أمثلة الإكثار الخضري الدقيق لنبات البردقوش.*Origanum* L *vulgare* وأثره على المحتوى الزيتي

د. ياسمين جنيد* **د. رلى يعقوب****

د. فهد البيسكي*

الملخص

تم في هذا البحث وضع طريقة للإكثار الخضري الدقيق لنبات البردقوش البري *Origanum vulgare* من خلال زراعة العقل المفردة على وسط MS يحوي تراكيز مختلفة من السيتوكينين(6-Benzyl Amino Purine)BAP : (0،0.5،1،1.5،2،3) مغ/ل +NAA (Naphtalene Acetic Acid)(0.1) مغ/ل، والتجذير على وسط 1/2 MS يحوي عدة تراكيز من NAA (0.25،0.5،1،1.5،2،3) مغ/ل .أظهرت النتائج أن الوسط الأكثر فعالية لتشكيل الفروع ونموها هو وسط MS يحوي BAP بتركيز 2 مغ/ل مع NAA بتركيز 0.1 مغ/ل حيث بلغ متوسط عدد الفروع (4.60) ومتوسط طولها (2.23) سم بينما بلغت أفضل نسبة تجذير 72.5% على وسط 1/2 MS يحوي NAA بتركيز 1مغ/ل والذي أعطى أكبر عدد من الجذور (8.05) ومتوسط طول (4.95) سم وثخانة (2.43) مم، كما تمت أقلمة النباتات الناتجة عن زراعة الأنسجة ونقلها إلى التربة بنجاح.

* الهيئة العامة للتقانة الحيوية– دمشق– سورية.

** كلية الزراعة– جامعة دمشق– سورية.

تم استخلاص الزيت من النباتات البرية وكذلك من النباتات الناتجة عن زراعة الأنسجة والمزروعة حقلياً وتحديد مكوناته الأساسية باستخدام تقانة GC-MS حيث زادت نسبة الزيت في النباتات المزروعة لتصل إلى (1.2%) مقارنةً بالنباتات البرية التي حوت (0.4%) زيتاً، و كان المركب Terpinen-4-ol هو السائد في زيت البردقوش البري *O.vulgare* بنسبة (24.90%) في النبات البري و(27.69%) في النباتات المقسّاة.

الكلمات المفتاحية: بردقوش بري،GC-MS،Terpinen-4-ol،اكثار بالأنسجة.

Optimization Of *Origanum vulgare* L. Micropropagation and It Is Effect On Oil Content.

Jnaid.Y* **R.Yacoub****

F. Al-Biski*

Abstract

This research was achieved to obtain a protocol for micropropagation of *Origanum vulgare* through cultivation of single nodal segment on MS supplemented with different concentrations of BAP (6-Benzyl Amino Purine) (0,0.5,1,1.5,2,2.5,3) mg/L+ NAA (Naphtalene Acetic Acid)(0.1) mg/L and rooting on 1/2MS supplemented with different concentrations of NAA (0.25,0.5,1,1.5,2,3) mg/l.

Results indicated that the most effective medium for shoot formation and growth is MS medium supplemented with 2 mg/L BAP+ 0.1 mg/L NAA at maximum number of shoots 4.60,and shoots length 2.23 cm.

while the best rooting rate (72.5%) was obtained on 1/2 MS medium containing 1mg/L NAA with maximum number of roots 8.05,and root length 4.95 cm,and thickness 2.43 mm . Micropropagated plants were acclimatized and transferred to soil with success. The essential oils were extracted from shoots of wild plant and field grown plant and also from *in vitro* plants to study their components by GC-MS. The amount of oil was higher in field grown plants (1.2%) compared with wild plants which contain(0.4%) oil, Terpinen-4-ol was the dominant component in the oil of wild plants with amount (24.90%) and (27.69%) in harden plants.

Key words: Origanum vulgare, GC-MS, Terpinen-4-ol, Micropropagation.

* National Commission for Biotechnology- Damascus- Syria

** Faculty of Agriculture- Damascus University,Syria.

المقدمة:

يُصنف البردقوش البري ضمن الفصيلة الشفوية Lamiaceae التي تضم العديد من الأنواع النباتية الهامة فهي تشمل 220 جنساً و ما يقارب 3500- 4000 نوعاً نباتياً (Almeida وAlbuquerque ،2002).

تُعود القيمة الاقتصادية العالية لهذه الأجناس كونها منتجة للزيوت مثل *Lavandula, Thymus, Origanum* ومن أهم أنواع جنس البردقوش : *O.majorana, O.sipyleum, O.syriacum* التي تنتشر في سورية عند سفوح الجبال الساحلية، وقد يوجد تنوع كبير ضمن النوع الواحد.

تُعد هذه الأنواع ذات أهمية طبية عالية فقد أظهرت الدراسات الحديثة فعاليتها المضادة للكائنات الدقيقة، وكمضادات أكسدة ، ولكن هناك عدد قليل من الدراسات التي تعنى بأنواع هذا الجنس، لاسيما بوجود بعض الأنواع النادرة والمهددة (Spada وPerrino،1996).

تحتوي أوراق البردقوش على زيت طيار ذي فعالية عالية في معالجة الأمراض ومضاد للبكتيريا والفطور، وتختلف كميته ونوعيته حسب الموقع الجغرافي ومرحلة النمو الخضري والظروف البيئية والفصل والعمر، ووقت الجمع (Abu Lafi وزملاؤه،2007،2008).

