكالس ويزن طري بلغ 2.3غم بعد 30 يوماً كانت على وسط MS الحاوي على 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل من NAA و K التي وصلت نسبة استحداث الكالس فيه 90% مع تمايز للأفرع الخضرية من الكالس بخطوة واحدة ومن ثم إنتاج النباتات الكاملة .

وكذلك نجحت دراسة في إستحداث ونمو مزارع المعلقات الخلوية من نبات البابونج، فقد تم إنشاء مزارع المعلقات الخلوية من قطع الأفرع الخضرية للنبات على وسط MS السائل والحاوي على 5.0 ملغم لتر⁻¹ من K وبشدة اضاءة عالية (Bisson *et al.*.,1983). وأظهرت نتائج الدراسة التي أجراها الباحثون (Ali *et al.*., 2009) إلى دور مُنظمات النمو 2,4-D , BA في استحداث الكالس وإنتاج مزارعه من نبات البابونج الذي استخدمت مستخلصاته لاحقاً في معالجة الالتهابات المستحدثة تجريبياً في جلد الفئران . إذ وجد أن نسبة استحداث الكالس على وسط MS الحاوي على 1.5 ملغم لتر⁻¹ BA لوحده بلغت 10.27% وعند دعم الوسط باضافة 0.1 ملغم لتر⁻¹ من 2,4-D زاد من النسبة لتصل 100% .

4.2 التحول الوراثي للنباتات

يقصد بالتحول الوراثي هو إنتقاء جين غريب ذو صفة مرغوبة، ومن ثم تضمينه داخل جينوم كائن حي آخر (Wilson and Coverley, 2017)، ويتضمن التحول الجيني نقل الجين من كائن حي إلى آخر لإحداث تغيير مطلوب في صفاته الوراثية والبيولوجية (Varasteh-Shams *et al.*, 2020). وهي تقدم تكنولوجيا حديث في مجال علوم النبات، وأداة مهمة تُستخدم لتحسين جودة المحاصيل وإنتاجها، أو لتعزيز محتوى المُستقلبات الثانوية في النباتات الطبية، أو تطوير المحاصيل للزراعة المستدامة.

يمكن أن تتضمن هذه العملية إدخال جينات جديدة أو تعديل جينات موجودة لتحسين الصفات المرغوبة أو إحداث طفرات وراثية على المادة الوراثية ويتم استخدام عملية التحول الوراثي في إنتاج الأدوية العلاجية للأمراض الوراثية والمُستعصية وأُستخدمت كذلك لتطوير نباتات تتميز بصفات مرغوبة مثل مقاومة الحشرات والأمراض والجفاف (ISAAA, 2019). وكذلك يُستخدم على نطاق واسع في البحوث العلمية والتطبيقات الزراعية والصناعية، إذ يؤدي دوراً مهماً في تطوير المحاصيل الزراعية وإنتاج الأدوية والمنتجات الغذائية (Glick and Pasternak, 2003). وإنتاج المواد الكيميائية والوقود الحيوي (Connor and Atsumi, 2010).

ومع التطور السريع في أنظمة التقانات الحياتية أصبح من السهل إحداث التغيرات الوراثي وللعديد من الأنواع النباتية ومن تلك الأنظمة (Keshavareddy *et al.*, 2018):

✓ الإصابة ببكتريا الاكرويكتريوم *Agrobacterium* mediated transformation

✓ الحقن المجهرى الدقيق Microinjection

✓ بإستخدام البروتوبلاست Protoplast transformation

✓ القذائف البيولوجية للجينات Gene gun

✓ التنقيب الكهربائي Electroporation وغيرها....

1.4.2 بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* أحد أنظمة التحول الوراثي في النبات :

يعد التحول الوراثي باستخدام بكتريا *Agrobacterium* أحد انظمتيه الناجحة والشائعة الاستخدام (Rangslang et al., 2018). تنتمي بكتريا *Agrobacterium* إلى عائلة Rhizobiaceae وتتميز بأنها سالبة لصبغة كرام، وتعيش في التربة، وعصوية الشكل، وغير مكونة للسبورات، وتمتلك اسواطاً متحركة، وعضوية التغذية، وتتراوح درجة حرارة نموها المثلى ما بين 25-29 سيليزية و pH من 6-8 (Flores-) (Felix et al., 2020).

وتتضمن بكتريا *Agrobacterium* أنواعاً من أهمها:

A. rhizogenes وتكون مسؤولة عن تكوين مرض الجذور الشعرية hairy root لإملاكها الناقل البلازميدي Ri (Root- inducing plasmid) (Shreni, 2022).

A. tumefaciens هي المسؤولة عن تكوين العقد التاجية Crown galls التي تكون بشكل أورام لوجود الناقل البلازميدي Ti (Tumor inducing plasmid) (Bahramnejad et al., 2019).

ويحتوي الناقل البلازميدي Ri على منطقة Transffer –DNA (T-DNA) التي تضم جميع

الجينات المسؤولة عن إحداث عملية التحول الوراثي للنباتات بانتقالها طبيعياً إلى الخلية النباتية المجروحة وإندماجها داخل جينومها ثم التعبير الجيني لها وظهور أعراض الإصابة بالجذور الشعرية (Bahari et al., 2020 ; Niazian et al., 2022). هذه العملية تنتشط ببعض المواد الفينولية المفردة

مثل Acetosyringone (Gelvin, 2009). ويتميز التحول الوراثي باستخدام بكتريا *Agrobacterium*

rhizogenes بسهولة إجرائها ونجاحها على أنواع مختلفة من النباتات ومنها البروكلي *Brassica*

oleracea var italic (الحديدي، 2020)، ونبات زهرة الشمس *Helianthus annuus* L.

(السنجري، 2022)، وفول الصويا *Soy bean* (Fan et al., 2020).

وتلعب درجات الحرارة ، pH، النوع النباتي، نوع السلالة المستخدمة وكثافة اللقاح البكتيري دوراً هاماً في عملية التحول الوراثي (Shazad et al., 2016). ويتطلب إحداث التحول الوراثي ببكتريا *Agrobacterium* توفير مجاميع أساسية من الجينات التي تؤدي دوراً رئيساً في نجاح العملية ومنها جينات الأمراض *Virulence genes* (*vir-genes*) التي تعد المسؤولة عن عزل جزيئة T-DNA ونقلها الى داخل الخلية النباتية المجروحة وتضمينها داخل الحمض النووي الكروموسومي DNA لها.

وقد جذب التحول الوراثي للنباتات بإستخدام بكتريا *Agrobacterium* الباحثين والدارسين في هذا المجال لثباته الوراثي وإمكانية الحصول على نسخ من المادة الوراثية وكلفته القليلة وسهولة إنجازه. ولا تقتصر قدرة بكتريا *Agrobacterium* على نقل الصفات التي نرغب فيها لتحسين نوع النبات فحسب، بل كذلك في إنتاج أنواع نباتية مقاومة لمختلف الظروف البيئية (Mallikarjuna et al., 2016) والزيادة في مستويات نواتج الأيض الثانوي secondary metabolites (Gabr et al., 2016). وذكرت الدراسات بأن عوامل الصنف النباتي والسلالة البكتيرية والتقانة المستخدمة في التحول الوراثي هي من تحدد كفاءة التحول الوراثي (Ma et al ., 2020b).

وتوالت الدراسات من قبل الباحثين في مجال التحول الوراثي مُستخدمة نظام *Agrobacterium*-mediated transformation، إذ نجحت دراسة حدوث التحول الوراثي لنبات الريحان المقدس بإستخدام سلالتين مختلفتين من بكتريا *A.rhizogenes* وهي MTCC2364 و MTCC532 (Sharma et al., 2019). وأثبتت بكتريا *Agrobacterium* قدرتها في التحول الوراثي لأنواع أشجار الصفصاف *Salix spp.* وينسب ما بين 63.4% – 98.7% وهي نسب عالية ومميزة (Gomes et al ., 2019). وبينت الدراسة التي قام بها (Mohammed, 2020a) في إنشاء الجذور الشعرية المحولة وراثياً من نبات الفجل (*Raphanus sativus*) نجاحاً نتيجة لتلقيحها ببكتريا *A.rhizogenes* ATCC15834 بعد تحضينها 24، 48، ساعة بنسبة تحول وراثي 40,66% على التوالي بعد 20 يوماً .

وأظهرت النتائج لهذه الدراسة تطور هذه الجذور عند زراعتها على أطباق بتري تحتوي MSO فقد أمتازت الجذور بسرعة نموها ولونها الأبيض. وهناك دراسة أخرى أظهرت إحداث التحول الوراثي لنبات الشيح *Artemisia aucheri Boiss* وتكوين الجذور الشعرية بإستعمال أربع سلالات مختلفة من الناقل البكتيري *A. rhizogenes* وهي A4, ATCC15834, MSU440 و A13(MAFF-02-10266) وكانت أعلى نسبة نمو للجذور الشعرية هي 93% من السلالة MSU440 و 89% من السلالة ATCC15834 على التوالي (Sharafi et al., 2014). ونجحت الدراسة التي قام بها الباحثون في أحداث التحول الوراثي لنبات البابونج الألماني ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes*، وأبدت الأنسجة المحولة وراثياً نسبة تكوين الجذور الشعرية بلغت 100% واستحدثت كالسها تفوقاً بعد 7 أيام وتفوقهما في محتواهما من المركبات الثانوية المهمة للنباتات عن تلك غير المحولة (Yuling et al., 2023). وأيضاً حققت زيادة في إنتاج مركب الأبجيين (Apigenin) في الجذور الشعرية والنباتات المحولة وراثياً باستخدام تقانة PCR.

5.2 بلازميدات Ri المحفزة للجذور الشعرية

البلازميدات هي جزيئات وراثية من الحمض النووي DNA البلازميدي موجودة في البكتريا مستقلة وذاتية التضاعف معزولة عن الحمض النووي الكروموسومي DNA وتحمل مجموعة من الجينات التي تساعد في تحسين صفات البكتريا، ومع ذلك فإن البكتريا تستطيع العيش من دونها (Lian et al., 2022). تمتاز البلازميدات بقدرتها على الانتقال من خلية إلى أخرى وكذلك بإحتوائها على تتابعات من القواعد تمكن الباحثين من استبدالها أو حذفها مما يتيح إمكانية استغلالها في مجال الهندسة الوراثية، تتضمن عملية التحول الوراثي انتقال قطعة T-DNA من البلازميد البكتيري إلى الخلية النباتية المجروحة وتضمينها في مادتها الوراثية متبوعة بنجاح تعبيرها (Nabi et al., 2022). وعند التعبير الجيني لجينات T-DNA المُضمنة

يتسبب حدوث اختلال هرموني داخل المنطقة المصابة ينتج عنها جذور شعرية من مناطق الجرح، أو في مناطق أخرى، والتي تمثل أولى علامات التحول الوراثي.

وتقسم بلازميدات Ri إلى منطقتين اليمنى RT-DNA الحاوية على الجينات المسؤولة عن تكوين الجذور الشعرية (*Vir-gene*)، إذ تشفر هذه الجينات إلى العديد من البروتينات التي لها دور مهم في عملية التحول الوراثي وتستحث بمركب Acetosyringone والجزيئات السكرية والفينولية وايضاً تضم الجينات المسؤولة عن تكوين الساييتوكينات (*iaaM*, *iaaH*) (Gelvin et al., 2022). أما المنطقة اليسرى LT-DNA فتحتوي على الجينات الخاصة ببناء الاحماض الامينية غير الاعتيادية كمصدر للطاقة والسكريات للبكتريا والأوبينات opines ومجموعة الجينات المسؤولة عن تكوين الأوكسينات *aux1*, *ayx2* (Mashiguchi et al., 2019).

وتتواجد جينات *rol* في المنطقة اليسرى من منطقة Transfer DNA (T-DNA) للبلازميدات Ri التي يبلغ حجمها 200 kpb وتشير إلى موضوع الجذور Root locus التي لها دور في إنتاج الجذور الشعرية Hairy root والعديد من المركبات التي تضم جينات *rol A*, *B*, *C*, *D* وتكون كل مجموعة من هذه الجينات مسؤولة عن حالة معينة عند تعبيرها جينياً في النسيج (Habibi et al., 2018).

أشار (السنجري، 2022) إلى التحول الوراثي بجينات *rol A* على نبات زهرة الشمس *Helianthus.annuus* L. بإستعمال السلالة البكتيرية ATCC 15834 *Agrobacterium rhizogenes* وتضمنها داخل الجينوم عباد الشمس بطريقة الحقن المباشر . ونجح الباحثون (Nguyen et al., 2022) بإستحداث الجذور الشعرية بنسبة 100% على نبات الخيار بإستعمال السلالة البكتيرية *Rhizobium rhizogenes* K599 بطريقة الحقن المباشر بعد 5 أيام. وتوصلت دراسة أخرى إلى إحداث التحول الوراثي لنبات البروكلي *Brassica oleracea.var.italica* بإستخدام الحقن المباشر لبلازميدات

Ri المعزول من البكتريا *A. rhizogenes* من سلالتها R1601 و ATCC15834، وأظهرت النتائج تفوق بلازميدات Ri ذات التركيز 1084.4 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ للسلالة البكتيرية ATCC 15834 في نسبة التحول الوراثي، إذ بلغت نسبة التحول الوراثي 66.6% مقارنة مع السلالة الأخرى R1601 إذ بلغت نسبة التحول الوراثي لهذا النوع 54.5 % (الحديدي، 2020). وتمكنت الدراسة التي قام بيها الباحثون (Szoke et al., 2021) من التحول الوراثي لنبات البابونج وتميزت سلالات من البكتريا *A. rhizogenes* هي ATCC1534, A4, R1601 ومن ثم إحداث الجذور الشعرية لهذه الأنسجة ومن خلال قياس مركب Farnesene الطبي بتقانة GC-MS تفوقت على نظيراتها الاعتيادية في كمياته لتبلغ (400، 100، 400) دالتون غلى التوالي.

6.2 الجذور الشعرية

تتصف الجذور الشعرية بأنها نتوءات من بشرة الجذر التي تشكلت نتيجة أصابتها ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes*، وتظهر الجذور الشعرية من أماكن الجروح بعد نجاح التعبير الجيني لقطعة T-DNA المنقولة الى جينوم النبات من بلازميدات Ri (Chilton et al., 2022)، وتتميز هذه الجذور بسرعة نموها وغازاتها وعدم إعتماها على وسط معين، أو مكونات معينة من الأوساط ونموها عكس الجاذبية الأرضية (Gelvin, 2009). وتعمل الجذور الشعرية على إنتاج الانزيمات والبروتينات، والمعالجة النباتية وإنتاج النباتات المعدلة وراثياً بصفات مرغوبة مثل مقاومة الأمراض والظروف البيئية القاسية (Singh, 2020). وقدرتها الكبيرة على التحلل الأنزيمي بسبب أملاكها أنزيمات عديدة مثل peroxidas, oxygenase, lactase (Talano et al., 2012; Telke et al., 2011)

ووجهت الجذور الشعرية للعديد من المجالات مثلاً إنتاج مركبات الأيض الثانوي وزيادتها، التغيرات الوراثي للأنواع النباتية، إنتاج النباتات المعدلة وراثياً بصفات مرغوبة مثل زيادة الإنتاج، تحسين نوعيته،

مقاومة الأمراض والظروف البيئية القاسية، المعالجة النباتية للملوثات، ودراسات تكوين العقد الجذرية وفهم المسارات الحيوية والكيميائية وغيرها (Gutierrez-Valdes et al., 2020).

ووجد بأن الجذور الشعرية لنبات العنقية الوردية أو صنوبرية الورد (*Catharanthus roseus*) لها قدرة ذاتية على التخلص من بعض أنواع المعادن الثقيلة. ووجدت إحدى الدراسات قدرة الجذور الشعرية للبطاطا الحلوة على ربط المركبات الفينولية بالمواد الخلوية القطبية (سكريات أو بروتينات) وكذلك مع المواد الغير القابلة للذوبان التي تشمل الجدران والأغشية وبذلك توفر إمكانية للتخلص من ضررهم (Khoshnami et al., 2023). وكذلك أشارت أحد الدراسات التي أجراها (Ling et al., 2020) قدرة الجذور الشعرية لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. على الإفراط في التعبير عن الجينات *McGDS1*, *McGDS2*, *McGDS3* إلى تراكم Y-molecular في الجذور الشعرية. وأظهرت نتائج الدراسة التي قام بها الباحثون (Zolfaghari et al., 2020) إلى قدرة الجذور الشعرية لنبات الحلبة المحولة وراثياً ببكتريا *A.rhizogenes* A4 على زيادة إنتاج الدايسوجنين مقارنة مع كمياته المتكونة في أوراق النبات البري. وانتجت الجذور الشعرية الناتجة من التحول الوراثي ببكتريا *A.rhizogens* MSU440 لنبات *Seutellaria bornmuelleri* نظاماً حيوياً ناجحاً لإنتاج كميات كبيرة من الفلافونويد (Gharari et al., 2020).

7.2 التفاعل التسلسلي البوليميرازي (PCR) Polymerase Chain Reaction

هو عملية حيوية غايتها تضخيم جزء صغير جداً من الحمض النووي الكروموسومي DNA الذي يعمل كقالب template باستخدام بادئات primer لجينات معينة وضمن وقت قصير بالإعتماد على جهاز التدوير الحراري thermocycler الذي يوفر درجات حرارة مثالية ما بين 55-98 سيليزية الذي يعمل إلى إنفصال شريطي الحمض النووي DNA إلى شريطين منفردين ، أن الأنزيم الأساس لنجاح عملية PCR هو

أنزيم (Taq polymerase). وتعد تقنية التفاعل البوليمراز المتسلسل PCR صورة مُبسطة عن تضاعف الحمض النووي DNA داخل جسم الكائن الحي (Rahman *et al.*, 2013).

وتعد هذه هي إحدى التقنيات الجزيئية المُختبرية خارج جسم الكائن الحي *in vitro* الذي اخترعه العالم Kary mullis سنة 1983 الذي حصل فيها على جائزة نوبل في الكيمياء للتحري عن الجينات في المادة الوراثية بإستخدامه هذه العملية. وتستخدم هذه التقنية في التشخيص الجيني، والهندسة الوراثية، وتشخيص الأمراض، والبصمة الوراثية، وتحديد النسل وغيرها (Louie *et al.*, 2000). وتتم هذه العملية بثلاث مراحل رئيسية :

مرحلة التفكيك الحراري/المسخ Denaturation

وفيها يتم رفع درجة الحرارة الى 94-98 درجة مئوية لمدة 3-5 دقائق تقريباً وذلك لفك الشكل المزدوج للحمض النووي DNA عن طريق فك الأواصر الهيدروجينية بين القواعد التكميلية (Paolella, 1998).

مرحلة التصاق البادئات primers annealing

ويتم خفض درجات الحرارة التفاعل الى 50-65 درجة مئوية مما يسمح بارتباط البادئات إلى قالب DNA أحادي الشريط (Wu *et al.*, 1991).

مرحلة التمديد/الإستطالة Extension

تعتمد درجة الحرارة في هذه الخطوة على أنزيم DNA بوليميراز المُستخدم إذ تكون درجة حرارة نشاط الأنزيم Taq polymerase المُتلى عند 75-80 درجة مئوية وعادة مايتم إستخدام درجة حرارة 72 درجة مئوية مع هذا الأنزيم، في هذه الخطوة يقوم أنزيم DNA بوليميراز بتركيب شريط DNA جديد مكمل لقالب

الحمض النووي عن طريق إضافة dNTPs المكملة للقالب لمدة دقيقه او أكثر على حسب طول المنطقة المراد تضخيمها (Wilson and Walker, 2004).

