



جامعة كربلاء

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التشخيص الجزيئي لنبات *Physalis angulata* والتركيب الكيميائي
وتقييم الفعالية التثبيطية لمستخلص أوراقه ضد بكتريا *Staphylococcus*
aureus المعزولة من مصادر سريرية

مقدمة إلى مجلس كلية العلوم / جامعة كربلاء
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

كتبت بواسطة

أحمد زغير جلاب

بإشراف

أ.م.د زينة ثامر عبد الحسين الرفيعي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

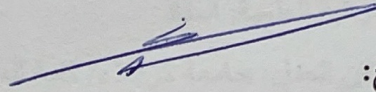
الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي هَدَانَا لِهَذَا
وَمَا كُنَّا لِنَهْتَدِيَ لَوْلَا إِذْ هَدَانَا
اللَّهُ

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

سورة الأعراف آية (43)

إقرار المشرف

اشهد إن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة كربلاء بوصفها جزء من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في علوم الحياة.



التوقيع:

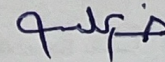
الاسم: د زينة ثامر عبد الحسين

المرتبة العلمية: أستاذ المساعد

التاريخ: / / 2023

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المشرف، أحيل هذه الدراسة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع: 

الاسم: د . خالد علي حسين

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : / / 2023

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة، نشهد أننا اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة (التشخيص الجزيئي لنبات *Physalis angulata* والتركيب الكيميائي وتقييم الفعالية التثبيطية لمستخلص أوراقه ضد بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من مصادر سريرية) وناقشنا الطالب (احمد زغير جلاب) في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 2023/10/17 ونرى أنه جدير بالقبول لنيل شهادة الماجستير في علوم الحياة.

رئيس اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. علي عبد الكاظم جاسم

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة كربلاء/ كلية العلوم

التاريخ: 2023 / 11 / 14

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. بلقيس هادي هاشم

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة كربلاء/ كلية العلوم

التاريخ: 2023 / 11 / 14

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. نضال عبد الحسين مسان

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة الكوفة/ كلية التربية للبنات

التاريخ: 2023 / 11 / 14

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع:

الاسم: د. زينة ثامر عبد الحسين

المرتبة العلمية: أستاذ المساعد

مكان العمل: جامعة كربلاء/ كلية العلوم

التاريخ: 2023 / 11 / 14

مصادقة عميد كلية العلوم/جامعة كربلاء

التوقيع:

الاسم: د. حسن جميل جواد الفتلاوي

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة كربلاء/ كلية العلوم

التاريخ: 2023 / 11 / 14

إهداء

إلى معلم البشرية الأول محمد (صلى الله عليه وآله وسلم).
إلى والدي ووالدتي حفظهم الله.
إلى زوجتي ورفيقة دربي.
إلى اخواني وأخواتي وفاءً وعرفاناً.
إلى أطفالي زهراتي وفلذات كبدي.
إلى كل من لم يدخر جهداً في مساعدتي
إلى أساتيذني، واهل الفضل عليّ الذين غمروني بالحب والتقدير والنصيحة والتوجيه
والإرشاد.

أهدي جهدي هذا

الباحث احمد

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف الأنبياء والمرسلين سيدنا محمد وعلى آله
الطيبين وصحبه المنتجبين.

أما بعد:

فإني أشكر الله تعالى إذ أعطاني الصحة والصبر والمعرفة لإكمال هذه الرسالة فله الحمد
على جزيل فضله ونعمائه.

ويشرفني إن أقدم شكري وتقديري لأستاذتي الفاضلة الدكتورة (زينة ثامر عبد الحسين)
لأشرافها على هذه الرسالة، وما قدمته من نصح وتوجيه ساعد في اخراج هذا النتاج العلمي وساهم
في تجاوز الكثير من الصعاب.

ويطيب لي إن أوجه خالص الشكر والتقدير إلى عمادة كلية العلوم ورئيس قسم علوم الحياة
(الدكتور خالد اليساري) للمساعدة التي قدموها لي خلال مدة الدراسة.