تعد زراعة الأنسجة من الطرائق المهمة لإكثار البردقوش البري وإنتاج نباتات مطابقة مورفولوجياً ووراثياً للنبات الأم وخالية من الأمراض فقد وجد عند اكثار النوع *Origanum vulgare* أن أعلى عدد من الفروع قد نتج من الزراعة على بيئة تحوي BAP (Benzyl Amino Purine) مع NAA (Naphtalene Acetic Acid)، (Oana وزملاؤه،2010).

تراوحت نسبة الزيت المستخلص من نبات البردقوش بين 0.52 و3.97 %، كما تم استخدام تقانة الكروماتوغرافيا الغازية GC لتحديد المركبات الأساسية في الزيت الذي أحتوى مركبات عديدة بنسب متفاوتة، كما تم فصل الأنواع لعدة أنماط كيميائية تبعاً

للمركب السائد في كل منها وهي نمط Thymol ونمط Carvacrol ونمط Terpinene–4–ol (Novak *et al*.,2003).

إن انتاج الزيت لا يعتمد فقط على مورثات النبات ومرحلة التطور بل إن تغيرات البيئة تؤثر بشكل كبير و واضح في العمليات الفيزيولوجية والكيميائية التي تتحكم باستقلاب النبات مما يؤثر في تركيب الزيت الأساسي وإن تأمين متطلبات السوق والصناعة يتطلب الحصول على انتاج ثابت للزيت كمياً ونوعياً (Silva,2002) لذا لابد من ايجاد طرائق زراعية مناسبة لتحقيق ثباتية الزيت كمياً ونوعياً بشكل مستقل عن تبدلات البيئة (Sangwan وزملاؤه،2001).

يعد استخدام الهرمونات النباتية في زراعة الأنسجة ضرورياً للحصول على أفضل كمية ونوعية من المركبات الفعالة حيث تؤثر تلك الهرمونات في عمليات الاستقلاب (Poyh and Ono,2006). وجد Papon *et al* (2005) زيادةً في نشاط أنزيم geranyl 10-hidroxylase عند إضافة السيتوكينين إلى وسط الزراعة حيث يتحكم هذا الأنزيم بتكوين قلويدات serpentine وcatharantine، وjamalicine، كذلك لاحظ Oudin *et al* (2007) أن إضافة 0.1 مغ/ل من BA (Benzyl Adenine) كان له تأثير ايجابي في زيت النوع *Lavandula dentate* حيث أدى السيتوكينين لزيادة Camphor ونقص في 1,8 Cineole بينما لم تتغير بقية المركبات.

أظهرت الأبحاث زيادة في نمو نبات *Mentha arvensis* عند اضافة 220 مغ/ل من cinetine إلى وسط الزراعة مما أدى لزيادة في محتوى الزيت الأساسي بسبب زيادة انتاج الكتلة الحيوية (Farooqi وزملاؤه،2003).

لاحظ Poyh وOno (2006) زيادة في محتوى الزيت الأساسي في نبات *Salvia officinalis* عند معاملته بـ 100 مغ/ل من حمض الجبريلين وذلك بسبب زيادة عدد الأوراق.

يهدف هذا البحث لأمثلة طريقة للإكثار الخضري الدقيق لنبات البردقوش البري وتضمن الحصول على عدد كبير من النباتات ومقارنة الناتج من الزيت الأساسي كمياً ونوعياً بين النباتات البرية وتلك المزروعة حقلياً.

مواد البحث وطرائقه:

- **المادة النباتية Plant material:**

جُمعت بعض نباتات البردقوش البري النامية وفقاً لأماكن انتشارها في جبال الساحل السوري في الحفة وصلنفة لتكون ما مجموعه (14) عينة من خلال القيام بعدد من الجولات ، واُستعملت العقل الساقية للنبات في الإكثار الخضري الدقيق، في حين أستعمل الجزء الهوائي بكامله في استخلاص الزيت.

- **مراحل الاكثار الخضري الدقيق Micropropagation:**

1- مرحلة الزراعة الأولية Initial Culture:

غُسلت العقل المفردة تحت الماء الجاري لمدة نصف ساعة، وعُقمت بالكحول(70%) مدة دقيقة واحدة، و عُقمت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl بتراكيز مختلفة (3,2.5,1.5,0.5%) مدة خمس دقائق لتغسل بعدها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات.

تضمنت هذه المرحلة أربع معاملات، حيث كُررت كل معاملة مرتين باستخدام 20نباتاً لكل مكرر أي 40 نبات لكل معاملة من هيبوكلويت الصوديوم وبذلك تتضمن التجربة زراعة 160 نبات ليتم تسجيل نسبة النباتات السليمة والنامية لكل معاملة.

زُرعت العقل المفردة بطول 1-2 سم على وسط MS خالٍ من الهرمونات وتركت لمدة 30 يوم وذلك للحصول على نباتات بطول 3 سم تقريباً يتم اختبارها لاحقاً بوجود تراكيز هرمونية مختلفة.

2- مرحلة الاكثار Multiplication Stage:

زُرعت الفروع بطول 3 سم و الناتجة بعد 30 يوماً من الزراعة الأولية، على وسط MS كامل المحلول المعدني لموراشيج وسكوج (Murashige and Skooge, 1996) بالإضافة لتراكيز مختلفة من BAP مع0.1 مغ/ل من NAA كالتالي:

BAP(0,0.5,1,1.5,2,2.5,3مغ/ل)+NAA(0.1 مغ/ل) والفيتامينات: الثيامين 1مغ/ل وميواينوسيتول (100) مغ/ل، وسكروز (30)غ/ل، وآغار (7) غ/ل،وذلك ضمن أنابيب اختبار بحجم 20*2.5 سم تحوي 15مل من الوسط المغذي ليتم تعقيمها في جهاز التعقيم الرطب (Autoclave) عند حرارة 121 °م وضغط 1.04 كغ/سم^2 لمدة 20 دقيقة. حُضّنت الأنابيب المزروعة في غرفة النمو عند درجة حرارة °23م، وإضاءة 16ساعة/8ظلام، وشدة ضوئية 3000 لوكس .