وينتج عن هذه المراحل الثلاثة دورة كاملة لتضاعف الحمض النووي DNA الأصل، وينتج عنه تكوين نسختان كل منهما على سلسلة من القالب الأصلي وسلسلة جديدة مكملة لكل منهما (Payne., 2016). وتُمكن هذه الطريقة في اكتشاف العدوى المبكرة من قبل الأطباء والباحثين وإتخاذ الإجراء المناسب للقضاء على انتشار الفيروس (Corman *et al* ., 2020). ودلت النتائج التي قام بيها الباحثان (الملاح و محمد، 2018) نجاح التعبير الجيني لجينات *rol C*, *rol B* في أنسجة كالس المعلمات الخلوية الناتج من الزراعة المرافقة لكالس سيقان نبات الجزر مع الناقل البلازميدي Ri لبكتريا *A.rhizogenes*. وتوصلت الدراسة التي قام بها (الجبوري ، 2024) الى دلائل جزيئية قاطعة بتقانة PCR لتواجد جينات *rol B* في انسجة الافرع الخضرية الناتجة من تلقيح البادرات والنبات البري بتركيز مختلفة من الناقل البلازميدي Ri لبكتريا *A.rhizogenes*. وايضاً توصلت النتائج للدراسة التي قام بها (السنجري، 2020) الى نجاح التعبير الجيني وتكوين الجذور الشعرية لنبات زهرة الشمس بدلالة بيولوجية جزيئية لوجود *rol A* في احداث التحول الوراثي للنبات بالناقل البلازميدي Ri لبكتريا *A.rhizogenes* بتقانة PCR.



الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3. المواد وطرائق العمل

نُفذت كافة التجارب في مختبر زراعة الأنسجة النباتية / قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل وتضمنت تعقيم البذور وزراعتها لإنتاج بادرات المعقمة لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. واستخدامها لإستحداث الكالس وتكوين مزارع الكالس وإدامتها، وإنتاج النبيتات المتميزة منها، وتلقيح الأجزاء النباتية لإستحداث مزارع الجذور الشعرية في ظروف معقمة خالية من الملوثات داخل كابينة النقل ذات الجو المعقم (Laminar air flow cabinet, spain 2000 bio) وذلك بعد مسح أرضيتها وجدرانها بالكحول الأيثلي 70% وتشغيلها لمدة 30 دقيقة قبل البدء بالعمل لضمان توفير تعقيم تام. في حين عُقمت الأوساط الغذائية، والزجاجيات، والماء المقطر، وجميع الأدوات المُستخدمة بواسطة جهاز المعقم (Autoclave; Gallen Kamp; UK) في ظروف 121 درجة سيليزية وضغط 1.02 كغم /سم² لمدة 20 دقيقة.

1.3 الأوساط الغذائية المُستخدمة

أُستخدمت الأوساط الغذائية الآتية:

1.1.3 وسط MS الغذائي (Murashige and Skoog, 1962)

استخدم وسط MS الصلب الخالي من مُنظمات النمو لزراعة بذور نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. وتنمية بادراته وإستحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية بعد تزويده بمُنظمات النمو وإنتاج النباتات الكاملة ، وتكوين الجذور الشعرية من تلك القطع بعد تلقيحها بالناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 . جُهِز الوسط بشكل مسحوق من شركة Classon, USA بمكوناته الكبرى والصغرى (الملحق، 1). وحُضر بإذابة 4.9 غم منه في أسطوانة مدرجة مع حجم مناسب من الماء المقطر مع إضافة 30 غم من

السكروز بشكل جيد، أكمل الحجم النهائي الى واحد لتر من الماء المقطر، ثم ضبط الأس الهيدروجيني pH (Sartorius, Germany) للوسط عند 5.8 ثم بإضافة 8.0 غم من الأكار (Powder agar, Solar bio, China) بالتسخين بالهزاز المغناطيسي (Hotplate magnetic stirrer; Lab Tech; Lms 1003; Korea) لغرض جعل الوسط صلباً وبعد الوصول الى درجة الغليان تم توزيعه بمقدار 30 مل في قناني زجاجية سعتها 100مل وغُلقت فوهات القناني بشكل جيد بورق الألمنيوم ثم عُمت بجهاز المعقم autoclave ليتم استخدامها لاحقاً.

2.1.3 وسط YEB (Yeast Extract Beef Medium) (Vincent, 1970)

أُستخدم هذا وسط لتنمية السلالة البكتيرية *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 وأدامتها، أُستخدم كذلك بحالته السائلة لتحضير المعلق البكتيري لهذه السلالة لغرض عزل بلازميدات Ri منها. حُضّر هذا الوسط بإضافة مكوناته الرئيسية بشكل منفرد (الملحق، 2) في حجم معين من الماء المقطر وأُضيف لها الأكار وبعد إذابتها أكمل الحجم إلى واحد لتر بالماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني pH الوسط عند 6.8 – 7.2، كذلك أُستعمل بحالته الصلبة في أطباق قطرها 9.0 سم بإضافة الأكار بوزن 8 غم لتر⁻¹ لإدامة السلالة البكتيرية.

3.1.3 وسط الاكار المغذي Nutrient Agar

أُذيب 38 غم منه في حجم مناسب من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى لتر واحد من الماء المقطر عند الاس الهيدروجيني 7.0 . سخن الوسط بوساطة الهزاز المغناطيسي مع الحرارة ثم عقم الوسط بجهاز المعقم ثم صب في اطباق بتري قطرها 9.0 سم وحفظ لحين الاستخدام، ولتحضير وسط الاكار المغذي السائل، أُجريت ذات الخطوات السابقة ولكن بإستخدام الوسط الخالي من الاكار وحفظ الوسط في قناني زجاجية سعة 25 مل (Tille, 2017).

2.3 تعقيم بذور نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. سطحياً ونمو بادرانها

جُهزت بذور البابونج *Matricaria chamomilla* L. من الأسواق المحلية لمدينة الموصل في العراق وعُقمت سطحياً بغمرها في محلول الكحول الأيثلي 96% لمدة دقيقتين مع التحريك المستمر ثم في 2% من محلول هايوكلورات الصوديوم NaOCI (القاصر التجاري) لمدة 5 دقائق. وغُسلت بالماء المقطر ثلاث مرات ١ دقيقة ووضعت على ورق الترشيح لغرض التجفيف (Ling et al., 2020). وضعت البذور المعقمة في قناني ذات سعة 100 مل تحتوي على 30 مل من وسط MS الصلب بمعدل 4-5 بذور، وغُلقت فوهاتنا بوساطة رقائيق الألمنيوم ثم حُفظت العينات في غرفة الزرع Culture room بظروف الظلام بدرجة حرارة 24 ± 2 سيليزية وبعد أنبات البذور (ظهور الجذير والرويشة) الذي استغرق أربعة أيام نُقلت الى ظروف التعاقب الضوئي 16 ساعه ضوء بشدة اضاءة 2000 لوكس و8 ساعات ظلام .

3.3 إستحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات البابونج *Matricaria chamomilla* L.

رُفعت بادران البابونج *Matricaria chamomilla* L. السليمة من وسط MS بعمر 15 يوماً ثم قُطعت سيقانها تحت الفلقية بطول 1.5-2 سم تقريباً ووضعت كل 3 او 4 قطع على سطح قنينة زجاجية حاوية على 30 مل من الوسط الغذائي المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل من NAA و BA و 2,4-D، جميع العينات حُفظت في غرفة الزرع بذات الظروف الفقرة (2.3) السابقة .

4.3 إنتاج مزارع الكالس للسيقان تحت الفلقية وإدامتها

فُصلت كتل الكالس المتكونة من قطع السيقان تحت الفلقية ووضعت في قناني زجاجية تحوي ذات المكونات السابقة أعلاه وأعيدت زراعتها كل 25 يوماً لتفادي نفاد الوسط الغذائي وجفافه أو تغير لون الكالس الى اللون الاسود ولغرض إنتاج مزارعه.

5.3 تمايز الأفرع الخضرية وتجذيرها

استُصلت الأفرع الخضرية المتكونة تلقائياً من الإدامة الدورية لمزارع الكالس النامية على أوساط غذائية الحاوية على منظمات النمو NAA و BA و 2,4-D و بتركيز 1.0 ملغم لتر⁻¹ على التوالي بطول 1.5-2 سم الحاوية على أوراق صغيرة بوساطة مشروط حاد مُعقم ، ثمَّ غُرست قاعدة كل فرع بصورة قائمة في 30 مل من MSO الصلب ، وحُصّنت العينات في غرفة النمو وبالظروف المُشار إليها سابقاً.

6.3 إحداث التحول الوراثي لأنسجة نباتات البابونج *Matricaria chamomilla* L.

بالحقن المباشر بالناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا *A. rhizogenes* ATCC15834:

1.6.3 مصدر السلالة البكتيرية *A. rhizogenes* ATCC15834 وإدامتها

جهزت السلالة البكتيرية *Agrobacterum rhizogenes* ATCC 15834 من مختبر زراعة الأنسجة النباتية في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل والمُجهزة أساساً من (Prof.Dr.Jutta Ludwig-Mueller, Technical University Dresden, Germany). أخذت مُستعمرة بكتيرية مُنفردة منها بواسطة أبرة معقمة ووضعت داخل 20 مل من الوسط Yeast Extract Beef medium (YEB) السائل ضمن قناني مُعقمة حُصّنت العينات في الحاضنة الهزاة (New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison. N.J.USA) Shaking incubator في

الظلام في درجة 28 سيليزية وسرعة 130 دورة / دقيقة لمدة 24، 48، 72 ساعة كل منها في قنينة منفردة، نُبذت كل منها بإستخدام جهاز الطرد المركزي (Centrifuge, Labnet international, Inc. Glopal. USA) لمدة 15 دقيقة وسرعة 1500 دورة / دقيقة. أهمل الراشح وأُضيف حجم من وسط YEB السائل إلى البكتريا المترسبة. وأُخذ 1.5 مل من كل مزرعة بكتيرية سائلة ومن الوسط السائل لتصفير الجهاز، ثم قيست الكثافة الضوئية O.D عند الطول الموجي 600 نانوميتر بإستخدام المطياف الضوئي (Smartspace 3000 Spectrophotometer Bio-Rad USA) لكل منهما وكانت كثافتهما (1.131، 1.023، 10×0.852 خلية مل⁻¹) على التوالي (Atlas et al., 1995) وأُستخدمت هذه المزارع لاحقاً في عملية عزل البلازميدات.

2.6.3 عزل الناقل البلازميدي pRi-DNA من السلالة البكتيرية *A. rhizogenes* ATCC15834

أُخذ 1.5 مل من مزارع بكتيريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 السائلة والتي حُضنت سابقاً لمدة 24، 48، 72 ساعة لكل منهما على حدى (الفقرة 1.6.3) ، ووضعت بشكل منفرد في أنبوبة أبندروف ونبذت مركزياً بجهاز الطرد المركزي (Jouan BR 311, England) بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق (Dhahi et al., 2011) ، أُضيف 0.1 مل من المحلول I (الملحق، 3) إلى الراسب بعد التخلص من الراشح ومُزجت محتوياتها جيداً بإستخدام المازج الكهربائي Vortex ثم أُضيف إليها 0.2 مل من المحلول II (الملحق، 3)، مُزجت الأنابيب بتقليبها من 5-10 مرات، ثم وضعت بعدها في حمام ثلجي لمدة 10 دقائق. بعد ذلك أُضيف 0.15 مل من المحلول III (الملحق، 3) الى المزيج ومزجت ايضاً بتقليبها من 10-15 مرة ونبذت مركزياً لمدة 10 دقائق بسرعة 12000 دورة/دقيقة. اخذ 0.4 مل من الطبقة العليا ووضعت في أنابيب أبندروف جديدة وأُضيف إليها 0.8 مل من 95% كحول أثيلي ونبذت مركزياً لمدة 10 دقائق بسرعة 12000 دورة/دقيقة، ثم غسل الراسب وذلك بإضافة 0.2 مل من الكحول الأثيلي 70% وأُعيد ترسيبه بنبذه مركزياً لمدة 5 دقائق

وأزيل الكحول بعناية بدون تحطيم راسب DNA. ثم جُففت الأنابيب وذلك بوضعها مقلوبة على ورق الترشيح لمدة 15 دقيقة، وبعد ذلك عُلق الراسب بإضافة 50 مايكروليتر من المحلول IV (الملحق، 3) وحُفظت البلازميدات في درجة 4 سيليزية لحين إستعمالها لاحقاً لغرض التلقيح، وأُجريت خطوات عزل البلازميد بالإعتماد على الطريقة المتبعة من قبل (Sambrook et al., 1989).

7.3 تلقيح قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات البابونج *Matricaria chamomilla* L.

سُحبت بأدرات نبات البابونج النامية 15 يوم وأُخذت قطع سيقانها تحت الفلقية بطول 1.5 سم تقريباً ولُقحت بالحقن المباشر بإستخدام أبرة needle دقيقة (من نوع insulin syringe) التي سبق وأن غُمرت قمتها بالمعلق البلازميدي الذي تم عزله من بكتريا *A. rhizogenes* ATCC15834 النامية 72,48,24 ساعة لكل منها على حده، ووُخِزت قطع السيقان عند النهايات العليا وجوانبها (Al-Mallah and Mohammed, 2012). ولُقحت عينات المقارنة بالماء المقطر المعقم ثم غُمرت بشكل قائم داخل وسط MSO الصلب وحُضنت جميع العينات في حاضنة النمو تحت ظروف أضاءة خفيفة 400 لوكس وبدرجة حرارة 24 ± 2 سيليزية.

8.3 إنتاج مزارع الجذور الشعرية المتكونة على قطع السيقان وإدامتها

استئثملت الجذور الشعرية المتكونة في مواقع التلقيح ونُقلت منفردة أو بشكل خصل بطول 3-4 سم ووُضِعَتْ في أطباق بتري (9 سم) تحوي 20 مل من وسط MSO الصلب. وأُديمت هذه الجذور بإعادة زراعتها كل 15 يوماً بتجزئتها الى قطع مناسبة ونقل كل جزء إلى أطباق بلاستيكية تحوي الوسط ذاته (Mohammed and Masyab, 2020)، وحُفظت جميعها في غرفة الزرع بذات الظروف السابقة.

9.3 التحري الجزيئي عن التحول الوراثي لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. بالناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا *A.rhizogenes* ATCC15834:

وتضمنت الخطوات الآتية:

1.9.3 إستخلاص الحمض النووي الكروموسومي DNA من أنسجة نبات البابونج المتوقع تحولها الوراثي بالناقل البلازميدي

تمت عملية أستخلاص وتنقية الحمض النووي الكروموسومي DNA بإستعمال محاليل العدة الجاهزة (Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit. Favorgen, USA) للعينات الآتية:

1- الجذور الاعتيادية للبادرات (المقارنة).

2- الأفرع الخضرية للبادرات (المقارنة) بعمر 15 يوماً.

3- الجذور الشعرية الناتجة من التلقيح بالناقل البلازميدي المعزول من البكتريا المحضنة 24 ساعة

4- الأفرع الخضرية المتكونة من أماكن التلقيح من (3) بعمر 25 يوماً.

جرت عملية الإستخلاص حسب الخطوات الآتية:

1- سُحق 100 ملغم من العينات المذكورة أعلاه كل منها على حده بإستخدام الهاون الخزفي

وبوجود النيتروجين السائل liquid nitrogen للحصول على مسحوق جاف، ووضع المسحوق

في أنبوبة أبندروف Eppendorf tube ذات سعة 1.5 مل وأضيف إلى كل منها 400

مايكروليتر من المحلول المنظم FAPG1 و 8.0 مايكروليتر ومن الأنزيم RNase A، ثم

مُزجت محتويات الأنابيب جيداً بإستعمال المازج الكهربائي vortex وثُرِكت لمدة دقيقتين في

درجة حرارة المختبر.

2- وضعت الأنابيب في الحمام المائي لمدة 18 دقيقة وبدرجة حرارة 65 سيليزية مع الرج المستمر من 2-3 مرات.

3- رُفُعت الأنابيب وزودت بإضافة 130 مايكروليتر من المحلول المنظم FAPG2 ومُزجت جيداً وبعدها حُفظت في وعاء يحتوي على ثلج لمدة 5-6 دقائق.

4- نُقِلَت محتويات الأنابيب إلى داخل عمود الترشيح Filter column الموجود داخل أنبوب التجميع Collection tube ونُبِذَت مركزياً بجهاز الطرد المركزي المُبرّد بسرعة 18000 دورة دقيقة⁻¹ ولمدة 3 دقائق، وسُحِبَت المادة المُتبقية بإستعمال ماصة دقيقة Micropepette ووضعت في أنابيب جديدة وأضيف لها 600 مايكروليتر من محلول FAPG3 (الحاوي على الأيثانول) مع رجّها يدوياً وبشكل جيد.

5- أُخِذَ 750 مايكروليتر من مزيج العينة ووضع بهدوء داخل أنبوب التجميع الجديد الحاوي على عمود FAPG ونُبِذَت مركزياً بسرعة 18000 دورة دقيقة⁻¹، ثُمَّ أزيلت العينات وتم إهمال الرائق وأعيدت عملية نبذها مركزياً بالظروف نفسها.

6- أُضيف 400 مايكروليتر من محلول الغسل Buffer W1 Washing إلى عمود Spin column ونُبِذَت العينات مركزياً بسرعة 18000 دورة/30 ثانية ثُمَّ أُهْمِلَ الراسب.

7- أُضيف 650 مايكروليتر من محلول الغسل Buffer W2 (الحاوي على الأيثانول) وأعيدت عملية النبذ المركزي للعينات بسرعة 18000 دورة/30 ثانية ثُمَّ أُهْمِلَ الراسب كذلك.

8- أُعيد النبذ المركزي مرة أخرى بنفس الظروف السابقة لإزالة بقايا الكحول من عمود الترشيح spin column لمدة ثلاث دقائق أخرى بالسرعة السابقة نفسها، ثم وضع عمود FAPG في أنبوبة أبندروف Eppendorf tube وأضيف إليها 60 مايكروليتر من محلول Elution Buffer وترك لمدة دقيقة بدرجة حرارة المختبر.

9- وأخيراً نبذت مركزياً بسرعة 18000 دورة دقيقة⁻¹ ، وبعد الإنتهاء أُستخلص الحمض النووي DNA وحُفظت بدرجة 20- سيليزية لحين إستعمالها.

2.9.3 تقدير تركيز ونقاوة الحمض النووي الكروموسومي DNA

تم تقدير تركيز الحمض النووي الكروموسومي DNA المُستخلص من أنسجة نبات البابونج المُختلفة ونقاوته طيفياً عند الطولين 260-280 نانومتر (Dhahi et al., 2011) بإستخدام جهاز النانودروب (Spectrophotometer, Bio drop, England) بأخذ واحد مايكروليتر من الحمض النووي المعزول DNA من كل عينة على إنفراد ووضعت في المنطقة المحددة للقراءة لقياس الأمتصاصية.