كما أتقدم بالشكر الجزيل أ.د. وفاء الوزني و أ.د. علي عبد الكاظم و أ.د. حيدر الكرعوي و ا.م.د.
عدنان لهوف و د. شروق كاني والأستاذة نضال وهاب، لمساعدته الكبيرة، وشكري لجميع المرضى
لتعاونهم معي.

وايضا الشكر والتقدير إلى مدير مركز الامام الحسين ع للمخطوطات والتحقيق الاستاذ مناف
التميمي والشكر للأخوة العاملين في المركز و اخص بالذكر الاخ علاء كاظم حمود
والى كل من ساعدني بجمع العينات مختبر مستشفى الامام الحسن المجتبي التعليمي و اخص
بالذكر الاخ الاستاذ أكرم جبار

جزيل الشكر والامتنان إلى العاملين في مختبر الصحة العام و اخص بالذكر السيدة أميره محمد
جبر جعل الله ثمرة ذلك في ميزان حسناتهم.

كما أتقدم بالشكر الجزيل للدكتورة (الهام عبد الهادي خلف) مركز الرازي للبحوث وإنتاج
العدد التشخيصية واستاذ رئيس بايولوجيين أقدم معمر طالب حمد مركز بحوث ابن البيطار والاستاذ
احسان هادي عبید هیأة البحث والتطوير الصناعي.

ومن العرفان أن أقدم شكري وامتناني إلى زملائي طلبة الدراسات العليا لما قدموه من
المساعدة خلال مدة البحث، و اخص بالذكر السيد (احمد الشكرجي) والسيدات (فاطمة سالم ورحاب
المدني).

وأخيرًا خالص تقديري لكل من ساعدني وأعانني في إنجاز هذه الرسالة، فلهم في النفس
منزلة وإن لم يسعف المقام ذكرهم، فهم أهل للفضل والخير والشكر.

احمد

الخلاصة

تضمنت الدراسة التشخيص الجزيئي لنوعين من نبات *Physalis spp* المدخلة الى العراق اعتمادا على المناطق المحافظة مثل تسلسل الحامض النووي للبلاستيدة الخضراء Chloroplast DNA (cpDNA) وتسلسل للحمض النووي الريبوزومي (nrDNA) nuclear region ribosomal DNA ، تم جمع العينة الاولى من احد المشاتل التابعة للعتبة العباسية المقدسة / محافظة كربلاء المقدسة ، اما العينة الثانية تنتشر بصورة طبيعية في بعض البساتين تم جمعها وتصنيفها اعتمادا على الشكل المظهري فوجد انهم يعودان الى العائلة الباذنجانية (Solanaceae) ومن الجنس *Physalis* والعينتان يجري إكثارهم ذاتيا .

بينت النتائج انعزال النوعين عن بعضهم البعض ، اذا اشارت التسلسلات النيوكليوتيدية الى الهوية المؤكدة للمجاميع المتضخمة عن طريق موقع بنك الجينات gene bank كما بينت نتائج تضاعف تسلسلات cpDNA وجود أوجه تشابه عالية للعينة الاولى وتسلسل الوراثة المودع في بنك الجينات مع النوع *Physalis peruviana* المودع تحت الرقم التسلسلي HQ216178.1 بنسبة 98.59% والذي ينتمي الى سلالة صينية لنفس الجنس كما بينت النتائج وجود ثلاث طفرة عند المقارنة بين تسلسل القواعد النايتروجينية ، تم تسجيل النوع من قبل الباحث باسم *Physalis peruviana isolate AH-ZE1* تحت الرقم التسلسلي OQ625502.1

اما عند استخدام تسلسلات المنطقة nrDNA لوحظ وجود أوجه تشابه عالية للعينة الاولى مع النوع *Physalis peruviana* 217 المودع في البنك الجيني بالرقم التسلسلي DQ314161.1 بنسبة 96.91% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية ، كما بينت النتائج وجود 8 طفرة عند المقارنة بين تسلسل القواعد النايتروجينية لها ، وتم تسجيل النوع في بنك الجيني باسم *Physalis peruviana isolate AH-ZE1* تحت الرقم التسلسلي OQ616506.1. اما العينة الثانية لوحظ وجود أوجه تشابه عالية مع النوع *Physalis angulata isolate LHR28I* المودع في البنك الجيني بالرقم التسلسلي MK412130.1 بنسبة تشابه 98.02% الذي ينتمي الى سلالة توجد في اسبانية، كما بينت النتائج وجود 10 طفرة عند المقارنة بين تسلسل القواعد النايتروجينية لها، تم تسجيل النوع من قبل الباحث باسم *Physalis angulata isolate AH-ZE1* تحت الرقم التسلسلي OQ616509.1 .