تضمنت مرحلة الاكثار سبع معاملات حيث كُررت كل معاملة مرتين باستخدام 20نباتاً لكل مكرر أي 280 نبات بالمجمل، ليتم تسجيل عدد الفروع وطولها بعد 30 يوم من الزراعة.

3- مرحلة التجذير Rooting Stage:

تتم زراعة الفروع الناتجة عن الاكثار على وسط 1/2 MS يحوي التراكيز التالية من NAA:(0,0.25,0.5,1,1.5,2,3) مغ/ل.

شملت هذه المرحلة سبع معاملات، كُررت كل معاملة مرتين باستخدام 20 نباتاً لكل مكرر، وتحديد عدد الجذور وطولها وثخانتها ونسبة التجذير بعد 30 يوماً من الزراعة.

4- مرحلة التقسية:

تم التخلص من الآغار بغسل جذور النباتات بشكل جيد بالماء المقطر المعقم لتزرع بعدها النباتات ذات التجذير الجيد خلال مرحلة التجذير في أصص بلاستيكية تحوي تورباً بوجود رطوبة جيدة مع ريها أسبوعياً، وتغطى بأكياس بلاستيكية لمدة 10 أيام ثم يزال الغطاء عنها ضمن غرفة النمو بوجود رطوبة نسبية 90% و16 ساعة إضاءة/8

ظلام وحرارة بين 22 إلى25ºم مع سقاية النباتات مرة أسبوعياً بوسط 1/4MS، لتنقل بعدها إلى البيت البلاستيكي في أصص تحوي تربة ورمل وتورب بنسبة (1:1:2) (v/v/v) وتحديد نسبة نجاح التقسية.

- **استخلاص الزيت Oil Extraction:**

تزُرع الفروع التي يزيد طولها عن 3 سم والناتجة من مرحلة الاكثار في دوارق زجاجية سعة 250 مل بوجود 50 مل من وسط الاكثار الذي تم تحديده في المخبر وأعطى أفضل استجابة من حيث طول الفروع وعددها، ليتم جمعها لاحقاً واستخلاص الزيت منها بعد 60 يوماً من النمو تحت الظروف المخبرية كما يتم استخلاص الزيت من النبات البري ومن النباتات المقساة (المزروعة حقلياً) وذلك بأخذ 50غ من النباتات المجففة (الأجزاء الهوائية) وتقطيرها باستخدام جهاز التقطير البخاري لمدة 3 ساعات وبثلاثة مكررات لكل تجربة استخلاص زيت.

مرحلة الكروماتوغرافيا الغازية GC-MS (Gas Chromatography –Mass Spectrometry):

أُجري تحليل GC-MS باستخدام نظام:

Agilent 7890 A GC system 5975C inert XL EI/CI MSD with Triple-Axis Detector

العمود: نوع DB-HP-5MS مواصفاته: الطول 30 م وسماكة الطبقة المغلفة 0.25 ميكرومتر القطر الداخلي للعمود 0.25 مم.

ضُبطت حرارة الفرن وفق البرنامج التالي: 60 °م ترفع لـ180 °م بمعدل 4°م في الدقيقة (4°م/دقيقة) ثم ترفع الحرارة لـ 260° م (10°م/ دقيقة) لمدة عشر دقائق حيث بلغ الزمن الإجمالي للبرنامج 50 دقيقة.

درجة حرارة الحاقن 260°م والغاز الحامل :الهيليوم ومعدل التدفق (1مل/دقيقة).

تم تحديد المركبات من خلال مقارنة زمن الاحتباس النسبي ومطياف الكتلة MS بقاعدة البيانات في مكتبة NIST.

التحليل الاحصائي Statistical Analysis:

استخُدم البرنامج الإحصائي XLSTAT،حيث أجري اختبار تحليل التباين البسيط One Way ANOVA تبعها اختبار Fisher، وتمت مقارنة المتوسطات بحساب أقل فرق معنوي عند مستوى معنوية 1%.

النتائج والمناقشة:

*** الاكثار الخضري الدقيق:**

أ– مرحلة الزراعة الأولية:

– تأثير التعقيم السطحي للأجزاء النباتية:

يُعد التعقيم السطحي من المراحل المهمة في زراعة الأنسجة النباتية وهي تختلف من حيث الوقت اللازم للتعقيم ونوع وتركيز المادة المستخدمة في التعقيم حيث تم اجراء عدة تراكيز لتحديد الطريقة المثلى للتعقيم.

يظهر الجدول (1) أن أفضل نتائج للتعقيم باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم عند التركيزين (2.5 و3%) لمدة خمس دقائق حيث تفوقت معنوياً نسبة العينات السليمة على باقي النسب (96.25%) عند التركيز3% و(86.25%) عند التركيز2.5% وانخفض عدد العينات السليمة لأقل نسبة 27.5% عند التركيز 0.5% بينما كانت أفضل نسبة للعينات النامية من العينات السليمة (93.75%) حيث تفوقت معنوياً على باقي النسب ،بينما أدى استخدام التركيز المنخفض (0.5%) من هيبوكلوريت الصوديوم إلى خفض نسبة العينات النامية إلى 23.75% وبالتالي فقد أثبتت هذه المادة فعاليةً عاليةً في تعقيم الأجزاء النباتية المستخدمة في الزراعة.