3.9.3 الترحيل الكهربائي للحمض النووي الكروموسومي DNA المُستخلص من

أنسجة نباتات البابونج *Matricaria chamomilla* L. المختلفة في الأكاروز 1%

أخذ 1.0 غم من الأكاروز (Agarose, LE, Analytical Grade, Promega, USA) ووضع في فلاسك ذات سعة 100 مل من محلول TBE بقوة X1 المُحضّر من محلول TBE بقوة 10 X (10x) (TBE Extended Range, Bio Rad, USA) وتم إذابته بشكل جيد بإستعمال الفرن الكهربائي (LG ms 1040 SM – Korea)، ثمّ زود بإضافة 3.0 مايكروليتر من الصبغة الحمراء الآمنة (Safe Gel Stain Dye Addbio, Korea)، وسُكب الأكار المذاب بهدوء لتجنب حدوث فقاعات في الحوض Tray الخاص بتحضير الهلام داخل جهاز الترحيل الكهربائي (Electrophoresis mini, USA)، ثم ثُبت المشط البلاستيكي في طرف الهلام وثُرِكَ ليتصلب للحصول على الحفر Wells، بعد تصلّب الأكاروز أُزيل المشط بحذر وأضيف محلول 1X TBE لحوض جهاز الترحيل بحيث يُغمر الهلام جيداً، وبدأ تحميل 5.0 مايكروليتر من عيّات الحمض النووي الممزوجة مع 3.0 مايكروليتر من محلول صبغة التحميل Loading buffer (USA Blue/ Orange loading Dye,)

6x, Promega) وبعد إكمال تحميل العينات في مواقعها، تم تشغيل جهاز الترحيل الكهربائي عند فرق جهد 80 فولت ولمدة 45 دقيقة، وعند الإنتهاء رُفعت طبقة الهلام وتم تصويرها بجهاز التصوير Gel documentation (Gel DocTM EZ Imager, Bio Rad, USA) المزود بالأشعة فوق البنفسجية U.V لإظهار الحُزم المنفصلة من الحمض النووي المعزول من عيّنات الدراسة وسهولة تصويرها (Weigand *et al.*, 1993).

4.9.3 التفاعل التسلسلي البوليميرازي PCR لإثبات التحول الوراثي في نباتات البابونج *Matricaria chamomilla* L. بالناقل البلازميدي Ri

أُسْتُخْدِمَت عيّنات الحمض النووي DNA المُستخلصة من أنسجة نباتات البابونج المختلفة (الفقرة 1.9.3) في التحري عن تواجد جين *rol A* ذي الحجم الجزيئي 248 bp فيها والذي موقعه في منطقة Transfer-DNA (T-DNA) للحمض النووي البلازميدي وذلك بإستعمال البادئي المتخصص specific primer ذو التتابع:

F=5-CGTTGTCGAATGGCCCAGACC-3

R=5-CGTAGGTCTGAATATTCCGGTCC-3

(Rahimi *et al.*, 2008) ثم مُزجت مكونات PCR لإجراء التفاعل (الجدول، 1) وبعد أكتمال مزيج

التفاعل تم إدخال أنابيب التفاعل في جهاز التدوير الحراري (Bio Thermal Cycler, T 100TM)

(Rad, USA) لأجراء التفاعل التضاعفي (Sambrook *et al.*, 1989).

الجدول (1): مكونات مزيج تفاعل PCR

المكونات	التركيز النهائي	الحجم لعينة واحدة (مايكروليتر)
Premix (Mgcl ₂ buffer 10x + Kcl + Tris-Hcl + dNTPS + Taq DNA Polymerase Enzym	_____	5.0
Forward specific primer	10 بيكامول مايكروليتر ⁻¹	1.0
Reverse specific primer	10 بيكامول مايكروليتر ⁻¹	1.0
Template DNA	50 نانوغرام مايكروليتر ⁻¹	4.0
Double-distilled, sterile water	_____	9.0
الحجم النهائي		20

وأجري هذا التفاعل تحت ظروف معينة ومُنْتَخَبَة كما موضحة في (الجدول، 2).

الجدول (2): عدد الدورات وظروفها للتفاعل التسلسلي البوليميرازي PCR

(Yassein *et al.*,2021)

هدفها	الظروف		عدد الدورات	
	درجة الحرارة (مئوية)	المدة الزمنية (دقيقة)		
المسخ الاولي لشريط الحمض DNA	95	10	دورة واحدة	
أستكمال مسخ الشريط المزدوج	95	1	الاولى	35 دورة بواقع ثلاث دورات
أرتباط البادئ بقالب الحمض DNA	55	1	الثانية	
أستطالة البادئ	72	1	الثالثة	
أستكمال أستطالة البادئ	72	10	دورة واحدة	

وبعد إنتهاء برنامج التفاعل رُفِعَت الأنابيب وأُخِذَ 5.0 مايكروليتر من نواتج كل منها ووضعت في حُفَر طبقة الهلام (تركيز الأكاروز 1%) المُحَضَّر مُسَبَقاً، ثُمَّ وضع 3.5 مايكروليتر من الدليل الحجمي للحمض 100 bp (DNA λ) DNA في الحفرة الطرفية، ورُحِلَت العينات ثُمَّ صُوِّرَت حُزَم الحمض النووي DNA المضخمة.

10.3 تقدير تركيز مُركّبي الأبيجينين Apigenin والكامازولين Chamazulene في

الأنسجة المُختلفة لنبات البابونج بواسطة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء-High

performance liquid chromatography (HPLC):

1.10.3 تحضير مُستخلصات أنسجة نبات البابونج وتهيتها للقياس بجهاز HPLC

تم تقدير تركيز مُركّب الأبيجينين Apigenin ومركب الكامازولين Chamazulene بالإعتماد على الطريقة التي اتّبعتها الباحثون (Haghi *et al.*, 2014) في مُستخلصات أنسجة الأفرع الخُضرية المأخوذة من:

1- نبات البابونج البري.

2- بادرات البابونج النامية على وسط MSO الصلب بعمر 15 يوماً.

3- المتميزة من كالس السيقان تحت الفلّقية للبادرات النامية على وسط MS الصلب الحاوي

NAA و BA و 2,4-D بتركيز 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل منهما.

4- الناتجة من تلقيح قطع بادرات البابونج بالناقل البلازميدي المعزول من البكتريا المحضنة 24

ساعة بعمر 25 يوماً.

حيث جُففت العيّنات أعلاه بإستعمال الفرن الكهربائي الهوائي بدرجة حرارة 40-45

سيليزية ولمُدّة 24 ساعة كل منها على انفراد ، وأُخذ وُزَن 100 ملغم مادة جافة من كل

عينة. وطُحِنَت في هاون خزفي للحصول على مسحوقها الناعم، ووضعت في ورق

مخروطي زجاجي سعته 50 مل وأُضيف إليها 10 مل من محلول بتروليوم

أيثّر (Petroleumether)، ونُقلت العينات إلى داخل جهاز الصوتنة

(Ultrasonic Cleaner, Germany) وبقوة 50 KHz لمُدّة ساعتين وبدرجة حرارة الغرفة، رُشحت بجهاز الترشيح الفراغي (Filtration under vacuum) بإستعمال ورق ترشيح ذو قطر فتحاته 0.45 مايكروميتر، وجُفِّت العيّنات بإستعمال الفرن الكهربائي الهوائي بدرجة حرارة 45 سيليزية ولمُدّة 24 ساعة للحصول على مُستخلص جاف، ثُمَّ أضيف إليها 2.0 مل من محلول Acetonitrile (BDA VWR, Chemical)، ورُشحت المُستخلصات بإستعمال مُرشّحات خاصة (Syringe Filter, Cellulose Acetate) ذات قطر 0.22 مايكروميتر (Nova, Teach International, Inc, USA) للحصول على عيّنات جاهزة لقياسها بإستعمال جهاز HPLC.

2.10.3 تحضير المحلول القياسي لكلا المركبين الأبجيينين Apigenin والكامازولين Chamazulene

تم تحضير المحلول القياسي للمركبين الأبجيينين والكامازولين بإذابة 0.5 ملغم من كل مسحوق لكل المركبين القياسين (apigenin and chamazulene powder, sigma) في 1.0 مل من محلول الميثانول على حده بحيث يصبح التركيز النهائي 0.5 ملغم مل⁻¹ قبل التحليل، ورشح المحلولين بإستخدام مرشح Millipore بقطر 0.45 مايكروميتر. (Qureshi *et al.*, 2019).

3.10.3 تقدير تراكيز كلا المركبين بإستخدام جهاز HPLC

أُستعمل جهاز HPLC (Shimadzu, Nexera-40, Japan) الموجود في مختبرات كلية الصيدلة/ جامعة نينوى في مدينة الموصل والمتضمّن مضخّة مضاعفة لغرض فصل وقياس تركيز المركّبات الفعّالة بواسطة الطور المتحرك Mobile Phase والمكوّن من Acetonitrile : Water of a 0.1% aqueous acetic acid بنسبة 40:60 (حجم:حجم) عند الأس الهيدروجيني 3.2، ووضعت المحاليل قبل إستعمالها في جهاز الصوتنة (Ultrasonic cleaners, Elmasonic S, Germany) لمُدّة 10 دقائق للتخلص من الفقاعات الهوائية، (لان

وجودها يؤثر على دقة قياس العينات أثناء عمل الجهاز) وتم إجراء الفحص باستعمال عمود

الفصل المعدني Column C18 4.6*250 mm 5µm particle size

مواصفات العمود:

النوع: Column C18

القطر الداخلي: 4.6 ملم

طول العمود: 250 ملم

المادة المعبأة: حبيبات السليكا

الحشوة: حبيبات ذات قطر 5.0 مايكروميتر

وتمت عملية القياس بوضع 5.0 مل من محلول المُستخلص النهائي للعينات المذكورة في خلية القياس كل منها على حدة ووضعت في المكان المخصص لها داخل جهاز HPLC، إذ إن عملية سحب العينة من الخلية وحقنها داخل الجهاز تتم آلياً بوساطة الجهاز نفسه وبحجم 20 مايكروليتر، وسرعة جريان الطور المتحرك 1.0 مل دقيقة⁻¹، ودرجة حرارة الفصل 40 سيليزية، وقد أستمّلت الأشعة فوق البنفسجية UV Detector عند الطول الموجي 245 نانوميتر، وبعد الحصول على نتائج جميع العينات تمت مقارنة زمن الاحتباس (RT) Retention time ومساحة المنحني Area لكل عينة مع عينة الأبيجينين والكامازولين القياسية ثمّ عينات الدراسة مع عينات المقارنة، وتم حساب تركيز مادة كلا المركبين في كل عينة باستعمال المعادلة الآتية (Heuskin et al., 2009):

$$\text{تركيز المركبين (مايكروغرام مل}^{-1}\text{)} = \left(\frac{\text{مساحة المنحني للعينة} \times \text{تركيز المادة القياسية}}{\text{مساحة المنحني للمادة القياسية}} \right) \times \frac{\text{عدد مرات التخفيف}}{\text{وزن العينة}}$$

11.3 تحضير مُستخلصات أنسجة نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L.

المُختلفة لتحديد دورها في تحديد نمو الأنواع البكتيرية قيد الدراسة :

حضر المستخلص الكحولي من العينات كالآتي:

1.11.3 تحضير المُستخلص الكحولي بالأيثانول 75%

مُزج 10 غرام من مسحوق الأفرع الخُضرية للنبات البري و النباتات المحولة وراثياً للعينات المحضرة في الفقرة (1.10.3) كل منها على حده مع 50 مل من الأيثانول تركيزه 75%، ثم وُضعت في جهاز Soxhlet apparatus لمدة 6 ساعات عند درجة 40-60 سيليزية. رشح المعلق من خلال ورق الترشيح Whatman, No.1، ثم تم تبخيره تحت ضغط مُنخفض بإستخدام المُبخر الدوار عند درجة 40 سيليزية، بعدها رشح بإستخدام Millipore بقطر 0.22 ميكرومتر، وركز ليصبح التركيز النهائي 200 ملغم/مل (Sah et al., 2022).

2.11.3 التحري عن قُدرة المُستخلصات الكحولية للمجموع الخُصري لنبات البابونج

Matricaria chamomilla L. البري والمحولة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri قيد

الدراسة ضد نمو أنواع بكتيرية مُختلفة:

أُستخدمت طريقة الانتشار بالحفر Agar well Diffusion Method للتحري عن قدرة المُستخلصات الكحولية المُحضرة في الفقرة السابقة على الأجناس البكتيرية (*E.coli* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Enterococcus columbae* ، *Klebsiella pneumonia*) إذ والمزودة من

مُختبرات قسم علوم الحياة /كلية العلوم / جامعة الموصل وحسب الطريقة الآتية :

1- أُخذت حملة لوب لكل من الأجناس البكتيرية أعلاه على إنفراد وفرشت بطريقة التخطيط على أطباق تحوي ذات أوساطها، لغرض تنشيطها وحُضنت بدرجة حرارة 37 سيليزية ولمدة 24 ساعة .

2- أُخذت مستعمرات فتية من كل جنس من الاجناس النامية في النقطة 1، ولقحت في 5.0 مل من وسط الأكار المغذي داخل قناني زجاجية معقمة وحُضنت في درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة وقورنت مع أنبوب ماكفرلاند (0.5 Mcforland turbidity stundarl) الذي يعادل $10^8 \times 1.5$ خلية مكونة للمستعمرات / مل.

3- أخذ 0.1 مل من أنواع اللقاحات في النقطة 2، ونُشرت كل منها بإنفراد بوساطة ماسحة قطنية مُعقمة على طبق يحوي وسط الأكار المغذي وبجميع الاتجاهات مع تدوير الطبق، وتركت لمدة 10-15 دقيقة لتجف في درجة حرارة الغرفة.

4- في كل طبق تم عمل أربع ثقوب متساوية الأقطار (5 ملم) باستخدام مثقاب الفلين المعقم ووضع داخلهم 25 مايكروليتر في الحفرة الأولى، 50 مايكروليتر في الحفرة الثانية، 75 مايكروليتر في الحفرة الثالثة، 100 مايكروليتر في الحفرة الرابعة من أحد أنواع المُستخلصات الكحولية المحضرة سابقاً (الفقرة 1.11.3) (Santosh and Satya, 2010).

حُضنت الأطباق بدرجة 37 درجة مئوية ولمدة 18-24 ساعة وسُجلت النتائج بظهور مناطق رائقة حول الحُفر وحسبت المسافة للتنشيط.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

The Results and Discussion

النتائج والمناقشة

1.4 إنتاج نبيتات البابونج *Matricaria chamomilla* L. من تمايز كالس السيقان

تحت الفلقية في الوسط الزراعي

1.1.4 كفاءة التعقيم السطحي للبذور وإنتاج البادرات المعقمة

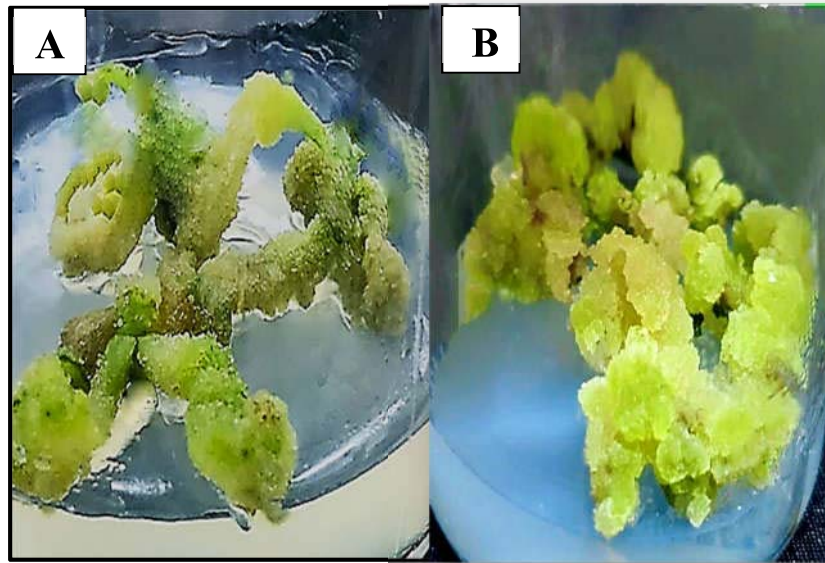
أدت طريقة التعقيم السطحي لبذور البابونج المُستخدمة في هذه الدراسة نجاحها بدلالة الحصول على بذور معقمة بنسبة أنبات 90%، التي أنتجت بادرات سليمة عند زراعتها في وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو والغير ملوثة (الشكل، 1). إن عملية إنتاج أي بادرات سليمة وذات حيوية جيدة يعتمد على كفاءة عملية التعقيم السطحي للبذور وزراعتها في الوسط بدون حدوث تلوث (Sen et al., 2013).



الشكل (4): بادرات البابونج *Matricaria chamomilla* L. نامية في وسط MSO الصلب بعمر 10 أيام.

2.1.4 إستحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات البابونج *Matricaria chamomilla* L. وتكوين مزارعه:

أدى وضع قطع السيقان تحت الفلقية المستأصلة من بادرات البابونج *Matricaria chamomilla* L. على وسط MS الصلب والمزود بإضافة 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل من NAA، BA و 2,4-D إلى إستحداث الكالس منها بنسبة بلغت 100% بعد سبعة أيام من الزراعة ومن نهاياتها المقطوعة لتنتج كتل من الكالس، هذه الكتل تطورت لتغطي جميع قطع السيقان بعد 12 يوماً (الشكل 5،A)، وواصلت بالنمو لتنتج مزرعة كالس نموذجية بعد 25 يوماً (الشكل 5،B). ويتميز الكالس ببنيته الهشة ولونه الأخضر المصفر. مع إنعدام إستحداثه عند وضع القطع النباتية على وسط MSO.



الشكل (5): إنتاج مزارع الكالس من نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. في وسط MS الصلب المزود بأضافة 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل من NAA، BA و 2,4-D بعد 25 يوماً

A- كتل الكالس المتكونة من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات البابونج بعد 12 يوماً.

B- استمرار نمو الكتل من (A) وزيادة في الحجم لتنتج مزرعة نموذجية بعد 25 يوماً.

إن تواجد الأوكسينات في الوسط الغذائي MS الصلب بمفرده او ممزوجاً مع الساييتوكاينيات له دور بارز في تشجيع إستحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية لنباتات العائلة النجمية (Azis *et al.*, 2015). وهذا ما وجدته الدراسة التي قام بها الباحث Khan وآخرون (2010). ان إستحداث الكالس من القطع النباتية المختلفة لنبات البابونج يتأثر بنوع الجزء النباتي ومصدره وعمره وتركيز مُنظمات النمو المُضافة الى الوسط لذلك يلعب التوازن ما بين تركيز مُنظمات النمو المُختلفة دوراً مهماً في إستحداثه ونموه حيث يعتمد سلوك تقطيع النبات لإنتاج الكالس على التوافق بين محتواها الداخلي من الهرمونات ومُنظمات النمو المُضافة إلى الوسط ، إذ كانت نسبة تجديد الكالس المشتقة من البراعم الورقية والبراعم الجانبية مختلفة بشكل كبير وتم تسجيل أعلى تجديد من الكالس المشتق من الأوراق (77%). يمكن القول أن تجديد البراعم يعتمد بشكل كبير على النباتات المُستأصلة والمادة الوراثية النباتية (Ahmad *et al.*, 2021). وإن إضافة منظم النمو 2,4-D إلى الوسط الغذائي بتركيز أعلى من المستوى المطلوب قد يكون تأثيره سلبياً على عمل الأنزيمات المسؤولة عن الجدار الخلوي في الخلايا مما يؤثر على أنقسامها وتكوين الكالس (Taiz and Zeiger, 2006).

كشفت نتائج الدراسة التي قام بها Mohammad (2018) عن الدور الأيجابي لمنظمات النمو K, NAA في استحداث ونمو الكالس من قطع سيقان تحت الفلقية لبادرات البابونج، إذ أُستخدم NAA بتركيز (0، 1.0، 2.0، 4.0) ملغم لتر⁻¹ مُتداخلة مع K بتركيز (0، 0.5، 1.0، 2.0) ملغم لتر⁻¹ ، وكانت أفضل الأوساط تشجيعاً هو وسط MS الحاوي على 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل من K، NAA بنسبة بلغت 93.26%. كذلك أظهرت نتائج التي قام بيها (محمد و رشيد، 2022) قدرة الأوراق الكاملة لنبات اللافندر *Lavandula angustifoli* على إستحداث الكالس عند زراعتها على وسط MS مدعم بأضافة 3.0 ملغم لتر⁻¹ NAA و 10 ملغم لتر⁻¹ BA بعد 20 يوماً بنسبة بلغت 96% إذ فشلت وسط MSO في تشجيعه للكالس

وتمكنت الدراسة التي قام بها (محمد و يحيى، 2018) في الحصول على نباتات الترمس الأبيض *Lupinus albus* الكاملة من تمايز كالس سيقان تحت الفلقية لبادراتها، إذ نجح تفوق وسط MS الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر⁻¹ NAA في إستحداث الكالس بنسبة 90% بعد 20 يوماً من الزراعة على غيره من الأوساط المنتخبة.