بينت نتائج تحليل GC-Mass احتوى العينة *Physalis angulata* isolate AH-ZE1 على اربعة وعشرون مركبًا فعالة لها كثير من الفعالية الطبية ، كما بينت النتائج ان المستخلص الكحولي لنبات *Physalis angulata* لهو خصائص مضاد للأكسدة اذ ترتفع النسبة المئوية لمضاد الاكسدة كلما زاد تركيز المستخلص اذا بلغت اعلى نسبة لمضاد الاكسدة 94% عند تركيز 140 مايكروغرام / مل من المستخلص واقل نسبة مئوية لمضاد الاكسدة 42% عند تركيز مايكروغرام / مل 20 يعود الى وجود نسبة عالية من مركبات الفينول في المستخلص النباتي التي تتناسب طردية مع النسبة المئوية لمضاد الاكسدة ،

اما عن فعالية المستخلص الكحولي لنبات *Physalis angulata* AH-ZE1 ضد البكتريا فقد اظهرت نتائج قطر الهالة للتثبيط المستعمرات المكورات العنقودية ان تركيز 25 % من المستخلص كان اكثر كفاءة في التثبيط المكورات العنقودية غير منتجة لأنزيم التجلط معدل المثبط الادنى (22.43 ± 1.24) ملم مقارنة مع معدل التثبيط للمستعمرة المكورات العنقودية موجبة انزيم التجلط (18.34 ± 1.24) بمستوى معنوية (P < 0.05)، من جانب اخر اظهر افضل تركيز مثبط ادنى عند استخدام المضاد الحيوي دوكسي سايكلين بلغ 42.47 ± 1.88 ملم و 42.6 ± 1.76 لكلا من المستعمرات العنقودية موجب وسالبة انزيم التجلط مع عدم وجود فروقات معنوية بين المضادات الحيوي

كما بينت نتائج دراسة التعبير الجيني لجين (coa) *coagulase gene* وجود فروقات معنوية واضحة في مستويات التعبير الجيني بين جميع معاملات المستخلص الكحولي لنبات *Physalis angulata* ومجموعة السيطرة ، اذ انخفاض مستوى التعبير الجيني في المعاملات T2، T3 و T4 عند مقارنتها معاملة السيطرة وان هذا يؤثر بشكل سلبي على تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *Staphylococcus aureus* مما يؤدي على تقليل نمو البكتريا ، في حين ان المعامل T1 من المستخلص ارتفاع مستوى التعبير الجيني عند مقارنتها مع معاملة السيطرة لجين Coa وهذا يؤدي الى زيادة نشاط وفعالية هذا الجين في تنشيط وادامة الغشاء الحيوية مما يؤدي الى زيادة نمو البكتريا المرضية بينما كلما زاد التركيز المستخلص انخفض التعبير الجيني لجين Coa لبكتريا *Staphylococcus aureus* مما يدل على كفاءة المستخلص الكحولي لنبات *Physalis angulata* ذو تركيز (50، 75 و 100) % كمضاد لتكوين الغشاء الحيوي (Anti-biofilm formation)