كما تمت زراعة الفروع بطول 1-2 سم على وسط MS خالٍ من الهرمونات ،حيث نمت النباتات بشكل جيد.

الجدول(1): تأثير استخدام هيبوكلوريت الصوديوم في تعقيم الأجزاء النباتية.

تركيز هيبوكلوريت الصوديوم(%)	نسبة النباتات السليمة (%)	نسبة النباتات النامية (%)
0.5	27.5^{c}	23.75^{c}
1.5	62.5^{b}	56.25^{b}
2.5	86.25^{a}	81.25^{a}
3	96.25^{a}	93.75^{a}
LSD 0.01	17.26	14.10

الأحرف المشتركة في نفس العمود تشير إلى عدم وجود فرق معنوي.

ب– مرحلة الاكثار Multiplication stage:

أظهرت النتائج في الجدول (2) أن استخدام منظمات النمو قد أدى لزيادة معدل الاكثار وبفروق معنوية بالمقارنة مع الشاهد، حيث نتج عن التركيز 2 مغ/ل منBAP مع التركيز 0.1 مغ/ل من NAA أعلى نمو للفروع وأفضل تشكل لها حيث وصل متوسط عدد الفروع لـ 4.60، ومتوسط طولها 2.23 سم ، كما أعطى التركيز 2.5 مغ/ل عدد وطول عالي للفروع (3.15 فرع،1.98سم) وكذلك التركيز 1.5 مغ/ل نتج عنه عدد فروع 3.02 بطول 1.77 سم، بينما أنخفض عدد الفروع وطولها عند التراكيز المنخفضة جداً(0.5 مغ/ل) وعند التراكيز العالية جداً (3 مغ/ل) لتكون (2.15 فرع بطول 1.45سم) و(1.65فرع بطول 1.54 سم)، وهذا يتوافق مع ما أظهرته الدراسات المرجعية بأن BAP هو الهرمون الأكثر فعالية لتعزيز تشكل الفروع حيث تم الحصول على أعلى عدد من الفروع في النبات بوجود تركيز عالي من BAP وتركيز منخفض من NAA (Ayan وزملاؤه،2005).

كذلك تمكن (Leelavathi وKuppan (2013) من إنتاج عدد كبير من النموات عند زراعة النوع *Lavandula angustifoli*a على وسط MS يحوي تركيزاً مرتفعاً من BAP وتركيزاً منخفضاً من NAA وهذا ما يشابه ما تم التوصل إليه في هذه الدراسة.

الجدول (2): تأثير تراكيز مختلفة من BAP في نمو فروع نبات البردقوش بوجود تركيز 0.1 من NAA.

تركيز BAP	متوسط عدد الفروع	متوسط طول الفروع (سم)
0	1.95f	1.12g
0.5	2.15e	1.45f
1	2.65d	1.47e
1.5	3.02c	1.77c
2	4.60a	2.23a
2.5	3.15b	1.98b
3	1.65g	1.54d
المتوسط	2.74	1.65
LSD 0.01	0.042	0.016

الأحرف المتشابهة في العمود الواحد تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

ج– التجذير Rooting:

إن استخدام الأكسين NAA قد أدى لنمو الجذور بنسب متفاوتة حيث بينت النتائج في الجدول (3) أن إضافة الأكسين قد كان لها تأثير إيجابي على نمو الجذور حيث أن غياب الأكسين في الشاهد لم يعطي أي نمو للجذور، كذلك انخفض عدد الجذور عند التراكيز المنخفضة جدا(0.5 مغ/ل) والعالية جداً (3مغ/ل) ليكون(5.05،5.98) على التوالي، كما انخفض طول الجذور ليكون (2.01 سم) عند التراكيز المنخفضة جداً(0.25 مغ/ل) وكذلك عند التراكيز العالية جداً (2،3 مغ/ل) ليكون (2.05،2.13سم)، وتراوحت ثخانة الجذور بين 0.74 مم عند التركيز 0.25 مغ/ل و2.43 مم عند التركيز 1مغ/ل، وكانت الثخانة ذات قيم عالية عند التركيزين 0.5 و1.5 مغ/ل لتكون (1.55،1.92 مم) على التوالي بينما انخفضت الثخانة عند التراكيز (0.25،2،3 مغ/ل) لتكون (0.74،0.93،0.78 مم) على التوالي، كما كانت أعلى نسبة مئوية للتجذير 72.5% عند استخدام وسط 1/2MS يحوي 1مغ/ل من NAA والذي أعطى أفضل نتائج من حيث متوسط طول الجذور (4.95 سم) وعددها (8.05) وثخانتها (2.43 مم)، وهذا يتقارب مع ماتوصل إليه Olu و Cakir (2009) الذي حصل

على أفضل تكون للجذور عند استخدام التركيز 1مغ/ل من NAA في النوع *Origanum sipyleum* حيث تختلف نسبة التجذير باختلاف نوع الأوكسين وتركيزه (Vuylsteke، 1989).

كما تتشابه هذه النتائج مع نتائج استخدام NAA في تجذير النوع *Thymus satureioides*، فكان أفضل تركيز 1 مغ.ل$^{-1}$، والذي أعطى عدد جذور (17.7جذراً)، كما زاد عدد الجذور بزيادة تركيز NAA، وتناقص طول الجذور بزيادة التركيز، حيث أعطى التركيز المنخفض 0.05 مغ.ل$^{-1}$ أعلى عدد للجذور(1.2 جذراً) (Aicha وزملاؤه،2013)، كما كانت أعلى نسبة تجذير (60%) للنوع *Ajuga vestita* وعدد (3.7جذراً) من التركيز 1.5مغ.ل$^{-1}$ NAA (Akbaş وزملاؤه،2015).