3.1.4 التكوين التلقائي للأفرع الخُضرية من كالس السيقان تحت الفلقية لبادرات البابونج

Matricaria chamomilla L.

من النتائج التي تميزت بها الدراسة أنه بعد سبعة أيام من إعادة الزراعة الأولى للكالس على ذات الوسط الغذائي بدأت تراكيب خضراء بالظهور بشكل تلقائي والتي ازدادت بالنمو والتطور لاحقاً الى أفرع خُضرية بإعداد كبيرة بلغ معدلها 12/ قطعة كالس وبمعدل طول 3.6 سم وبنسبة 90% (على أساس 40 قطعة كالس أعيد زراعتها) بعد 30 يوماً (الشكل، 6) وكانت الأفرع الناتجة جيدة النمو حاملة أوراقاً حقيقيّة.



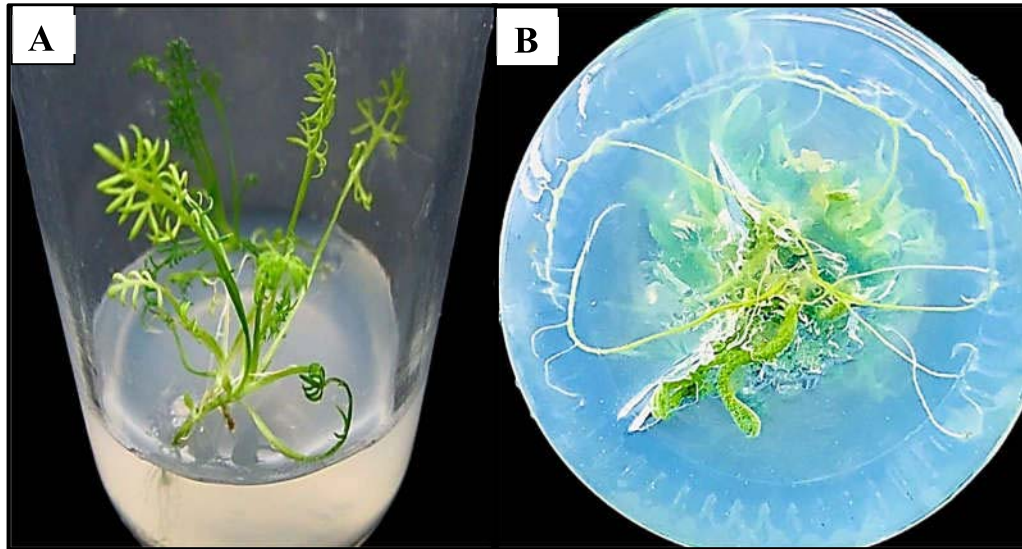
الشكل (6): التمايز التلقائي لأفرع الخُضرية من قطع الكالس المزروع على وسط MS الصلب

الحاوي 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل من NAA، BA، 2,4-D بعد 30 يوماً.

ويعزى التكوين التلقائي للأفرع الخضرية على نفس وسط إستحداث الكالس الى التركيب الوراثي للنوع النباتي المستخدم فضلاً عن كفاءة خلاياه في تكوين الأفرع الخضرية، فضلاً عن مستويات الهرمونات النباتية داخل الأنسجة والتي حفزت التمايز (Rajoriya *et al.*, 2018). وايضاً القدرة الكامنة الذاتية للخلايا والتي تسمح لكل خلية بإنتاج نبات كامل (Parray *et al.*, 2018).

4.1.4 تجذير الأفرع الخضرية المتكونة تلقائياً

أعطت الأفرع الخضرية المتكونة تلقائياً والتي استؤصلت ووضعت عمودياً داخل وسط MSO بالكامل سهولة في التجذير وبنسبة بلغت 100% لجميع الأفرع المختبرة بعد 7-10 ايام. إذ بدأت ببروز نموات بيضاء صغيرة وتطورت إلى تكوين جذور حقيقة لتصبح أسمك وأطول ومتشابكة مع بعضها (الشكل، 7) لتنتج نباتاً كاملاً في الوسط الغذائي .



الشكل (7): تكوين نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. الكامل من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية وتجذيره في الوسط الزراعي.

A- تكوين الجذور لأحد الأفرع المستأصلة من كالس نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. في وسط MSO بكامل قوته التركيبية بعد 15 يوماً.

B- تطور الجذور في (A) بعد 21 يوماً من نشوئها وتكوين نبات البابونج الكامل في الوسط الزراعي.

إن سهولة تجذير الأفرع الخضرية المزروعة في وسط MSO الخالي من منظمات النمو قد يُفسّر كفاءة أنسجة نبات البابونج المتكوّنة -على بناء الهرمونات (الأوكسينات) داخلياً بكميات كافية للتجذير (Esfandiari and Ghavidel , 2015)، فضلاً عن تركيب الوسط الغذائي التي اتضح كفايتها في دعم القطع النباتية للتجذير وتكوين النبيتات في الوسط (Handayani , 2014) .

2.4 التحوّل الوراثي لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. بالناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا *A. rhizogenes* ATCC15834 وإثباته جزيئياً

1.2.4 تقدير تركيز ونقاوة الناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا *A.rhizogenes* ATCC15834

أشارت نتائج تقدير تركيز ونقاوة الحمض النووي البلازميدي (pRi) المعزول من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 والمُحضنة مسبقاً 24، 48، 72 ساعة على إنفراد إلى تفوق مدة التحضين 24 ساعة في تركيز بلازميدات المعزول وبلغ 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ (الجدول 3)، في حين كانت أدنى قيمة تركيز في مدة تحضين 72 ساعة البالغة 1043.12 نانوغرام مايكروليتر⁻¹، بلغت نقاوة الناقل لفترات التحضين الثلاثة على التوالي 1.7، 1.8، 1.8.

الجدول (3): تركيز ونقاوة الناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا *A. rhizogenes* ATCC15834 المُحضنة مسبقاً لفترات 24، 48 و 72 ساعة

النقاوة	التركيز (نانوغرام مايكروليتر ⁻¹)	مدة التحضين (ساعة)
1.7	1214.32	24
1.8	1159.24	48
1.8	1043.12	72

2.2.4 نشوء الجذور الشعرية من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات البابونج *Matricaria chamomilla* L. المُلقحة بالناقل البلازميدي pRi لبكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834

أظهرت النتائج كفاءة الناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا *A. rhizogenes* ATCC15834 في تشجيع تكوين الجذور الشعرية من قطع السيقان تحت الفلقية عند حقنها المباشر وينسب متباينة بالإعتماد على اختلاف تراكيز البلازميد المُستخدم (الجدول، 4).

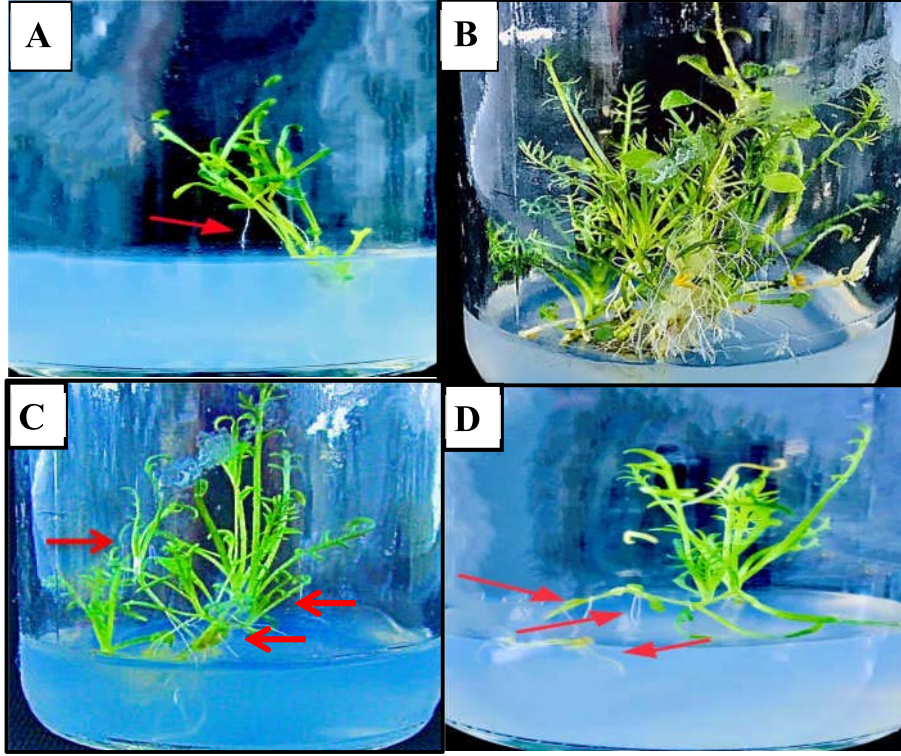
الجدول(4): نشوء الجذور الشعرية من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات البابونج *Matricaria chamomilla* L. المُلقحة بالناقل البلازميدي Ri لبكتريا *A. rhizogenes* ATCC15834 بعد 28 يوماً.

تركيز الناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC 15834 (نانوغرام مايكروليتر ⁻¹)	اعداد قطع السيقان الفلقية الملقحة/ المستجيبة	نسبة تكوين الجذور الشعرية (%)	عدد الجذور الشعرية/ قطعة	فترة تكوين الجذور الشعرية (يوم)
1214.32	72\90	80	18	7
1159.24	45\90	50	12	20
1043.12	32\90	35.55	5	28
D.W (المقارنة)	0\40	0	0	0

** لُقحت عينات المقارنة (قطع السيقان تحت الفلقية والأوراق) بماء مقطر معقم

وأظهرت بيانات الجدول أعلاه تفوق التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ للناقل البلازميدي في تحفيز تكوين الجذور الشعرية من قطع السيقان تحت الفلقية للبادرات بنسبة وصلت 80% بعد 7 أيام من التلقيح إذ بدأت بظهور نموات بيضاء من أماكن التلقيح أنتجت جذور شعرية (الشكل، 8-A) و ازداد نموها وتفرعها ورافقها تكوين أفرع خُضرية بأعداد بلغت معدلها لكل قطعة ساق ملقحة 11 فرع وبمعدل طول 3.2سم بعد 25 يوماً من التلقيح (الشكل، 8-B). ثم يليه تركيز الناقل البلازميدي 1159.24

نانوغرام مايكروليتر⁻¹ إذ بلغت نسبة تحفيز الجذور 50% (الشكل، C-8)، ومن ثم تركيز 1043.12 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ حيث كان أقل تركيز لتحفيز الجذور الشعرية بلغ 35.55% (الشكل، D-8). وأظهرت النتائج عدم قدرة النباتات المُلقحة بالماء المُقطّر (عَيّنات المقارنة) على نشوء أفرع خضرية.



الشكل (8): نشوء الجذور الشعرية من السيقان تحت الفلقية لبادات البابونج *Matricaria*

chamomilla L. المُلقحة بالناقل البلازميدي Ri لبكتريا *A.rhizogenes* ATCC15834

A- إستحداث الجذور الشعرية بعد 7 أيام من التلقيح بالناقل البلازميدي Ri ذي التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹

B- تطور الجذور الشعرية من (A) بعد 25 يوماً وزيادة تفرعاتها وظهور الأفرع الخضرية من مناطق التلقيح.

C- إستحداث الجذور الشعرية بعد 20 يوماً من التلقيح بالناقل البلازميدي Ri ذي التركيز 1159.24 نانوغرام مايكروليتر⁻¹.

D- أستحداث الجذور الشعرية بعد 28 يوماً من التلقيح بالناقل البلازميدي Ri ذي التركيز 1043.12 نانوغرام مايكروليتر⁻¹.

ويعود نجاح التحول الوراثي في نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. إلى كفاءة طريقة الحقن المباشر في انتقال البلازميدات وتحمل أنسجة نبات البابونج لعملية التلقيح (Clement *et al.*, 2016). ويُعد ظهور الجذور الشعرية أولى علامات التحول الوراثي وبدورها تشير إلى نجاح انتقال جينات T-DNA من الناقل البلازميدي لبكتريا الأكتوبكتريوم إلى الخلية النباتية ومن ثم تضمينه داخل جينومها ونجاح التعبير الجيني إلى مظاهر المرض النباتي وهو الجذور البيضاء (Keshavareddy *et al.*, 2018 ; Gelvin *et al.*, 2009).

ويُعد أحداث الجرح في الخلايا النباتية مفتاحاً للبدء بعملية التحول الوراثي وتعد طريقة الحقن المباشر أحد طرقها المُتبعة مختبرياً التي أثبتت نجاحها في التحول الوراثي مع أغلب الأنواع النباتية ومنها البنجر السكري (Al-Mallah and Al-Nema, 2016)، الجزر (الملاح ومحمد، 2019)، اللهانة (مسيب والملاح، 2019)، البروكلي (Sultan and Mohammed, 2020) ونبات الشيح *A.herba-alba* (الجبوري، 2024).

إن الإختلال الهرموني الذي تسببه الجينات المحمولة على جزيئة T-DNA التي من المرجح أن يستمر تعبيرها الجيني ربما هي السبب في تكوين الأفرع الخُضرية والجذور الشعرية من أماكن التلقيح وكذلك التعبير للجينات المسؤولة عن بناء الساييتوكاينينات *tmr*. وقد وُجدَ أن زيادة تركيز بلازميد Ri المُستعمل في تلقيح القطع النباتية له تأثير مباشر في كفاءة ومعدل التحول الوراثي وتباين استجابة الأجزاء النباتية المُستعملة كذلك (Khan *et al.*, 2018) وهذا ربما يعود إلى قدرة القطع النباتية على تحمل عملية التلقيح المباشر ببلازميدات Ri بالتراكيز المختلفة (Mohammed and Masyab, 2020). كما تتضمن منطقة T-DNA في بكتريا *Agrobacterium* جينات *ipt* المسؤولة عن بناء الساييتوكاينينات في الأنسجة المُصابة عن طريق مسار *de novo*، إذ تعمل هذه الجينات على تشفير بناء أنزيم isopentenyltransferase (IPTase) المسؤول عن بناء مركب

Δ^2 -isopentenyl من N^6 -(Δ^2 -isopentenyl) adenosine-5-monophosphate pyrophosphate ومركب AMP، وأن نجاح التعبير لهذه الجينات في النباتات يؤدي إلى إنتاج كميات كبيرة من السايتوكاينينات (Faiss et al., 1997 ؛ Jordi et al., 2000)، التي بدورها تعمل على تشجيع النموات الخضرية وتحفيز تكوين الأفرع الخضرية لاحقاً.

3.2.4 تكوين مزارع الجذور الشعرية

كشفت الجذور الشعرية المتكونة على قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. نتيجة تلقيحها بتركيز مختلفة من بلازميدات Ri قدرتها على الاستمرار في النمو عند أستئصالها ووضعها منفردة أو بشكل خصل على وسط MSO الصلب بطول 3-4 سم، إذ نجحت الجذور الشعرية المتكونة على قطع السيقان تحت الفلقية نتيجة تلقيحها بتركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ من بلازميدات Ri في الاستمرار في النمو وزيادة تفرعاتها سلبية الجاذبية للأنحاء الأرضي وتكوينها مزارع من الجذور الشعرية التي استوجبت إعادة زراعتها كل 25 يوماً (الشكل، 9).

قد يُعزى إلى طول اجزائها المرستيمية وزيادة معدلات انقساماتها (Meyer et al., 2000)، أو إلى الاختلاف في مجاميع الخلايا المصابة والأعداد المستجيبة ومدى التداخل الناجح بين الجزء النباتي وتوافقها مع تركيز اللقاح البلازميدي (Hu and Du, 2006).



الشكل (9): مزرعة الجذور الشعرية المتطورة من خصلها المستأصلة من اماكن تكوينها على قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات البابونج *Matricaria chamomilla* L. المُلحقة بالناقل البلازميدي Ri لبكتريا *A.rhizogenes* ATCC15834 بتركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ بعد 25 يوماً.

4.2.4 الإثبات الجزيئي لنجاح التحول الوراثي لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. بالناقل البلازميدي Ri المعزول من *A. rhizogenes* ATCC15834 بواسطة التفاعل البوليميرازي المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.2.4.1 تركيز ونقاوة الحمض النووي الكروموسومي DNA المُستخلص من الأنسجة المختلفة لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L.

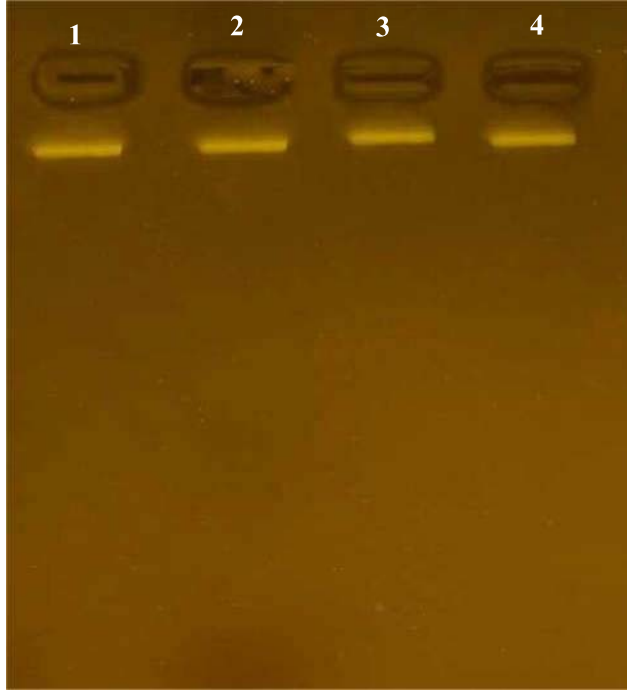
أظهرت بيانات تقدير تراكيز الحمض النووي الكروموسومي المُستخلص من الأنسجة المختلفة لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. تبايناً في تراكيزه (الجدول، 5).

الجدول (5): تركيز ونقاوة الحمض النووي الكروموسومي DNA المُستخلص من الأنسجة المختلفة لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L.

النقاوة	التركيز (نانوغرام مايكروليتر ⁻¹)	مصادر الحمض النووي الكروموسومي DNA المستخلص من نبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L.
1.9	590.67	جذور بادرات البابونج غير المُلقحة (المقارنة)
1.8	657.89	الأفرع الخضرية للبادرات
1.7	994.66	الجذور الشعرية الناتجة من التلقيح بالناقل البلازميدي Ri ذات التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر ⁻¹
1.7	740.54	الأفرع الخضرية الناتجة بفعل التلقيح بالناقل البلازميدي Ri ذات التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر ⁻¹

*بلازميدات Ri ضمن هذا الجدول هي معزولة من الناقل البكتيري ATCC15834 *A. rhizogenes*

إذ تفوق تركيز الحمض DNA لأنسجة بادرات البابونج، الجذور الشعرية والأفرع الخضرية المتكونة نتيجة التلقيح ببلازميدات Ri ذات التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ المعزول من *A. rhizogenes* ATCC15834 إذ بلغ 994.66، 740.54 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ على التوالي مقارنة مع بقية الأنواع. وتراوح نقاوة الحمض DNA ولمختلف الأنواع 1.7 – 1.9، و ظهور حزم كاملة عند ترحيل الحمض النووي على هلام الأكاروز (الشكل، 10).



الشكل (10): الترحيل الكهربائي للحمض النووي الكروموسومي DNA المُستخلص من أنسجة نبات

البابونج المختلفة على هلام الاكاروز 1%

المسار (1): جذور بادرات البابونج غير المُلقحة (المقارنة).