الجدول (3): تأثير إضافة تراكيز مختلفة من NAA في تجذير نبات البردقوش في وسط 1/2MS.

تركيز NAA (مغ/ل)	متوسط عدد الجذور	متوسط طول الجذور (سم)	متوسط ثخانة الجذور (مم)	نسبة التجذير (%)
0	0	0	0	0
0.25	5.60e	2.01f	0.74f	47.5c
0.5	5.05f	3.75c	1.55c	60b
1	8.05a	4.95a	2.43a	72.5a
1.5	6.45b	4.16b	1.92b	62.5ab
2	6.20c	2.13e	0.93d	45c
3	5.98d	2.50d	0.78e	47.50c
المتوسط	6.22	253.	1.39	55.83
LSD 0.01	10.70	0.10	0.02	0.017

الأحرف المشتركة في نفس العمود تشير إلى عدم وجود فرق معنوي.

د– مرحلة التقسية:

بلغت نسبة نجاح التقسية 90% ويبين الشكل (1) المراحل المختلفة للزراعة المخبرية لنبات البردقوش البري.

A B C D

الشكل (1): الاكثار المخبري الدقيق للبردقوش البري والذي يتضمن المراحل التالية:A الزراعة الأولية،B الإكثار، C التجذير،D التقسية.

– استخلاص الزيت Oil Extraction:

(Gas Chromatography –Mass Spectrometry)GC-MS:

أظهرت النتائج أنّ نسبة الزيت المستخلص من نباتات النوع *O.vulgare* بلغت 0.4%,0.3%,1.2% (w/v) لكل من النبات الكامل المنتشر طبيعياً والناتج مخبرياً والمُقسى على التوالي، حيث تفوقت وبشكل واضح نسبة الزيت في النبات الناتج عن التقسية على باقي النسب.

أظهرت النتائج في الجدول (4) والأشكال (2،3،4،5) أن المركب السائد في النبات البري هو Terpinen-4-ol وقد حقق نسبة (24.90%) كما إحتوى هذا النبات على نسباً عاليةً من المركبات التالية: o-Cymene (8.90%)،cis-beta-Terpineol(8.73%)، alpha-Terpieol ،(4.48%) beta-Phellandrene,(6.67%) alpha-Terpinen (4.18%)، carvacrol (3.90%) ، Terpinolene (2.43%)،-gamma (10.57%) terpinene، beta-thujene(2.69%) بالإضافة الى مركبات موجودة بكميات قليلة مثل: (-)-Carvone(1.96%)، beta-Caryophyllen(1.94%)، beta- (1.19%) Myrcene، بينما كانت نسبة بقية المركبات أقل من 1%.

كما إحتوت النباتات الناتجة عن إضافة السيتوكينين على نسبة (21.92%) من المركب Terpinen–4–ol وإحتوت العينة الناتجة عن التقسية على أعلى نسبة (27.69%) من Terpinen–4-ol، وحصلت زيادة في نسب بعض المركبات في النباتات الناتجة عن المعاملة بالسيتوكينين مقارنةً مع النبات البري وهي:

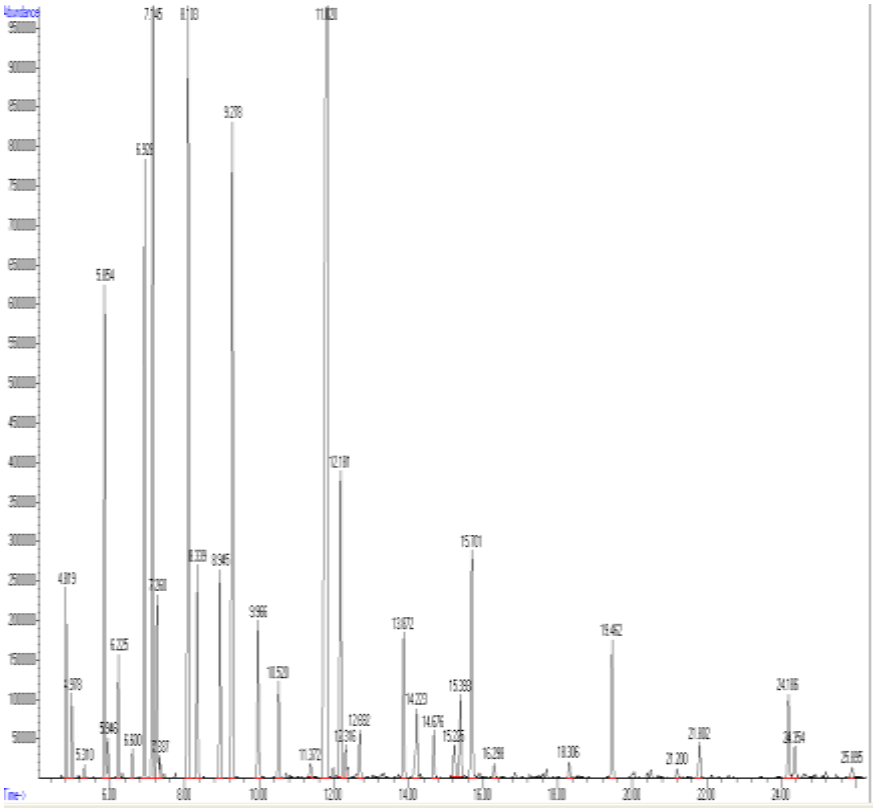
beta-Phellandrene (5.44 -4.84%)،o-Cymene(9.28-8.90%)، cis-beta-Terpineol (10.29-8.73%)، (-)-Carvone (2.63-1.96%)، Thymol (2.23-1.09%)،beta-Caryophyllene (2.17-1.94%).

عمل Karalija و Paric (2011) على دراسة تأثير منظمات النمو في منتجات الاستقلاب الثانوية في النوع *Thymus vulgaris*، وذلك باستعمال تراكيز مختلفة من BA مع IBA، وتمّ الحصول على أعلى عدد للنموات (14.3 نمواً) عند الزراعة على وسط MS يحوي 2 مغ.ل$^{-1}$ من BA مع 0.1 مغ/ل من IBA، كما أدّت إضافة BA بتركيز 0.5 مغ.ل$^{-1}$ مع 0.1 مغ.ل$^{-1}$IBA للوسط إلى زيادة إنتاج المركبات الفينولية، ونتج عن استعمال التراكيز المرتفعة من BA زيادة في المحتوى الكلي من الفلافونيدات وبالتالي تمّ التوصل في هذه الدراسة لأمثلة ظروف الزراعة المخبرية للزعتر مع إمكانية زيادة كمية منتجات الاستقلاب الثانوية.

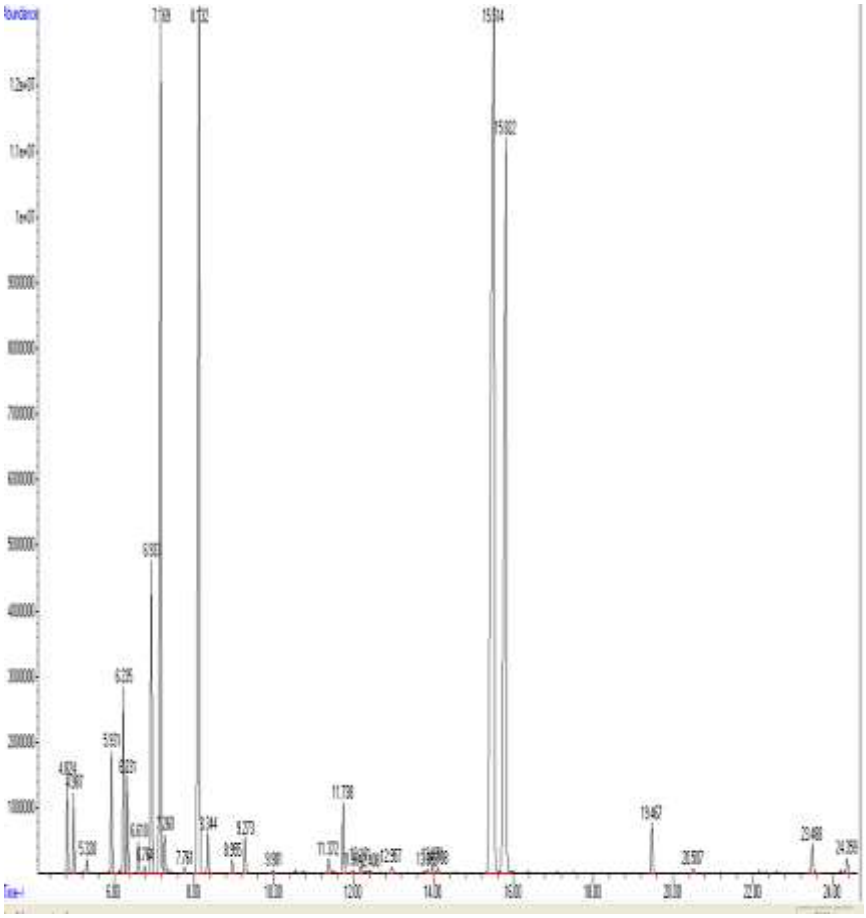
الجدول(4) :المركبات الكيميائية الموجودة ونسبة كل منها في زيت البردقوش *O.vulgare* في النبات البري والمزروع مخبرياً وحقلياً.

النبات الناتج عن التقسية		النبات الناتج عن المعاملة بالسيتوكينين		النبات البري		المركب	الرقم
%	RT	%	RT	%	RT		
0.48	4.99	0.64	4.99	0.75	4.98	**alpha-Pinene**	1
0.06	5.32	-	-	0.15	5.31	**Camphene**	2
5.11	5.86	5.44	5.86	4.48	5.85	**beta-Phellandrene**	3
0.34	5.96	0.37	5.96	0.44	5.95	**beta-Pinene**	4
1.35	6.23	1.15	6.23	1.19	6.23	**beta-Myrcene**	5
0.24	6.61	-	-	0.32	6.60	**Alpha-Phellandrene**	6
8.72	6.94	5.50	6.93	6.67	6.93	**alpha-Terpinen**	7
1.59	7.14	9.28	7.15	8.90	7.15	**o-Cymene**	8
2.57	7.27	2.67	7.27	2.69	7.26	**beta-Thujene**	9
-	-	0.17	7.35	0.23	7.34	**Cineole**	10
13.87	8.12	9.02	8.10	10.57	8.10	**gamma-Terpinen**	11
3.41	8.35	2.94	8.35	2.42	8.34	**p-Menth-8-en-1-ol**	12
2.99	8.96	2.28	8.96	2.43	8.95	**Terpinolene**	13
13.59	9.31	10.29	9.29	8.73	9.28	**cis-beta-Terpineol**	14
0.21	11.39	0.13	11.38	0.23	11.37	**Borneol**	15
27.69	11.84	21.92	11.82	24.90	11.82	**Terpinen-4-ol**	16
-	-	0.14	11.98	-	-	**p-Cymen-8-ol**	17
3.71	12.19	4.13	12.18	4.18	12.18	**alpha-Terpieol**	18
-	-	0.43	12.32	0.44	12.32	**trans-Piperitol**	19
0.40	12.33	0.16	12.38	-	-	**trans-Dihydrocarvone**	20
0.34	13.87	2.63	13.88	1.96	13.87	**(-)-Carvone**	21
0.74	14.23	1.14	14.23	-	-	**Linalyl anthranilate**	22
0.16	15.23	0.37	15.25	-	-	**Isogeraniol**	23
2.28	15.40	2.23	15.14	1.09	15.39	**Thymol**	24
2.15	15.71	3.19	15.70	3.90	15.70	**Carvacrol**	25
-	-	0.13	17.71	-	-	**Neryl acetate**	26
0.08	18.31	0.22	18.32	0.23	18.31	**Geranyl acetate**	27
1.21	19.46	2.17	19.47	1.94	19.46	**beta-Caryophyllene**	28
-	-	0.12	20.41	-	-	**alpha-Limonene diepoxide**	29
-	-	0.59	21.80	-	-	**Gamma-Elemene**	30
0.12	24.18	1.98	24.20	1.29	24.19	**Ent-Spathulenol**	31