المسار (2): الأفرع الخُضرية لبادرات نبات البابونج.

المسار (3): الجذور الشعرية الناتجة من التلقيح بالناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا

A. rhizogenes ذات التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹.

المسار (4): الأفرع الخُضرية الناتجة بفعل التلقيح بالناقل البلازميدي Ri في (3).

إن سبب زيادة تركيز حمض DNA البلازميدي المعزول من النباتات المُحوّلة وراثياً قد يعود إلى

نجاح عملية أنتقال جينات T-DNA إلى جينوم الخلية النباتية مما حفّز الخلية النباتية على زيادة

الانقسامات المتتالية وإنتاجها الأفرع الخُضرية والجذور الشعرية بأعداد كبيرة مما يستوجب زيادة بناء

الأحماض النووية والأحماض الأمينية والبروتينات (Park et al., 2010).

4.2.4.2 الحمض النووي DNA المضخم بتقانة PCR والمستخلص من الأنسجة المحولة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا *A. rhizogenes* ATCC15834 والأنسجة المقارنة

اظهر فحص الترحيل الكهربائي في الأكاروز 1% لنواتج تفاعل PCR لأنواع الحمض النووي المستخلص من أنسجة نبات البابونج المختلفة دليلاً بيولوجياً جزيئياً لوجود جين *rol A*. إذ اظهرت قطعة الهلام الحاوية نواتج التفاعل التسلسلي البوليميرازي sPCR أنفصال حزمة واحدة ناتجة عن أنواع الحمض النووي DNA المضخم والمستخلص من الجذور الشعرية الناتجة من الأفرع الخضرية المحولة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri والأفرع الخضرية المحولة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri لبكتريا *A. rhizogenes* ATCC15834 بوزن جزيئي 248bp وهو ما يماثل الوزن الجزيئي للبادئ المتخصص لجين *rolA* ، وغياب أنفصال نظيراتها من الحمض النووي DNA المضخم والمستخلص من عينة خلايا جذور والأفرع الخضرية للبادرات غير المحولة وراثياً (المقارنة) (الشكل.11).



الشكل (11): الترحيل الكهربائي لنواتج التفاعل التسلسلي البوليميرازي للحمض النووي لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. على هلام الاكاروز 1% المُضخم و المُستخلص من:

المسار (M): الدليل الحجمي DNA بوزن جزيئي 1500 bp

المسار (1): الجذور الاعتيادية للبادرات.

المسار (2): الجذور الشعرية الناتجة من التلقيح بفعل تلقيح قطع السيقان تحت الفلقية بالناقل

البلازميدي Ri ذو التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ لبكتريا *A.*

rhizogenes ATCC15834

المسار (3): الأفرع الخُضرية للبادرات.

المسار (4): الأفرع الخُضرية المتكونة بفعل تلقيح قطع السيقان تحت الفلقية بالناقل البلازميدي

Ri ذو التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ لبكتريا *A. rhizogenes*

ATCC15834

وهذا يعد دليلاً على نجاح التحول الوراثي لأنسجة نبات البابونج بفعل انتقال جينات T-DNA المتواجدة

على بلازميد Ri من البكتريا الى جينوم نبات البابونج ونجاح التعبير الجيني لها مما أدى إلى ظهور

الجذور الشعرية وإحداث تقلبات في صفاتها وسلوكها في الوسط الغذائي المتمثل بزيادة نموها وإنتاج

الأفرع الخُضرية والجذور الشعرية (Ткаченко et al., 2021). إنَّ اعتماد إختبار PCR على

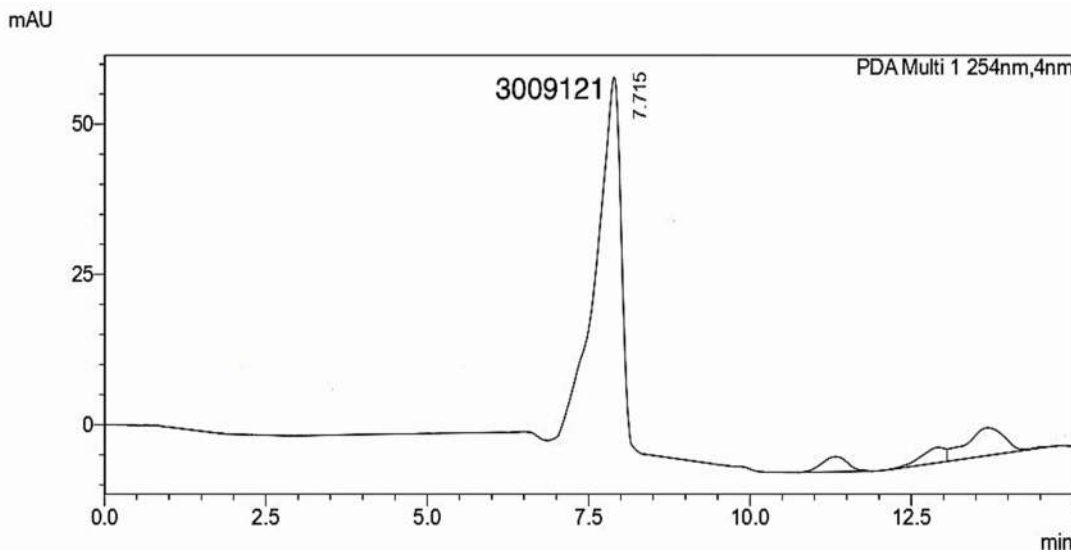
مستوى الجينات وتواجدها في جينوم النبات يعطي دلالة جُزيئية على تواجدها. وهذا ما وجد في عدد من

النباتات ومنها الجزر (الملاح ومحمد، 2019)، البروكلي (الحديدي، 2020)، الحلبة (Mohammed, 2020b)، الفجل (Mohammed, 2020a).

3.4 تقدير تراكيز مركبي الأبيجينين والكامازولين في الأنسجة المختلفة لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. بتقانة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC

1.3.4 مركب الأبيجينين Apigenin القياسي:

شُحِّصَ مركب الأبيجينين وحُددَ تركيزه في الأنسجة المختلفة لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. بإستخدام جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC، إذ أعطت بيانات المنحني الناتج من حقن عينة مركب الأبيجينين Apigenin القياسي بجهاز HPLC أكبر نسبة مساحة لمنحني الأبيجينين التي بلغت 3009121 (الجدول ، 6) عند زمن احتباس Retention time 7.715 دقيقة (الشكل، 12).



الشكل(12): منحني الأبيجينين Apigenin القياسي

2.3.4 الأفرع الخضرية المفصولة من نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. البري ومن بادراته الاعتيادية والمحوّلة وراثياً:

أشارت نتائج فحص HPLC للمستخلصات النباتية للأفرع الخضرية لنبات البابونج

Matricaria chamomilla L. البري، البادرات، المتميزة من الكالس النامي على وسط MS

بإضافة 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل NAA، BA و 2,4-D المحوّل وراثياً بواسطة الناقل البلازميدي Ri

المعزول من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 إلى وجود مركّب الأبجيين

(الجدول، 6)، في جميع العينات المذكورة أعلاه بدلالة زمن الاحتباس Retention time (RT) لكل

منها والمقارب لزمن الاحتباس لعينة مركّب الأبجيين القياسية وبتراكيز مختلفة.

الجدول (6): زمن الاحتباس ومساحة المنحني وتركيز الأبجيين في العينة القياسية ومستخلصات

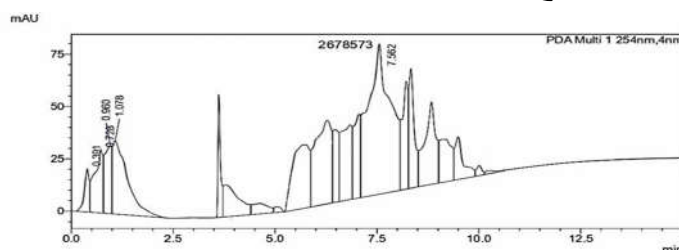
الأفرع الخضرية المختلفة لنباتات البابونج *Matricaria chamomilla* L.

الأفرع الخضرية لنبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. العائدة الى	زمن الاحتباس (دقيقة)	مساحة المنحني	تركيز الابجيين (مايكروغرام مل ⁻¹)
الابجيين القياسي (المقارنة)	7.715	3009121	0.5
النبات البري	7.609	415482	0.0690
البادرات الاعتيادية بعمر 25 يوماً (المقارنة)	7.654	72756	0.01341
المتمايزه من الكالس بعمر 25 يوماً والنامي على وسط MS المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر ⁻¹ لكل من NAA، BA و 2,4-D	7.677	551398	0.0916
المحوّلة وراثياً ببلازميدات Ri ذات التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر ⁻¹ بعمر 30 يوماً	7.562	2678573	0.4451

وسجّل مُستخلص الأفرع الخضرية المحوّل وراثياً بالناقل البلازميدي Ri ذات التركيز 1214.32

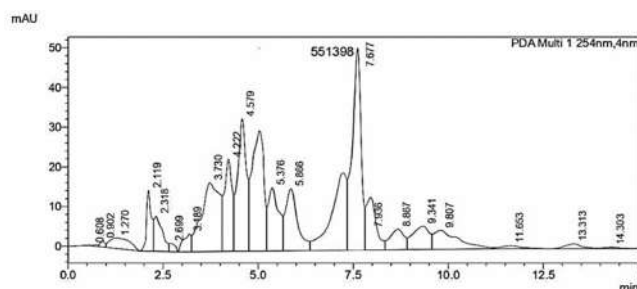
نانوغرام مايكروليتر⁻¹ أكبر مساحة منحني لمركّب الأبجيين الذي بلغ 2678573 عند زمن احتباس

(Rt) 7.562 دقيقة (الشكل، A-13) متفوقاً على بقية العينات في تركيز المركب الذي بلغ 0.4451 مايكروغرام مل⁻¹، ثم يليه مساحة منحنى مُستخلص الأفرع الخُضرية المتمايزه من الكالس بعمر 25 يوماً النامية على الوسط الغذائي MS الصلب الحاوي 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل من NAA ، BA و 2,4-D والتي بلغت 551398 عند زمن احتباس (Rt) 7.677 دقيقة وتركيز للمركب 0.0916 مايكروغرام مل⁻¹ (الشكل، B-13)، يليه نسبة مساحة المنحني للنبات البري التي بلغت 415482 (الشكل، C-13) وتركيز 0.0690 مايكروغرام مل⁻¹ وكان للمجموع الخُضري للبادرات نسبة منحنى أقل بلغت 72756 وبعمر 25 يوماً (الشكل، D-13) وتركيز 0.01341 مايكروغرام مل⁻¹.



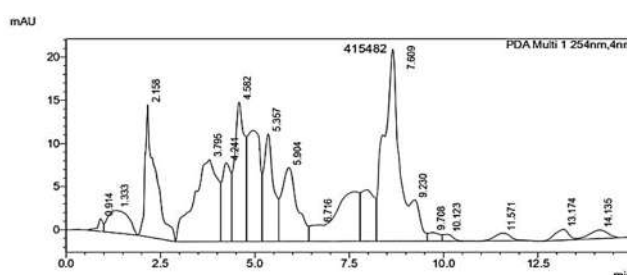
(A): منحنى الأبجيين في الأفرع الخُضرية لبادرات البابونج المحوَّلة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri

ذات التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ بعمر 30 يوماً

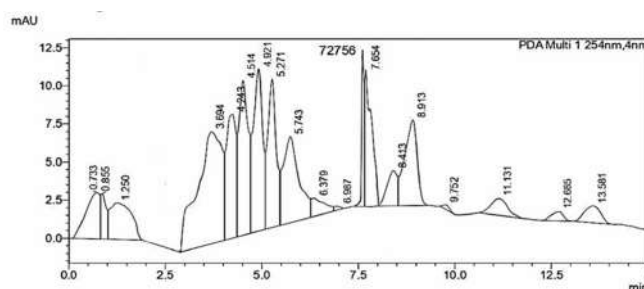


(B): منحنى الأبجيين في الأفرع الخُضرية المتمايهه من الكالس بعمر 25 يوم النامي على وسط

MS الحاوي على 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل من NAA ، BA ، 2,4-D



(C): منحنى الأبجيين للمجموع الخُضري لنبات البابونج البري



(D): منحنى الأبجيين لبادرات الاعتيادية بعمر 25 يوماً

الشكل (13): منحنيات الأبجيين لمستخلصات الأفرع الخُضرية المُختلفة من نبات

البابونج *Matricaria chamomilla* L. مقاسة بجهاز HPLC

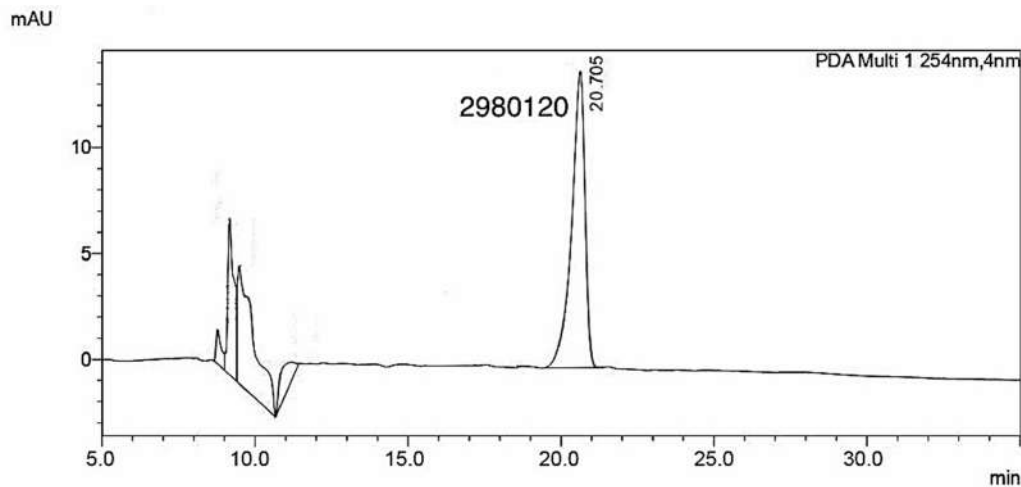
3.3.4 مُركَّب الكامازولين chamazulene القياسي:

أظهرت المُنحنيات الناتجة عن حقن عينات مُستخلصات الأنسجة المُختلفة لنبات البابونج

Matricaria chamomilla L. في جهاز كروماتوكرفيا السائل عالي الاداء HPLC احتوائها على

مركب الكامازولين حيث أبدت أعلى نسبة منحنى بلغت 2980120 (الجدول ، 7) عند زمن احتباس

Retention time (Rt) 20.705 دقيقة (الشكل، 14).



الشكل(14):منحنى الكامازولين Chamazulene القياسي

وأشارت نتائج فحص HPLC إلى وجود مُركَّب الكامازولين في المُستخلصات النباتية من

الأفرع الخُضرية لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. البري، والبادرات الاعتيادية،

والمتمايزة من الكالس النامي على وسط MS المدعم باضافة 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل من NAA ، BA

و 2,4-D والمحوّلة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes*

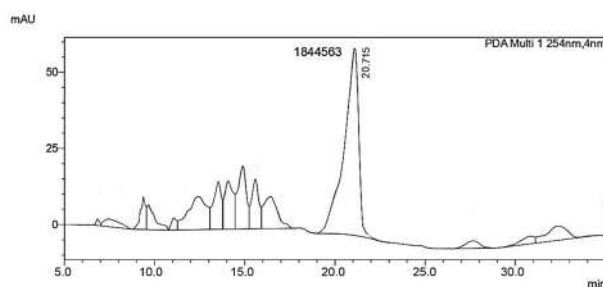
ATCC15834 ، في جميع العيّنات المذكورة أعلاه بدلالة زمن الاحتباس (RT) Retention time

لكل منها وبزمن مُقارب لزمن الأحتباس لعيّنة مُركَّب الكامازولين القياسية(الجدول، 7).

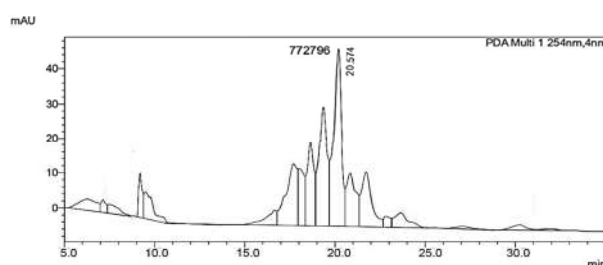
الجدول (7): زمن الاحتباس ومساحة المنحني وتركيز الكامازولين *chamazulene* في العينة القياسية ومُستخلصات الأفرع الخُضرية المختلفة لنباتات البابونج *Matricaria chamomilla* L.

الأفرع الخُضرية لنبات البابونج <i>Matricaria chamomilla</i> L. المفصولة من	زمن الاحتباس (دقيقة)	مساحة المنحني	تركيز الكامازولين (مايكروغرام مل ⁻¹)
الكامازولين القياسي (المقارنة)	20.705	2980120	0.5
النبات البري	20.677	551398	0.102927
البادرات الاعتيادية بعمر 25 يوماً	20.609	415482	0.077556
المتمايزه من الكالس بعمر 25 يوماً والنامي على وسط MS المدعم باضافة 1.0 ملغم لتر ⁻¹ لكل من NAA ، BA و 2,4-D	20.574	772796	0.144255
البادرات المحوّلة وراثياً ببلازميدات Ri ذات التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر ⁻¹ بعمر 30 يوماً	20.715	1844563	0.344318

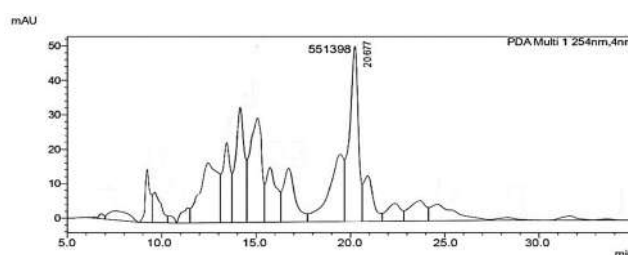
وكما سجّل مُستخلص الأفرع الخُضرية المحوّلة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri ذات التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ أكبر مساحة منحني لمركّب الكامازولين الذي بلغ 1844563 وبعمر 30 يوماً عند زمن احتباس (Rt) 20.715 دقيقة (الشكل، A-15) متفوقاً على بقيّة العينات في تركيز المركب الذي بلغ 0.344318 مايكروغرام مل⁻¹ ، ثم يليه مساحة المنحني مُستخلص الأفرع الخُضرية المتمايزه من الكالس بعمر 25 يوم النامية على الوسط الغذائي MS الصلب الحاوي 1.0 ملغم لتر⁻¹ لمنظمات النمو NAA ، BA و 2,4-D لكل منها على التوالي التي بلغت 772796 عند زمن احتباس (Rt) 20.574 دقيقة وبتركيز 0.144255 مايكروغرام مل⁻¹ (الشكل، B-15)، يليه نسبة مساحة المنحني للنبات البري التي بلغت 551398 (الشكل، C-15) وبتركيز للمركب 0.102927 مايكروغرام مل⁻¹ . وكان للمجموع الخصري للبادرات نسبة منحني اقل بلغت 415482 وبعمر 25 يوماً (الشكل، D-15) وبتركيز 0.077556 مايكروغرام مل⁻¹ .



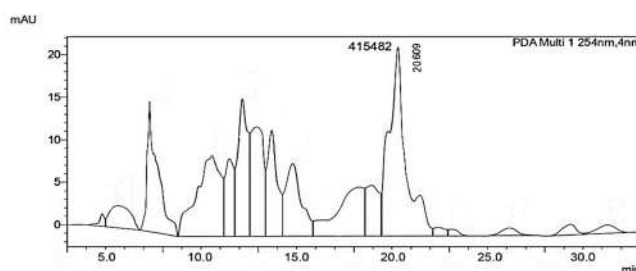
(A): منحنى الكامازولين في الأفرع الخُضرية لبادرات البابونج المحوَّلة وراثياً ببلازميدات Ri ذات التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ بعمر 30 يوماً



(B): منحنى الكامازولين في الأفرع الخُضرية المتمايزة من الكالس بعمر 25 يوم المُدعمة بتركيز 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل من NAA ، BA و 2,4-D



(C): منحنى الكامازولين للمجموع الخُضري لنبات البابونج البري



(D): منحنى الكامازولين للبادرات الاعتيادية بعمر 25 يوماً

الشكل (15): منحنيات الكامازولين لمُستخلصات الأفرع الخُضرية المُختلفة من نبات البابونج

Matricaria chamomilla L. باستعمال HPLC

يُعزى ازدياد مُركب الأبجيين والكamazولين في عَيّات مُستخلصات الأفرع الخُضرية المحوّل وراثياً ببلازميدات Ri المعزول من الناقل البكتيري *A. rhizogenes* بمقدار ضعفين عنها في النباتات غير المحوّل وراثياً مقارنة مع بقية مكوناته الفعالة بسبب نجاح أنتقال جينات *rol* الموجودة ضمن قطعة T-DNA المنقولة من الناقل البكتيري *A. rhizogenes* إلى الخلايا النباتية وأندماجها في مادتها الوراثية مما تؤدي إلى زيادة التعبير للجينات المسؤولة عن مسار البناء الحيوي للأبجيين والكamazولين وكذلك باعتبار أن الأبجيين والكamazولين أحد مركبات الفلافونويد التي تمتلك خصائص بيولوجية ودوائية مُختلفة ذات آثار صحية مفيدة في الحد من مخاطر العديد من الأمراض المُزمنة بما في ذلك السرطان (Fatemeh et al., 2021) وكذلك يعود الى الاستقرار الوراثي وزيادة الأنقسامات الخلوية التي تسببه التعبير الجيني لجينات *rol A* (Lacroix and Citovsky, 2019). ذُكرت الدراسات السابقة تفوّق الأنسجة المحوّل وراثياً ببلازميدات Ri المعزول من الناقل البكتيري *A. rhizogenes* بإنتاجها كميات أكبر من مُركّبات الأيض الثانوية (Mohanlall, 2020).

إذ قامت الدراسة التي أجراها Janmejai و Gupta (2009) بمقارنة جلوكوزيدات الأبجيين في صنفين من البابونج الألماني، الصنف اللبناني والمصري، ووجودها في زهور الشعاع والقرص، وأظهرت المُستخلصات المائية التي تم الحصول عليها من كلا النوعين من البابونج وفرة أبجيين -7-O - جلوكوزيد . وأظهر مستخلص البابونج الميثانولي المُحضر من زهيرات البابونج اللبنانية والمصرية التي تم تحليلها باستخدام HPLC وجود الأبجيين 6.7% في الصنف المصري و 2.3% في الصنف اللبناني. وأظهرت أزهار البابونج القرصية من أصل لبناني محتوى أعلى من أبجيين -7-O - جلوكوزيد (38.5%) مقارنة بالصنف المصري (36.1%). تبين أن الاختلاف الكمي النسبي في مكونات الفلافونويد قد يُعزى إلى العديد من العوامل بما في ذلك الظروف المناخية والتغيرات الموسمية. كما أن لوجود جينات *rol A* ضمن جينوم النبات شجع على بناء تلك المركبات وبالأخص الأبجيين

والكامازولين وهذا ما اثبتته نتائج HPLC التي لها تأثير تثبيطي لنمو الأنواع البكتيرية الممرضة (Suhyun *et al.*, 2020).

وأوضح Nagwa وآخرون (2021) في دراستهم على مُستخلص الخميرة تيين أزيداد مركب الأيجينين بنسبة عالية 20.17% ضعفاً في الأنسجة المحولة وراثياً مقارنة مع تلك الغير محولة وراثياً التي بلغت نسبته 6.88%.

وذكر أن تراكيز المركبات الفعالة في نباتات البابونج تعتمد بشكل كبير على بيئة النبات وحالته الوراثية (Raai *et al.*, 2012). إذ يتم التحكم وراثياً بكمية إنتاج مركبات الأيض الثانوي عن طريق التعبير الجيني للجينات المحمولة على قطعة T-DNA المتضمنة داخل المادة الوراثية لخلايا النباتات المحولة وراثياً (Kim *et al.*, 2013).

4.4 كفاءة المُستخلصات الأيثانول الكحولية للمجموع الخُصري لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. قيد الدراسة في تثبيط نمو أنواع بكتيرية

مُختلفة

أظهرت النتائج تباين كفاءة المُستخلصات الكحولية للأفرع الخُصرية لنبات البابونج والمُحضرة سابقاً (الفقرة 1.10.3) في تثبيط نمو الأنواع البكتيرية (*E.coli* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Enterococcus columbae* ، *Klebsiella pneumonia*). بإختلاف الأحجام المُضافة منها (الجدول، 8) مع تميز الأحجام العالية المُضافة إلى الأوساط في تثبيطها للنمو على حساب الأحجام الأخرى.

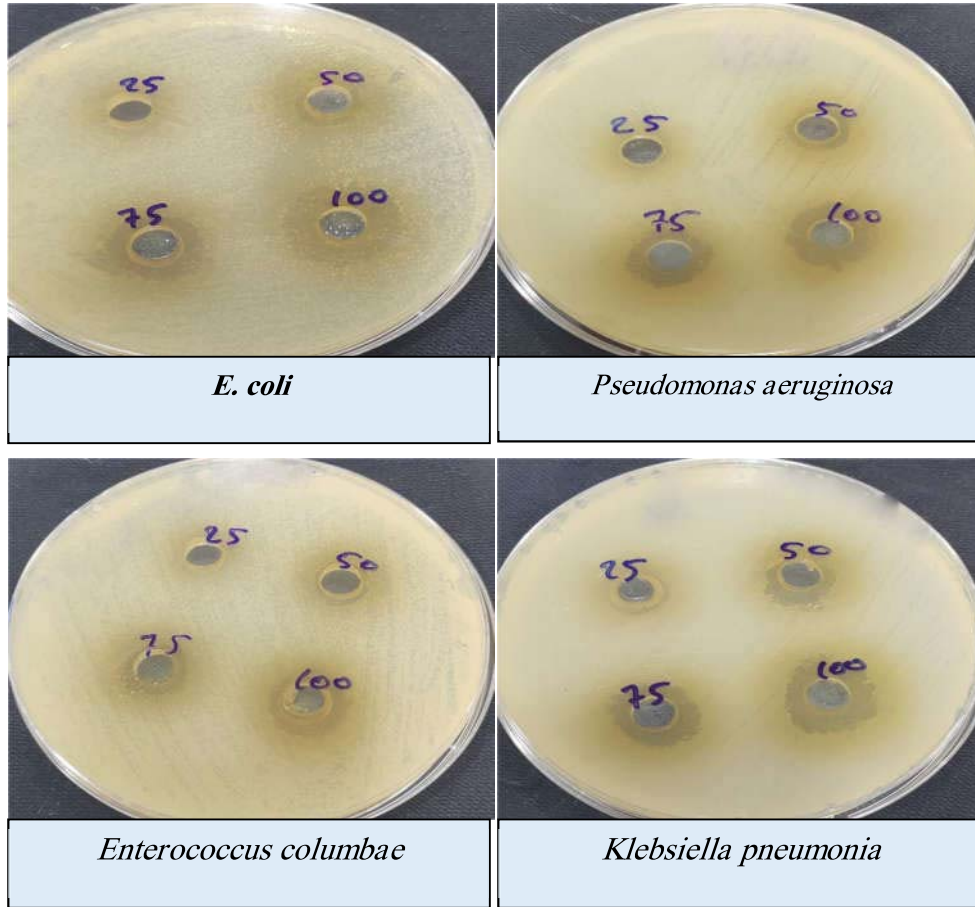
الجدول (8): تأثير أحجام مُختلفة من مُستخلصات الأيثانول الأفرع الخُصرية المحولة وراثياً بالناقل

البلازميدي ذي التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ لنبات البابونج *Matricaria*

chamomilla L. على نمو الأنواع البكتيرية قيد الدراسة

اقطار تثبيط الانواع البكتيرية (ملم)				حجم المُستخلص
<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Enterococcus columbae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	(مايكروليتر)
2	0	2	0	25
4	2	3	3	50
8	4	6	6	75
12	7	9	11	100

وأظهر مُستخلص الأفرع الخُضرية لنبات البابونج المحولة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri ذي التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ والمعزول من بكتريا *A.rhizogenes* ATCC15834 تأثيراً واضحاً في نمو جميع الأنواع البكتيرية مع تفوق الحجم 100 مل وبلغ قطر تثبيط النمو للأنواع (*Klebsiella* ، *Enterococcus columbae* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *E.coli*) (pneumonia) بقطر 11, 9, 7, 12 ملم على التوالي (الشكل، 16) وهو أعلى منطقة تثبيط، يليه باقي الأحجام.



الشكل (16): التأثير التثبيطي للأحجام المختلفة للمستخلص الكحولي للأفرع الخُضرية لنبات البابونج المحولة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri ذو التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ على نمو الأنواع البكتيرية المُختلفة.

في حين أبدت المُستخلصات الكحولية للنبات البري قدرة اقل في تثبيط نمو الأنواع البكتيرية (الجدول، 9) وكانت أفضل الاحجام تثبيطاً هو 100 مل كذلك.

الجدول (9): تأثير أحجام مُختلفة من مُستخلصات نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. البري على نمو الأنواع البكتيرية قيد الدراسة

أقطار تثبيط الأنواع البكتيرية (مم)				حجم المُستخلص (مايكروليتر)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Enterococcus columbae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	
0	0	0	0	25
1	1	0	2	50
4	2	2	5	75
7	4	5	8	100

إذ أن كمية المادة المُستخلصة من النبات لها تأثيرا مباشرا على قدرتها على منع نمو البكتريا وبالتالي فإن زيادة كمية المادة المُستخلصة يمكن أن تزيد من فعالية التثبيط للبكتريا، كما أن المستخلص الكحولي للنبات له القدرة التثبيطية على نمو الأنواع البكتيرية بسبب كفاءة الطريقة بإستخلاص أكبر قدر ممكن من المركبات الفينولية للنبات (Moghaddam et al., 2021 ; Dargere et al., 2018).

وكما أشارت الدراسات إلى أن التأثير المُضاد للبكتريا يعود الى وجود مركبات كيميائية في المُستخلص الكحولي تعمل على قتل البكتريا ومنع نموها كلما زاد التركيز (Wong et al., 2019 ; Imran et al., 2020 ; Yang et al., 2020).

وأظهر جزء الميثانول المعزول من مُستخلصات البابونج أستجابة بيولوجية أعلى في تثبيط نمو البكتريا والتسبب في موت الخلايا المبرمج في خطوط الخلايا السرطانية البشرية المُختلفة مقارنة بجزء البابونج المائي. إذ تمنع جلوكوزيدات الأبيجينين نمو الخلايا السرطانية من خلال فك ارتباط الجليكوسيدات التي

تحدث في الحيز الخلوي لإنتاج الالبيجينين. إذ إن المظهر الدوائي لمستخلص البابونج يعتمد على عملية الاستخلاص، وظروف التخزين التي أثرت على النشاط البيولوجي (Asadi *et al.*, 2020). كما تمتلك الزيوت النباتية الطبيعية صفات علاجية، ولذلك لجأ الباحثون والعلماء إلى استخدامها كبديل للمضادات الحيوية لكون استخدامها يتطلب طرقاً خاصة، إذ إن سوء استخدام هذه المضادات الحيوية يمكن أن يؤدي إلى ظهور البكتيريا المقاومة (Dyar *et al.*, 2017).

وفي دراسة قام بها Alireza (2012) اختبار زيت البابونج ضد سبع سلالات بكتيرية (موجبة الغرام وسالبة الغرام)، وأظهرت النتائج أن النشاط المضاد للبكتيريا الموجبة لصبغة غرام أكبر من النشاط المضاد للبكتيريا السالبة لصبغة غرام.

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات:

1. نجاح تقانة زراعة الأنسجة النباتية في إنتاج نباتات البابونج *Matricaria chamomilla* L. الكاملة في الوسط الزراعي دون الإعتماد على موسم معين.
2. كفاءة تقانة الحقن المباشر في تضمين جينات T-DNA العائدة للناقل البلازميدي Ri المعزول من *A. rhizogenes* ATCC15834 داخل جينوم خلايا النبات بدلائل مظهرية وهي الجذور الشعرية واخرى جزيئية.
3. تقدير تراكيز مركّبي الأبيجينين والكامازولين في أنسجة الأفرع الخضرية مختلفة المصادر وتفقّ كمياتهما في الأنسجة المحوّلة وراثياً بدلالة نتائج تقانة HPLC..
4. الدور الإيجابي للمستخلصات الكحولية للأفرع الخضرية المحوّلة وراثياً من (2) في تثبيط نمو الأنواع البكتيرية (*E.coli* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Enterococcus columbae* ، *Klebsiella pneumonia*).

التوصيات :

- 1- استمرار استخدام تقانة الزراعة النسيجية في اكثار النباتات الطبية الموسمية وعلى مدار السنة.
- 2- اعتماد تقانات فصل للمركبات الفعالة أكثر دقة مثل تقانة HPLC في عزل وتنقية مركبي الأبينين والكامازولين لاستخدامها لاحقاً في المجال الطبي .
- 3- اختبار كفاءة المستخلصات الكحولية لأنسجة نبات البابونج على بعض الفطريات الممرضة وأنواع أخرى من البكتريا.
- 4- استخدام أساليب الهندسة الوراثية لمعالجة الجينات المسؤولة عن زيادة إنتاج المركبات الطبية في النبات.

المصادر

References

المصادر العربية

الجبوري، تميم سليمان (2024). عزل وتشخيص مركب Artemisinin من أنسجة نبات الشيح A.

herba-alba المحولة وراثياً بالناقل البلازميدي Ri. أطروحة دكتوراه، قسم علوم الحياة،

كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

الحديدي، صفوان جاسم سلطان (2020). التحول الوراثي لنبات البروكلي *Brassica oleracea*

var. italica بجينات ببلازميدات Ri المعزول من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes*

بسلالتها R1601 و ATCC15834 وتقدير مركب السلفورافان في أنسجتها المختلفة. رسالة

ماجستير، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

السنجري، اشرف محمد (2022). استقطاب دقائق اوكسيد النحاس النانوية بواسطة أنسجة نباتات

زهرة الشمس المحولة وراثياً بالناقل ATCC15834 *A.rhizogenes*. رسالة ماجستير، قسم

علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

الطائي، عزة عادل (2022). تحديد التعبير لجينات *hsp* و *mapk* في نباتات اللافندر المعرضة

للصدمة الحرارية طويلة المدى والمحولة وراثياً ببلازميدات Ri لبكتريا *Agrobacterium*

rhizogenes ATCC 15834. رسالة ماجستير، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة

الموصل، العراق.

الطائي، نهال عزت (2013). التلاعب الفيزيائي والوراثي لأنسجة السمسم *Sesamum indicum*

L. وتأثيراته في فعالية انزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين والفوليت والزيت. أطروحة دكتوراه، قسم علوم

الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

الملاح، مزاحم قاسم ومحمد، امجد عبدالهادي (2018). الكشف عن جينات *rol B* و *rol C* في انسجة الكالس المشتق من تحضين المعلقات الخلوية للجزر (*Daucus carota L.*) مع

pRi. مجلة علوم الرافدين، 27: 276 - 266.

المهداوي، مثنى محمد ابراهيم (2013). التلاعب الوارثي والكهربائي لنباتات الحلبة *Trigonella foenum graecum L.* مع عزل الدايسجينين والتاريكونيلين من المزارع النسيجية المختلفة.

أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق.

محمد، أمجد عبد الهادي; رشيد، عزة عادل (2022). إنتاج نباتات اللافندر (*Lavandula*

angustifolia) من ألاجنة الجسمية المستحدثة من كالس أوراق بادراتها. مجلة علوم

الرافدين، 31(4): 19-12.

محمد، أمجد عبد الهادي; يحيى، رنا طارق(2018). تمايز نباتات الترمس الأبيض *Lupinus*

albus L. من كالس السيقان تحت الفلجية لبادراتها. مجلة علوم الرافدين، 27(4): 102-95.

مخدي، نور الهدى (2014). استعمال المستخلصات المائية لنباتات *Martricarica pubscens*

و *Pituranthos chioranthos* كمعطرات طبيعية للجبن "امير" ودراسة النشاطات ضد

البكتيريا لزيوتها العطرية، مذكرة لنيل ماجستير في بيولوجيا و فيزيولوجيا النبات، تخصص

تثمين الموارد البشرية، جامعة فرحات عباس، كلية العلوم الطبيعية سطيف، ص 6-8-12-

13.

مسيب، حكمت مصطفى والملاح، مزاحم قاسم (2019). المعالجة الوراثية لإنتاج الساييتوكاينينات في

نباتات اللهانة المعدلة وراثياً وتعويض عدم اضافتها في الوسط. براءة اختراع، الرقم: 5646،

الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية، بغداد، العراق

- Ali , E .H; Ibrahim, K.M and Ismail, M. C.(2009).***In vivo* and *In vitro* Antimicrobial Activity of flower and fallus extracts of *Matricaria chamomilla* L. in The treatment of experimentally - Induced Skin Infections in Mice,B.Sc., Biotechnology/ College of Science, Al-Nahrain University.
- Gomes, C.; Dupas, A.; Pagano, A.; Grima-Pettenati, J. and Paiva, J.A.P. (2019).** Hairy root transformation: A useful tool to explore gene function and expression in *Salix* spp. Recalcitrant to transformation. Front. Plant Sci., 10: article(1427): 1-6.
- Lacroix, B. and Citovsky, V. (2019).** Pathways of DNA transfer to plants from *Agrobacterium tumefaciens* and related bacterial species Annu. Rev. Phytopathol., 25(57): 231–25
- Louie, L.; Matsumura, S. O.; Choi, E.; Louie, M. and Simor, A. E. (2000).** Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 38(6), 217.
- Singh, G. (2020).** Application of fungal elicitation for enhancing production of secondary metabolites by hairy roots cultured in large-scale bioreactors. In Hairy Roots (pp. 209-218). CRC Press
- Abd-Allah, D.; Salah-Eldin, A(2021).** Amerolative influence of chamomile (*Matricaria recutita* L.) on synthetic food additive induced probable toxicity in male albino rats. J. Food Dairy Sci, 12, 161–170.

- Ahmad, A; Ul Qamar, M. T; Shoukat, A; Aslam, M.M; Tariq,M; Hakimian, M and Ahmad, F(2021).**The effects of genotypes and media composition on callogenesis,regeneration and cell suspension culture of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Joyia PeerJ 9, e11464.
- Al-Dabbagh, B; Elhaty, IA; Elhaw, M; Murali ,C; Mansoori ,A.A; Awad, B; Amin A(2019).** Antioxidant and anticancer activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.). BMC Res Notes.;12:3.
- Ali, B .G; Ahmad, J. and Ebrahim T(2020)** . Gene transfer to German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) using cationic carbon nanotubes Scientia Horticulturae 263, 109106,
- Ali, F; Naz, F; Jyoti, S.and Siddique, Y.H(2017).**Health functionality of apigenin. International Journal of Food Properties 20 (6), 1197-1238.
- Alireza, M(2012),** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils of chamomile from Neyshabur, Iran. Journal of Medicinal Plants (5),pp. 820-824,.6 Research Vol.
- Al-Mallah, M. K. and Al-Nema, Q. S. (2016),**"Putative genetically modified callus derived from transformed hairy roots induced on sugarbeet (*Beta vulgaris*) explants by *Agrobacterium rhizogenes* 1601 harbouring Ri plasmid", Iraqi J. Biotech., 11(2), 4,.
- Al-Mallah, M. K. and Mohammed, A. A. (2012).** Transfer of Ri T-DNA genes of *Agrobacterium rhizogenes* R1601 via direct microinjection and Co_cultivation to carrot, *Daucus carota* L. tissue and production of transformed hairy root cultures. *Iraq J. Biotech*, 11, 227-239.
- Al-Mallah, M.K. and Salih, S.M. (2001).** *Agrobacterium* as a natural vector for genetic transformation of *Solanum nigrum* L. plants. Proc 1st.Sci. Conf. Nat. Board for Biotech. Res. 18-19 Sept., Baghdad-Iraq.