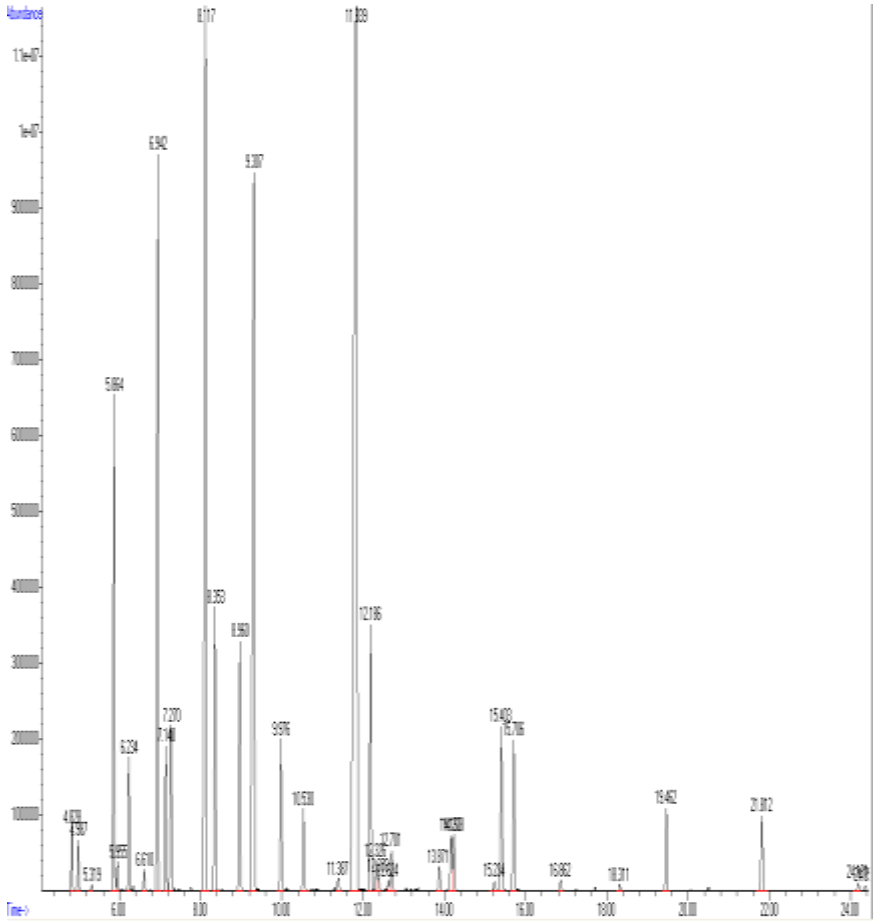
0.09	24.35	0.75	24.36	0.51	24.35	**Caryophyllene oxide**	32
-	-	0.15	25.20	-	-	**trans-Z-α-Bisabolene epoxide**	33
0.17	12.38	-	-	-	-	**dihydrocarvone**	34
73.21		92.33		90.64		المجموع	



الشكل (2): مخطط تحليل GC–MS لزيت البردقوش البري



الشكل(3): مخطط تحليل GC–MS لزيت البردقوش المزروع مخبرياً



الشكل(4): مخطط تحليل GC-MS لزيت البردقوش المزروع حقلياً .

الاستنتاجات:

- تم التوصل في هذا البحث لأمثلة زراعة البردقوش البري مخبرياً، وتحديد تأثير بعض الهرمونات النباتية في تشكل ونمو الفروع والجذور، حيث تم الحصول على أفضل نمو للفروع عند إضافة 2 مغ/ل من BAP مع 0.1 مغ/ل منNAA، وأفضل تجذير عند التركيز 1 مغ/ل من NAA.

- دُرس تأثير الهرمونات في كمية ونوعية الزيت المستخلص من نبات البردقوش حيث زادت كمية الزيت لتصل لـ 1.2% في النبات المزروع حقلياً مقارنة بالبري 0.4% مع تغير نسب عدد من المركبات الفعالة وبذلك فقد تمت أمثلة شروط الاكثار الخضري الدقيق لنبات البردقوش البري وزيادة إنتاج المركبات الفعالة مخبرياً.