- Almemary, A. M. (2020).** Callus induction and differentiation. *Future J. Agric.*, 3:5-9.
- Amiri, S; Sharafzadeh, S. and Ordookhani Ind,K . J(2014).** *Fundament. Appl. Life Sci* 4 (1), 186-188, The effect of gibberellic acid and benzyladenine on growth and essential oils of German chamomile.
- Amit ,S ; Naseef, P. P; Kuruniyan, M. S and Jain, G. K(2022).** Comprehensive study of therapeutic applications of chamomile, *Geeta aggarwal pharmaceuticals* 15 (10), 1284.
- Araújo, T,A.D; De melo,G. J. and Junior, W, S.F (2016).** *Medicinal Plants.* Ulvsses Introduction to Ethnobiology.143-149.
- Asadi, Z. ; Ghazanfari, T. and Hatami, H. (2020).** Anti-inflammatory effects of *Matricaria chamomilla* L. extracts on BALB/c mice macrophages and lymphocytes. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 19(S1):63-73. Doi: 10.18502/ijaa.v19i(s1.r1).2862. PMID: 32534512.
- Atlas, R. M.; Brown, A. E. and Parks, L. C. (1995).** *Laboratory Manual, Experimental Microbiology.* Mosby-Year Book, Inc, USA.
- Azis, N.A ; Hasbullah, N.A. ; Rasad, F.M. ; Daud, N.F. ; Amin, M.A.M. and Lassim, M.M(2015).** "Organogenesis and growth response of *Brassica oleracea* var. *italica* through *in vitro* culture". *Internat. Conf. Agricul., Ecol. Med. Sci. (AEMS-2015)* April 7-8, Phuket (Thailand). 4-6,
- Bahari, Z. ; Sazegari, S. ; Niazi, A. and Afsharifar, A(2020).** , "The application of an *Agrobacterium*-mediated in planta transformation system in a *Catharanthus roseus* medicinal plant. *Czech J. Genet. Plant.Breed.*, 56(1): 34-41 *BMC Plant Biology* 23 (1), 659,.

- Bahramnejad, B., Naji, M., Bose, R. and Jha, S. (2019)** .A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnol. Adv.* 37, 107405.
- Benítez, G.; González-Tejero, M.R. and Molero-Mesa, J(2010).** Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. *J. Ethnopharmacol.*, 129, 87–105.
- Biochem* .46:e13950.
- Bisson, W.; Beiderbeck, R. and Reichling, J. (1983).** The production of essential oil of chamomile cell suspension cultures in various two-phase systems. *Planta Med.* 47: 164-168.
- Boutigny, A. L., Dohin, N., Pornin, D., and Rolland, M. (2020).** Overview and detectability of the genetic modifications in ornamental plants. *Hortic. Res.* 7:11. doi: 10.1038/s41438-019-0232-5.
- Boy, H. I. A.; Rutilla, A. J.; Santos, K. A.; Ty, A. M. T.; Alicia, I. Y.; Mahboob, T. and Nissapatorn, V. (2018).** Recommended medicinal plants as source of natural products: a review. *Digital Chinese Medicine*, 1(2), 131-142.
- Catani, M. V; Rinaldi, F; Tullio, V; Gasperi, V.and Savini, I(2021).**Comparative analysis of phenolic composition of six commercially available Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) extracts: potential biological implications, *International Journal of Molecular Sciences* 22 (19), 10601, 0-2173.
- Chauhan, R; Singh, S; Kumar, V; Kumar, A; Kumari, A; Rathore, S; Kumar, R. and Singh,S(2021).**A Comprehensive Review on Biology, Genetic Improvement, Agro and Process Technology of German Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) *Journals Plants* 11 (1), 29.

- Chilton, M.D; Tepfer, D.A; Petit, A; David, C; Casse-Delbart, F. and Tempé, J(2022).** *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*. 1982;295(5848):432–4. doi: 10.1080/15592324..2097469.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2097469>
- Chimdessa, E. (2020).** Composition and preparation of plant tissue culture medium. *J. Tissue Cult. Bioengin.* 3:120. doi: 10.29011/2688-6502.000020
- Choo, C.Y.; Sulong, N.Y.; Man, F.; Wong, T.W(2012).** Vitexin and Isovitexin from the Leaves of *Ficus Deltoidea* with *in Vivo* A-Glucosidase Inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, 142, 776–78.
- Clement, W.K.F.; Lai, K.S.; Wong, M.Y. and Maziah, M(2016).** ,"Heat and hydrolytic enzymes treatment improved the *Agrobacterium*-mediated transformation of recalcitrant indica rice (*Oryza sativa* L.)" *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 125(1): 183–190,.
- Connor, M. R. and Atsumi, S. (2010).** Synthetic biology guides biofuel production. *BioMed Research International*,.
- Corman, V. M.; Landt, O., Kaiser ; M., Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D. K. and Drosten, C. (2020).** Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3), 2000045.
- Dargère, S; Cormier ,H. and Verdon, R(2018).** Contaminants in blood cultures: importance, implications, interpretation and prevention. *Clin Microbiol Infect.*;24:964-969
- Darqui, F; Radonic, L; Hopp, H; and López Bilbao, M. (2017).** Biotechnological improvement of ornamental plants. *Ornam. Hortic.* 23, 279–288. doi: 10.14295/oh.v23i3.1105.

- Dhahi, S. J.; Al-Asksie, A. H. and Omear, H. A. (2011).** Application of the randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to analyze the genetic variability in species of the fungus *Alternaria*. *J. Raf. Sci*, 22(1), 1-16.
- Dyar, C; Lutte, A; London, B. and Levy, S. R. (2017).** An experimental investigation of the application of binegative stereotypes. *Psychology of Sexual Orientation and Gender Diversity*, 4(3), 314-327
- Esfandiari, T. and Ghavidel, R. A. (2015).** The Effect of Phytohormones on chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Organogenesis. *J. of Pharmacy and Pharmacol.*, 3:338-344.
- Faiss, M.; Zalubilová, J.; Strnad, M. and Schmülling, T. (1997).** Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *The Plant Journal*, 12(2), 401-415. *Frontiers in plant science* 11, 504243, 2020.
- Fan, Y. L. ; Zhang, X. H. ; Zhong, L. J. ; Wang, X. Y. ; Jin, L. S. and Lyu, S. H(2020).** , "One-step generation of composite soybean plants with transgenic roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation", *BMC plant Biol.*, 20(1): 1-11,.
- Fatemeh, Z; Moradi,A. and Davoodpour,M. (2021).** Ecophysiological, anatomical, and apigenin changes due to uptake and accumulation of cadmium in(*Matricaria chamomilla* L.) flowers in hydroponics *Environmental Science and Pollution Research* 28, 55154-55165, 2021.
- Flores-Félix, J. D. ; Menéndez, E.; Peix, A. ; García-Fraile, P. and Velázquez, E.(2020).** " History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium*. *Systematic and Appl". Microbiol.*, 43(1): 126046, .

- Gabbanini, S; Ngwa Neba, J; Matera, R. and Luca Valgimigli(2024).**Photochemical and Oxidative Degradation of Chamazulene Contained in *Artemisia*, *Matricaria* and *Achillea* Essential Oils and Setup of Protection Strategies *Molecules* 29 (11), 2604, <https://doi.org/10.3390/molecules29112604>.
- Gabr, A. M. ; Ghareeb, H. ; El Shabrawi, H. M. ; Smetanska, I. and Bekheet, S. A. (2016).** Enhancement of silymarin and phenolic compound accumulation in tissue culture of Milk thistle using elicitor feeding and hairy root cultures. *J. Genet. Engineer. Biotech.*, 14(2): 327-333.
- Ganzera, M.; Schneider, P.; Stuppner, H. (2006).** Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. *Life Sciences*, 78: 856- 861.
- Gardiner, P.(2007).** Complementary, holistic, and integrative medicine: chamomile. *Pediatrics in review / American Academy of Pediatrics*, 28: 16-18
- Gelvin, S. B.; Singer, K.; Lee, L. Y. and Yuan, J. (2022).** Characterization of T-circles and their formation reveal similarities to *Agrobacterium* T-DNA integration patterns. *Frontiers in Plant Science*, 13, 849930.
- Gelvin, S.B(2009)." *Agrobacterium* in the genomics age"**, *Plant Physiol.*, 50: 1665-1676,.
- Gerdakaneh, M., Badakhshan, H., Mohamadi, M., and Arji, I. (2020).** Effect of different media and growth regulators on micropropagation of Gf677. *J. Plant Prod.* 43, 241–254. doi: 10.22055/PPD.2019.27439.1667.

- Gharari, Z.; Bagheri, K.; Danafar, H. and Sharafi, A. (2020).** Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Scutellaria bornmuelleri* by elicitor induced over-expression of MYB7 and FNSII2 genes. *Plant Physio Biochem.*, 148: 35-44.
- Glick, B. R. and Pasternak, J. J. (2003).** Plant growth promoting bacteria. *Molecular biology-principles and applications of recombinant DNA*, 436-54.
- Gutierrez-Valdes, N; Häkkinen, S. T. and Camille Lemasson, (2020).** Hairy root cultures-a versatile tool with multiple applications. *Frontiers in plant science* 11, 504243,.
- Habibi, P.; Soccol, C. R. and Grossi-de-Sa, M. F. (2018).** Hairy root-mediated bio-transformation: recent advances and exciting prospects. *Hairy Roots: An Effective Tool of Plant Biotechnology*, 185-211.
- Haghi, G.A. ; Hatami, A.S. and Mehran, M(2014).** ‘Analysis of phenolic compounds in *Matricaria Chamomilla* and its extracts by UPLC-UV’. *Res. Pharmaceut. Sci.*, 9 (1): 31–37,
- Handayani, T. (2014).** Regeneration of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *bejo*) from hybrid mature seed and molecular analysis of regenerants. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering (IPCBEE)*, 79, 57-61.
- Hassanpour, H. and Ghanbarzadeh, M(2021).** Induction of cell division and antioxidative enzyme activity of(*Matricaria chamomilla* L.) cell line under clino-rotation. *Mahbobeh ghanbarzadeh plant cell, tissue and organ culture (PCTOC)* 146 (2), 215-224,.

- Heinrich, M.; Robles, M.; West, J. E.; Ortiz De Montellano, B. R. and Rodriguez, E. (1998).** Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (compositae). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38(1), 539-565.
- Hemant ,S. (2020).** Production of medicinal compounds from endangered and commercially important medicinal plants through cell and tissue culture technology for herbal industry *Bioactive Compounds in Nutraceutical and Functional Food for Good Human Health*,
- Heuskin, S; Godin, B.and Leroy, P. (2009).** Fast gas chromatography characterisation of purified semiochemicals from essential oils of *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae) and *Nepeta cataria* (Lamiaceae) *J Chromatogr A*.;1216:2768–75.
- HO, R.; Gatheri, G. W. and Nyamache, A. K. (2016).** Antimicrobial activity of crude leaf extracts from medicinal plants against *Enterococcus faecalis*. *Medicine*, 1(2), 0001-0009.
- Holzhausen, E; Peppard, P; Sethi, A; Safdar, N; Malecki, K. and Schultz ,A. (2023).** Associations of gut microbiome richness and diversity with objective and subjective sleep measures in a population sample. *Sleep*. [Epub ahead of print]. doi: 10.1093/sleep/zsad300.
- Hu, Z.B and Du, M(2006).** "Hairy root and its application in plant genetic engineering". *J. Integrative Plant Biol.*,48, 121–127,.
- Idm’hand, E.; Msanda, F.; Cherifi, K(2020).** Ethnobotanical study and biodiversity of medicinal plants used in the Tarfaya Province, Morocco. *Acta Ecol. Sin.*, 40, 134–144.
- Imran, M.; Rauf, A.; Shah, Z.A.; Saeed, F.; Imran, A.; Arshad, M.U.; Ahmad, B.; Bawazeer, S.; Peters, D.; Mubarak, M.S.(2019).** Chemo-preventive and therapeutic effect of the dietary flavonoid kaempferol: A comprehensive review. *Phytother. Res.* 2019, 33, 263–275

ISAAA (2019). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2019: Biotech Crops Drive Socio-Economic Development and Sustainable Environment in the New Frontier. ISAAA Brief No. 55. ISAAA: Ithaca, NY.

Janmejai, K. S and Gupta, S .(2009). Extraction, characterization, stability and biological activity of flavonoids isolated from chamomile flowers Molecular and cellular pharmacology 1 (3), 138, 2009.

Jordi, W.; Schapendonk, A. H.; Davelaar, E.; Stoopen, G. M.; Pot, C. S.; De Visser, R. and Amasino, R. M. (2000). Increased cytokinin levels in transgenic PSAG12–IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. Plant, Cell & Environment, 23(3), 279-289.

Joumaa, M.M.E.and Borjac, J.M(2022). *Matricaria chamomilla*: A valuable insight into recent advances in medicinal uses and pharmacological activities. Phytochem. Rev., 21, 1913–1940.

Kashyap, P; Shikha, D; Thakur, M. and Aneja, A.(2022). Functionality of apigenin as a potent antioxidant with emphasis on bioavailability, metabolism, action mechanism and *in vitro* and *in vivo* studies: a review. J.Food. Biochem., 46(4):e13950.

Keshavareddy, G. ; Kumar, A.R.V. and Ramu, V.S.(2018)." Methods of Plant transformation- A review". Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 7(7): 2656-2668,

Khan, M.; Robin, A.A.H.K.; Nazim-Ud-Dowla, M.; Talukder; S. and Hassan, L(2010). "*In vitro* regeneration potentiality of Brassica genotypes in differential growth regulators". Bangladesh J. Agricult. Res., 35: 189-199,

- Khan, N.; Bano, A. and Zandi, P. (2018).** Effects of exogenously applied plant growth regulators in combination with PGPR on the physiology and root growth of chickpea (*Cicer arietinum*) and their role in drought tolerance. *Journal of plant interactions*, 13(1), 239-247.
- Khoshnami, M; Zare, B; Mardani-Mehrabad, H.and Farshad R, (2023).** Assessment of co-infection with BNV and BSCTV on resistance against rhizomania disease in transgenic sugar beet plants .*Transgenic Research* 32 (5), 475-485,
- Kim, S. J.; Park, W. T.; Uddin, M. R.; Kim, Y. B.; Nam, S. Y.; Jho, K. H. and Park, S. U. (2013).** Glucosinolate biosynthesis in hairy root cultures of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Natural Product Communications*, 8(2), 1934578X1300800222.
- Kimura, R; Schwartz, J. and Bennett, E (2023).** A narrative review on the potential therapeutic benefits chamomile in the acute care setting. *Guerrero Journal , Herbal Medicine*, 100714.
- Lei Dai,Y; Li, Y; Wang, Q; Niu, F-J; Li, K-W; Wang, Y-Y. and Wang, J (2022).** Chamomile: a review of its traditional uses, chemical constituents, pharmacological activities and quality control studies .28 (1), 133,.
- Lian, Z.; Nguyen, C. D.; Liu, L.; Wang, G.; Chen, J.; Wang, S. and Huo, H. (2022).** Application of developmental regulators to improve in planta or in vitro transformation in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 20(8), 1622-1635.
- Lim, T.K(2014).** *Matricaria chamomilla*. In edible medicinal and non-medicinal plants; springer: dordrecht, The netherlands,; volume 7, pp. 397–431.

- Ling C, Zheng L, Yu X, Wang H, Yuan Y(2020).** Cloning and functional analysis of three aphid alarm pheromone genes from german Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Plant Sci.;294:110463.
- Ma, D; He,J. and He, D Bioscience(2020a).** Chamazulene reverses osteoarthritic inflammation through regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and NF-KB pathway in *in-vitro* and *in-vitro* models. Biotechnology, and Biochemistry, Volume 84, Issue 2, 1 February, Pages 402–410.
- Ma, R. ; Yu, Z. ; Cai, Q. ; Li, H. ; Dong, Y. ; Oksman-Caldentey, K. M. and Rischer,H.(2020b).***Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the medicinal plant *Veratrum dahuricum*. Plants., 9(2): 191.
- Madunić, J; Madunić, I.V; Gajski, G; Popić, J. and Garaj-Vrhovac ,V(2018).** Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. Cancer Lett.;413:11–22.
- Mak, P. ; Lejny, Y.K. ; Tang, W.Y. ; Harwood, C.; Ho, S.M. (2006) .** Apigenin suppresses cancer cell growth through ER β , Neoplasia. 8 896–904.
- Malik, V. and Wang, J. (2022).** Pursuing totipotency: authentic totipotent stem cells in culture. Trends in Genetics.
- Mallikarjuna, G. ; Rao, T. S. R. B. and Kirti, P. B. (2016).** Genetic engineering for peanut improvement: current status and prospects. Plant Cell. Tiss. Org. Cult., 125(3): 399-416.
- Mashiguchi, K.; Hisano, H.; Takeda-Kamiya, N.; Takebayashi, Y.; Ariizumi, T.; Gao, Y. and Kasahara, H. (2019).** *Agrobacterium tumefaciens* enhances biosynthesis of two distinct auxins in the formation of crown galls. Plant and Cell Physiology, 60(1), 29-37.

- Menale, B.; De Castro, O.; Di Iorio, E.; Ranaldi, M.; Muoio, R(2021).** Discovering the ethnobotanical traditions of the island of Procida (Campania, southern Italy). *Plant Biosyst. An Int. J. Deal. All Asp. Plant Biol.*, 1–19.
- Meyer, A.D.; Tempé, J. and Costantino, P(2000).** "Hairy root: A molecular overview". *Plant Microbe Inter.*, 5: 1-39,.
- Minutolo, M; Chiaiese, P; Di Matteo, A; Errico, A. and Corrado, G. (2020).** Accumulation of ascorbic acid in tomato cell culture: influence of the genotype, source explant and time of *in vitro* cultivation. *Antioxidants* 9:222. doi: 10.3390/antiox9030222
- Moghaddam, M.S. ; Khorasani, N.T. ; Darban, R.A. and Rahimi, H.R. (2021).** *Reviews in Clinical Medicine* 8 (2): 92-95.
- Mohamedsalih, P. M; Sabir, D. K (2020).** Biosynthesis of silver nanoparticles using the aqueous extract of chamomile flower and their antibacterial activity against acinetobacter Spp. *Health Biotechnology and Biopharma* 3 (4), 48-62.
- Mohammad, A (2018).** The effect of different concentrations of growth regulators and the type of explants on embryogenesis and rooting of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *J. Pure Appl. Microbiol.*, 12(3):1281-1287.
- Mohammed, A. A. and Masyab, H. M. (2020).** Genetic transformation of *Nigella sativa* L. plants with *Agrobacterium rhizogenes* 35S GUS R1000 and estimation of Thymoquinone level in transformed hairy roots cultures. *Plant Archives*, 20(1), 3649-3652.
- Mohammed, A.A. (2020b).** Uptake of copper oxide nanoparticles by different tsues of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) plant. *Plant Archives*, 20 (2): 8121-8126.