المقترحات:

– تطبيق تقنية زراعة الأنسجة النباتية لحفظ الأنواع الطبية واستخدامها كمصادر لحفظ الأصول الوراثية وتحديد المواقع الوراثية المسؤولة عن تكوين الزيت.

– تعميق الدراسات المتعلقة بتطبيق المعاملات الهرمونية في الزراعة المخبرية وتحديد تأثيرها على مكونات الزيت الأساسية للاستفادة من هذه المعاملات في انتاج المركبات الفعالة المستخدمة في المجالات الصيدلانية.

– متابعة الدراسات الحقلية على النباتات الناتجة عن الزراعة المخبرية خلال مراحل نموها المختلفة وإجراء دراسات معمقة لتحديد التغيرات الجوهرية مقارنة بالنباتات الأم.

References:

- **Abu Lafi, S., I. Odeh. H. M. Dewik Qabajah. A. Imam . V.M. Dembitsky and L.O. Hanus. 2007**. Natural compounds of Palestine flora. Comparison analysis by static headspace and steam distillation GC-MS of semi voltile secondary metabolites from leaves of cultivated Palestinian *Majorana syriaca*. Biomed .Pap.Med.Fac.Univ.Palacky Olomouc Czech Republic,151:21-29.
- **Abu Lafi, S., I. Odeh . H. Dewik. M. Qabajah. L.O. Hanus. H. Dewik, M. Qabajah. L.O. Hanus and V.M. Dembitsky. 2008**.Thymol and carvacrol production from leaves of wild Palestinian *Majorana syriaca*.Bioresour. Technol., 99: 3914-3918.
- **Aicha,N.; Rachida.T.C and Abdelmalek,E.M. 2013**. Micropropagation of *Thymus satureioides* Coss. an endangered medicinal plant of Morocco. Journal of Agricultural Technology 9(2): 487-501.
- **Akbas,F.; Kuru,I.S and Orcan.P.K. 2015.** The Effects of BAP and Kin on Micropropagation of *Ajuga vestita* BOISS.; a Rare Endemic Medicinal Plant. nd Int'l Conference on Advances in Environment, Agriculture and Medical Sciences (ICAEAM'15, Antalya (Turkey).
- **Almeida, C.F.C.B.R and U.P.Albuquerque .2002**.Check-list of the family *Lamiaceae* in Pernambuco,Barazil.Brazilian Archives of Biology and Technology.,45(3):343-353.
- **Ayan,A.K., C.Cirak. K. Kevseroglu. and A. sok-men. 2005**. Effects of explant types and different concentrations of sucrose and phytohormones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforate* L.,Tr.J.Agr.For., 29:197-204.
- **Farooqi, A.H.A., A. Khan and S. Sharma .2003**. Effect of kinetin and chlormequatchloride on growth, leaf abscission and essential oil yield in *Mentha arvensis*.Indian Perfumer 47(4): 359-363.
- **Karalija,E and Parić,A. 2011**.The effect of BA and IBA on the secondary metabolite production by shoot culture of *Thymus vulgaris* L. 2 (1) : 29-35.
- **Leelavathi,D and Kuppan,N. 2013**. Protocol for Rapid Multiplication Using In Vitro Apical Bud of *Lavandula Angustifolia*. Journal of Pharmacy and Biological Sciences 7(3): 96-98.
- **Murashige, T and F.Skoog.1996**. Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-497.

- **Novak,I., E. Zambori-Nemeth.H. Horvath. Z. Seregel and K. Kaffka. 2003.**Study of essential oil components in different origanum species by GC and sensory analysis. Acta Alimentaria, 32(2): 141-150.
- **Oana,C.T., M. Falticeanu. And M. Prisecaru. 2010**.Studies regarding the micropropagation of *origanum vulgare* L. (oregano,wild majoram) throught ,in vitro, tissue culture. Vegetable research. Development station bacau.
- **Oluk, E.A and A. Cakir. 2009**.Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey. African Journal of Biotechnology .8(21): 5769-5772.
- **Oudin, A.,S. Mahroug. V. Courdavault .N. Hervouet .C. Zelwer .M. Rodríguez- Concepción .B. St-Pierre and V. Burlat .2007**. Spatial distribution and hormonal regulation of geneilva products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. Plant Mol Biol65:13-30.
- **Papon,N.J. Bermer.A.Vansiri. F. Andreu. M. Rideau and J.Creche.2005**. Cytokinin and ethylene control indole alkaloid production at the level of the MEP/terpenoid pathway in *Catharanthus roseus* suspension cells. Planta Med 71:572-574.
- **Poyh, J.A and E.O. Ono .2006**. Rendimento do óleo essencial de *Salvia officinalis* L. sob ação de reguladores vegetais. Acta Sci Biol Sci 28(3): 189-193.
- **Sangwan, N.S. A.H.A. Farooqi. F. Shabih and R.S. Sangwan. 2001**.Regulation of essential oil production in plants.Plant Growth Regul 34:03-21.
- **Silva, A.S . 2002**. Análise técnica econômica e de tendências da indústria brasileira de óleos essenciais. Papel Virtual, Rio de Janeiro. 202 p.
- **Spada, P and P. Perrino.1996**.Conservation of oregano species in national and international coolections. Germplasm institute.National research council. Bari.Italy.
- **Taiz, L. and E. Zeiger .2004**. Fisiologia Vegetal. 3ª ed. Artmed, Porto Alegre. 719 p.
- **Vuylsteke, D.R. 1989**. Shoot tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa germplasm.* Practical Manuals for Handing Crop Germplasm *In Vitro* 2.Rome,International Board for Plant. Genetic Resources.