- Mohammed, A.A.(2020a)**, "Efficiency the hairy roots of radish (*Raphanus sativus*) plant which genetic transformed by *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 for anthocyanin production. Eurasia", J. Biosci., 14: 6437-6441.
- Mohanlall, V. (2020)**. Plant cell culture systems for the production of secondary metabolites: a review. Journal of Biotechnology and Biochemistry, 6(1), 35-47.
- Mrabti, H.N.; Bouyahya, A.; Naceiri Mrabti, N.; Jaradat, N.; Doudach, L.; Faouzi, M.E.A(2021)**. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by traditional healers to treat diabetes in the Taza region of Morocco. Evid.-Based Complement. Altern. Med., , 5515634.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962)**. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3), 473-497.
- Mushtaq, Z; Sadeer, N. B; Hussain, M; Mahwish; Alsagaby, S. A. and Imran, M(2023)**. Therapeutical properties of apigenin: a review on the experimental evidence and basic mechanisms. International Journal of Food Properties 26 (1), 1914-1939,
- Nabi, N; Hafsa, A.B; Vincent, G; Xavier, N. and Vial, L. (2022)**, Evolutionary classification of tumor- and root-inducing plasmids based on T-DNAs and virulence regions. Molecular Phylogenetics and Evolutio, 169: 107388.
- Nagwa, I. E; Abdelhadi, A. Ai; Sief-Eldein, A.GM.and Ismail, A.(2021)**. Overexpression of chalcone isomerase A gene in *Astragalus trigonus* for stimulating apigenin, Scientific Reports 11 (1), 24176.

- Nguyen, D.V; Hoang, T.T; Le, N. T.and Huyen, T.T (2022).** An efficient hairy root system for validation of plant transformation vector and CRISPR/Cas construct activities in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Frontiers in Plant Science* 12, 770062, 2022.
- Niazian, M; Belzile, F; and Torkamaneh, D.(2022).** "CRISPR/Cas9 in Planta Hairy Root Transformation: A Powerful Platform for functional analysis of root traits in soybean". *Plants.*, 11(8), 1044.
- Paolella, P. (1998).** Introduction to Molecular Biology. Tata McGraw-Hill Companies, India .
- Parada, M.; Carrió, E.; Bonet, M.À. and Vallès, J(2009).** Ethnobotany of the Alt Empordà region (*Catalonia, Iberian Peninsula*). Plants used in human traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 124, 609–618.
- Park, N.I.; Park, J.H.; Lee, C.Y.; Lee, S.Y. and Park, S.U. (2010).** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of β - glucuronidase reporter gene in hairy roots of *Angelica gigas* Nakai. *Plant Omics J.*, 3:115-120.
- Parray, J.A. ; Kamili, A.N. ; Jan, S. ; Mir, M.Y. ; Shameem, N. ; Ganai, B.A. ; Abd_Allah, E.F. ; Hashem, A. and Alqarawi, A.A. (2018).** Manipulation of plant growth regulators on phytochemical constituents and DNA protection potential of the medicinal plant *Arnebia benthamii*. *BioMed. Res. Internat.*, 8 pages.
- Parveen, A. ; Perveen, S. ; Naz, F. ; Ahmad, M. and Khalid, M. (2023).** Chamomile. In: Zia-Ul-Haq, M. ; Abdulkreem AL-Huqail, A. ; Riaz, M. and Farooq Gohar, U. (eds). *Essentials of Medicinal and Aromatic Crops*. Springer, Cham, Switzerland. pp: 1009-1040.https://doi.org/10.1007/978-3-031-35403-8_39
- Payne, D. A. (2016).** Basics of Molecular Biology. In *Molecular Pathology in Clinical Practice* (pp. 1-17). Springer, Cham

- Poudineh, F.; Azari, A.A.; Fozouni, L.(2021).** Antibacterial activity of ethanolic extract of *Matricaria chamomilla*, *Malva sylvestris*, and *Capsella bursa-pastoris* against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Hamadan Univ. Med. Sci.*, 8, 23–26.
- Qureshi, M.N ; Stecher, G. and Bonn, G.B.(2019).**Determination of total polyphenolic compounds and flavonoids in (*Matricaria chamomella* L.)flowers,PMID: 31813883.
- Raal, A; Orav, A; Pussa, T; Valner, C; Malmiste, B. and Arak E(2012).** Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries *Food Chem.*;131:632–638.
- Rahimi, K.; Haghbeen, K.; Marefatjo, J.; Jazii, F.R. and Sheikhani, R. (2008).** Successful production of hairy root of *Valeriana isymbriifolium* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Biotechnol.*, 7(2): 200-204.
- Rahman, M. T.; Uddin, M. S.; Sultana, R.; Moue, A. and Setu, M. (2013).** Polymerase chain reaction (PCR): a short review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), 30-36.
- Rajoriya, P. ; Singh, V.K. ; Jaiswal, N. and Lall, R. (2018).** Optimizing the effect of plant growth regulators on *in vitro* micro propagation of Indian red banana (*Musa acuminata*). *J. Pharmacognosy and Phytoch.*, 8: 628-634.
- Rangslang, R. K. ; Liu, Z. ; Lütken, H. ; Favero, B. T. (2018).** *Agrobacterium* spp. genes and ORFs: mechanisms and applications in plant science. *J., Ciênciae Agrotecnologia*, 42(5):453-463.
- Riveiro, A. R. and Brickman, J. M. (2020).** From pluripotency to totipotency: an experimentalist's guide to cellular potency. *Development*, 147(16), dev189845.

- Rolnik, A. and Olas, B. (2021).** The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. *International journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3009.
- Sah, A. ; Naseef, P.P. ; Kuruniyan, M.S. ; Jain, G.K. ; Zakir, F. and Aggarwal, G. (2022).** A Comprehensive study of therapeutic applications of chamomile. *Pharmaceuticals (Basel)*. 15(10):1284. Doi: 10.3390/ph15101284.
- ŞAHİN, H. and Ramazan, T(2023).**Chamazulene content and hypoglycemic potential of (*Matricaria chamomilla* L.) . Fatos ŞEKERCİLER SUBAŞI Commagene Journal of Biology 7 (2), 107-112,
- Salih, S.M. (2001).** Enhancement of growth and regeneration ability of callus culture from chamomile. (*Matricaria chamomilla* L.). *J. Educ. Sci.* 53: 45-62.
- Sambrook, J.; Fritschi, E.F. and Maniatis, T(1989).**," Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA,.
- Santos, R. F.; Nunes, B. M.; Sá, R. D.; Soares, L. A. and Randau, K. P. (2016).** Morpho-anatomical study of *Ageratum conyzoides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 679-687.
- Santosh, K. and Satya, N. (2010).** Herbal remedies of wetlands macrophytes in India. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1(2)
- Sen, M. K.; Jamal, M. A. H. and Nasrin, S. (2013).** Sterilization factors affect seed germination and proliferation of *Achyranthes aspera* cultured *in vitro*. *Environmental and Experimental Biology*, 11, 119-123.
- Shams, A.; Abadian, H.; Akbari, G.; Koliai, A.; Zeinali, H(2012).** ,"Effect of organic and chemical fertilizers on Amount of Essence, biological yield and harvest index of (*Matricaria chamomile* L)". *Ann. Biol. Res.*, 3(83856-3860.

- Sharafi, A.; Sohi, H. H.; Mirzaee, H. and Azadi, P. (2014).** *In vitro* regeneration and *Agrobacterium* mediated genetic transformation of *Artemisia aucheri* Boiss. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20, 487-494.
- Sharma, A; Pandey, H ; Subrahmanian, A(2023).** Poduction of, Factors affecting, Gene regulation, And challenges in tissue cultured plant through soilless culture . *Journal of agricultural and food chemistry* 71 (14), 5804-5811,.
- Sharma, P. ; Kumar, P. and Banerjee, M. (2019).** Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots in *Ocimum tenuiflorum* L.- A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, Special Issue-9: 404-416.
- Shazad, A. ; Sharma, S. and Siddiqui, S.A. (2016).** Somatic Embryogenesis: A Valuable Strategy for Phyto-Climbing Diversity Conservation. 7th ed. In: *Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers*. Springer International Publishing, Switzerland.
- Shreni, A. E. (2022).** A Review: *Agrobacterium*-mediated gene transformation to increase plant productivity. *J. Phytopharm.*, 11, 111-117.
- Singh, O.; Khanam, Z.; Misra, N.; Srivastava, M.K(2011).** Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacogn. Rev.*, 5, 82–95.
- Suhyun, K; Woo, E. R. and Lee, D. G(2020).** Apigenin promotes antibacterial activity via regulation of nitric oxide and superoxide anion production. *Journal of basic microbiology* 60 (10), 862-872.

- Sultan, S. J. and Mohammed, A. A. H. (2020).** Genetic transformation of Broccoli (*Brassica oleracea* Var. Italica) plant by plasmid of *A. rhizogenes* R1601 and their molecular detection. Biochemical and Cellular Archives, Accept.
- Sundararajan, S; Sivaraman, B; Rajendran, V. and Ramalingam, S. (2017).** Tissue culture and *Agrobacterium-mediated* genetic transformation studies in four commercially important Indica Rice cultivars. J. Crop. Sci. Biotechnol. 20, 175–183. doi: 10.1007/s12892-017-0045-0
- Szőke, É; Máday, E; Marczal, G. and Lemberkovics, É.(2021).** Analysis of biologically active essential oil components of Chamomiles in Hungary. Acta Hort.; 597: 275-284.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2006).** Plant Physiology Sinauer Associates. Inc., Publisher. Sunderland, Massachusetts
- Talano, M.A.; WevarOller, A.L; González, P.S. and Agostini, E. (2012).** Hairy roots, their multiple applications and recent patents. Recent Patents Biotechnol., 6,115–133.
- Telke, A.A.; Kagalkar, A.N.; Jagtap, U.B.; Desai, N.S.; Bapat, V.A. and Govindwar, S.P. (2011).** Biochemical characterization of lactase from hairy root culture of *Brassica juncea* L. and role of redox mediators to enhance its potential for the decolorization of textile dyes. Planta., 234,1137–1149.
- Tille, M. P. (2017).** Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology 14th ed. Elsevier, St. Louis, Missouri, USA.
- Udayabhanu, J.; Huang, T.; Xin, S.; Cheng, J.; Hua, Y. and Huang, H. (2022).** Optimization of the transformation protocol for increased efficiency of genetic transformation in *Hevea brasiliensis*. Plants, 11(8), 1067.

- Varasteh-Shams, M.; Nazarian-firouzabadi, F. and Ismaili A(2020).** "The direct and indirect transformation methods on expressing a recombinant dermaseptin peptide in tobacco transgenic hairy root clones". *Curr. Plant Biol.*, 24: 100177 ,.
- Vincent, J. M. (1970).** A manual for the Practical Study of Root Nodule Bactria. IBP Handbook No.15. Oxford: Blackwell Scientific Publication, Oxford, PP. 113-131.
- Weigand, F.; Baum, M. and Udupa, S. (1993).** DNA molecular marker techniques. Technical Manual No. 20. ICARDA
- Wilson, K. and Walker, J. (2004).** Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Cambridge University Press.UK.
- Wilson, R.H.C. and Coverley, D(2017).** "Transformation-induced changes in the DNA-nuclear matrix interface, revealed by high-throughput analysis of DNA halos". *Sci. Repts.*, 7 (1): 1-7,.
- Wong, S.K.; Chin, K.Y.; Ima-Nirwana, S(2019).** The osteoprotective effects of kaempferol: The evidence from *in vivo* and *in vitro* studies. *Drug Des. Devel. Ther.*, 13, 3497–3514.
- Wu, D.Y.; Ugozzoli, L.; Pal, B.K.; Qian, J. and Wallage, R.B. (1991).** The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and Cell Biol.*, 10:233-238.
- Yang, D.; Wang, T.; Long, M. and Li, P(2020).** Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, , 8825387.
- Yassein, A; Hassan, A; Selim, S. and Abdellah,E.(2021).** Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) explores agro-morphological and genetic variation affected by chemical mutagen, *journal of microbiology, biotechnology and food sciences* 11 (2), e4049-e4049.

- Yuling, T. ; Jie, Z. ; Youhui, C. ; Yi, Y. ; Honggang, W. ; Luyao, Y. ; Shuangshuang, L. ; Lu, Y. and Yifan, J(2023).** , "Establishment and validation of a callus tissue transformation system for German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.)" BMC Plant Biol 23, 659. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04680-3>.
- Zhao, Y.F(2018).** Chemical constituents and quality standard of *Matricaria chamomilla* L. as uygur medicine. Master's Thesis, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, China,.
- Zhigzhitzhapova, S.V; Randalova, T.E; Radnaeva, L.D; Anenkhnov, O.A; Chen ,S.L.and Gao, Q. (2015)** Comparative studies on composition of essential oil in three wormwoods (*Artemisia* L.) from Buryatia and Mongolia. Journal of Essential Oil Bearing Plants.;18(3):637–641.
- Zhou, Y; He, L; Zhang, N; Ma, L. and Yao, L(2022).** Photoprotective effect of *Artemisia sieversiana* Ehrhart essential oil against UVB-induced photoaging in mice. Photochemistry and Photobiology.;98(4):958–968. <https://doi.org/10.1111/php.13561>.
- Zolfaghari, F.; Rashidi-Monfared, S.; Moieni, A.; Abedini, D. and Ebrahimi, A. (2020).** Improving diosgenin production and its biosynthesis in *Trigonella foenum-graecum* L. hairy root cultures. Indust. Crops and Products, 145: 112075.
- Zuzuarregui, J. and During, E(2020).** Sleep Issues in Parkinson's Disease and Their Management. Neurotherapeutics. 17:1480–94. doi: 10.1007/s13311-020-00938-y.

Ткаченко, А. А.; Додуева, И. Е.; Творогова, В. Е.; Предеус, А. В.; Правдина, О. Ю.; Кузнецова, К. А. and Лутова, Л. А(2021). "Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (Plant Gen2021): The 6th International Scientific Conference (June 14–18, 2021, Novosibirsk, Russia); In Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology: The 6th International Scientific Conference.

الملاحق

Appendices

الملحق (1)

المكونات الداخلة في تحضير لتر واحد من وسط MS (Murashige and Skoog, 1962)

المكونات	التركيز (ملغم لتر ⁻¹)
Macro-elements	
Ammonium nitrate	1650.000
Calcium chloride	332.200
Magnesium sulphate	180.690
Potassium nitrate	1900.000
Potassium phosphate monobasic	170.000
Microelements	
Boric acid	6.200
Cobalt chloride hexahydrate	0.025
Copper sulphate pentahydrate	0.025
EDTA disodium salt dehydrate	37.300
Ferrous sulphate heptahydrate	27.800
Manganese sulphate monohydrate	16.900
Molybdic acid (sodium salt)	0.213
Potassium iodide	0.830
Zinc sulphate heptahydrate	8.600
Vitamins	
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid (free acid)	0.500
Pyridoxine HCl	0.500
Thiamine hydrochloride	0.100
Amino acid	
Glycine	2.000
Others	
MES	500.00
Sucrose	30 غم
Agar	8.0 غم
D. water	1000 مل
PH (5.8)	

الملحق (2)

المكونات الداخلة في تحضير لتر واحد من وسط YEB (Vincent, 1970)

المكونات	التركيز (غم لتر ⁻¹)
Yeast extract	1.0
Beef extract	5.0
Peptone	5.0
Sucrose	5.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.49
مكونات أخرى	
Agar	15 غم
D. water	1000 مل
pH (6.8-7.2)	

الملحق (3)

المحاليل المستعملة في عملية عزل بلازميدات Ri من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834

المكونات	الكمية المطلوبة لتحضير 100 مل من
المحلول I	
Glucose (1 M)	5.0 مل
Tris-HCl,pH 8.0 (1 M)	2.5 مل
EDTA,pH 8.0 (0.25M)	4.0 مل
D. water	88.5 مل

المحلول II	
20 مل	NaOH (1N)
1.0 غم	SDS
80 مل	D. water
المحلول III	
60 مل	Potassium acetate (5M)
18 مل	Glacial acetic acid
22 مل	D. water
المحلول IV	
T.E. buffer Tris-HCl (10 mM) + EDTA (1mM)	

B

hairy roots continued to grow and form good cultures, as these roots were characterized by their rapid growth, white color and negative geotropism.

The results of electrophoresis in the 1% agarose gel of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from transformed tissues and amplified using Polymerase chain reaction (PCR) technology confirmed their genetic transformation by the presence of the *rol A* gene in the genome of those tissues when using a specialized primer for the gene. The results confirmed the presence of a single band, its molecular weight reached 248 pb, which is similar to the molecular weight of the primer used.

The study dealt with detecting and estimating the concentrations of the apigenin and chamazulene compounds in various chamomile plant tissues using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The vegetative branches genetically transformed by Ri plasmids with 1214.32 ng μl^{-1} were distinguished by their high content of apigenin and chamazulene reached 2678573 , 0.344318 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectively.

The effectiveness of alcoholic extracts of the vegetative branches of the chamomile plant showed in inhibiting the growth of bacterial species (*E.coli*, *Pseudomonas aeruginos*, *Enterococcus columbae*, *Klebsiella pneumonia*), where those forme according to the effect of Ri plasmid vector with a concentration of 1214.32 ng μl^{-1} , it has a clear effect on the growth of all bacterial species with a greater than 100 ml added to them the inhibition zone reached 11, 9, 7, 12 mm respectively.

Abstract

The current study succeeded in propagating the chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) plantlets by tissue culture technology and subjected it to the genetic transformation by direct injection methods with plasmids vector, root inducing plasmid (pRi), isolated from *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 bacteria. As well as measuring the concentrations of apigenin and chamazulene compounds in various tissues.

Chamomile plant seeds recorded a germination percent at 90% after 7 days produced seedlings with good and distinct vitality on solid Murashige and Skoog (MS) medium. The results showed easily callus initiated from hypocotyle stems of seedlings on solid MS medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ for each of Naphthaleneacetic acid (NAA), Benzyl adenine (BA) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), where the callus initiated at 100% and after 25 days its cultures produced. One of the distinctive results was the spontaneous appearance of vegetative growths after 7 days from first subcultured of the callus, later developed into vegetative branches bearing true leaves. They rooted easily in MS solid medium at 100% within 21 days to produce a complete plantlets in the medium.

The current study investigated the ability of plasmid (Ri) vector isolated from the *Agrobacterium rhizogenes* ATTC 15834 after different incubation periods alone for genetic transformation of chamomile plants (*Matricaria chamomilla* L.).

The results of injected Ri plasmids directly into hypocotyl stem isolated from 25-day-old seedlings led to its response and hairy roots formed, and the 1214.32 ng µl⁻¹ of plasmid was superior on other concentrations in stimulated the highest rate of hairy root initiation reached to 80% after 7 days of inoculated. After removing them individually or in groups and placed them on solid MSO medium, all types of

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
And Scientific Research
University of Mosul
College of Science
Dept. of Biology



**Role the *rol* genes of *Agrobacterium* in Stimulating
biosynthesis the Apigenin and Chamazulene compounds
in *Matricaria chamomilla* L. plant Tissues.**

M.Sc. Thesis Submitted By

Alaa Moaath Ibrahim Younes Al-Obaidi

To

The Council of the College of Science University of Mosul in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master's degree

In

Biology / Botany

Supervised By

Professor Dr. Amjad Abdul-Hadi Mohammed

1446 A.H.

2024A.D.

University of Mosul

College of Science

Dept. of Biology



**Role the *rol* genes of *Agrobacterium* in Stimulating
biosynthesis the Apigenin and Chamazulene compounds
in *Matricaria chamomilla* L. plant Tissues.**

Alaa Moaath Ibrahim Younes Al-Obaidi

M.Sc. Thesis

Biology /Botany

Supervised by

Professor Dr. Amjad Abdul-Hadi Mohammed

1446A.H

2024A.D.