قائمة المحتويات

الصفحة	المحتويات	التسلسل
أ-ب	الخلاصة	
I	قائمة المحتويات	
V	قائمة الأشكال	
VII	قائمة الجداول	
IX	قائمة المختصرات	
3-2	الفصل الأول: المقدمة	1-1
4	إستعراض المراجع	2-1
4	النبات <i>Physalis</i>	1-2-1
5	تشخيص انواع نبات <i>Physalis</i>	2-2-1
6	الواسمات الجزيئية	3-2-1
7	المؤشرات الجزيئية المستخدمة في التوثيق الجزيئي للنبات <i>Physalis</i>	4-2-1
7	جينات البلاستيده (Chloroplast DNA (CpDNA	1-4-2-1
10	جينات الحمض النووي الريبوزومي (nrDNA region nuclear ribosomal)	2-4-2-1
11	التركيب الكيميائي والفعاليات الحيوية لنبات <i>Physalis</i>	5-2-1
12	مضادات الاكسده (Antioxidant)	1-5-2-1
12	مضادات الاكسده الأولية (Primary antioxidants)	1-1-5-2-1
12	مضادات الاكسده الثانويه (Secondary antioxidants)	2-1-5-2-1
13	البية عمل مضادات الاكسده	3-1-5-2-1
14	الفعالية المضادة للأكسده لنبات <i>Physalis</i> :	4-1-5-2-1
14	الفعالية المضادة للأحياء المجهرية في نبات <i>Physalis</i>	2-5-2-1
15	جنس المكورات العنقودية (Staphylococci)	6-2-1
16	بكتريا <i>Staphylococcus aureus</i>	1-6-2-1
17	تصنيف بكتريا (<i>S. aureus</i>)	1-1-6-2-1

18	امراضية بكتريا (<i>S. aureus</i>)	2-1-6-2-1
	الفصل الثاني: المواد وطرائق العمل	
21	الأجهزة والمواد المستعملة	1-2
21	الاجهزة المختبرية المستخدمة	1-1-2
22	المواد الكيميائية والاحيائية المستخدمة	2-1-2
23	الأوساط الزرعية	3-1-2
23	أقراص المضادات الحيوية Antibiotics	4-1-2
24	طرائق العمل	2-2
24	جمع العينات النباتية (Collection of plant samples)	1-2-2
24	التشخيص الجزيئي Molecular identification للعينات النباتية	2-2-2
25	خطوات عزل DNA من النماذج النباتية DNA Isolation from Plant Samples	1-2-2-2
26	البادئات (Primers) المستخدمة في التشخيص	2-2-2-2
27	مكونات Master Mix	3-2-2
27	الدليل الحجمي (DNA ladder)	4-2-2
28	تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)	5-2-2
29	الترحيل الكهربائي (Electrophoresis)	6-2-2
29	طريقة تحليل نتائج تسلسل قواعد النايتروجينية للحامض النووي	7-2-2
30	تحضير المستخلصات النباتية	3-2
30	كشف عن المركبات الكيميائية الفعالة في اوراق نبات <i>Physalis</i>	1-3-2
30	الكشف النوعي والكمي عن المركبات الفعالة	1-1-3-2
32	تحليل GC-mass (مطيافية كروماتوغرافيا الغاز)	2-1-3-2
32	تحديد المكون الكيميائي	2-3-2
33	اختبار الفعالية المضادة لأكسدة المستخلصات النباتية	4-2
33	عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية	5-2
33	التعقيم Sterilization	1-5-2

34	الأوساط الزرعية	2-5-2
35	الكواشف والمحاليل (Reagents and Solutions)	3-5-2
37	عزل البكتريا	4-5-2
37	تشخيص البكتريا المعزولة	1-4-5-2
37	الصفات المجهرية	1-1-4-5-2
38	الصفات الزرعية	2-1-4-5-2
38	الفحوصات الكيموحيوية	3-1-4-5-2
39	تشخيص البكتريا المعزولة باستعمال جهاز الفايترك vitek-2-compact system	2-4-5-2
40	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotics Sensitivity test	3-4-5-2
40	حفظ العزلات البكتيرية	6-2
41	اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية ضد البكتريا	7-2
41	التحري عن الجين Coagulase في بكتريا المكورات العنقودية	8-2
41	طريقة عزل الحامض النووي RNA	1-8-2
42	تصنيع cDNA	2-8-2
43	إعداد المزيج الرئيسي الكمي في الوقت الحقيقي qPCR.	3-8-2
44	التحليل الإحصائي	9-2
44	تحليل بيانات Data analysis of qPCR	10-2
الفصل الثالث: النتائج والمناقشة		
45	التشخيص الجزيئي لنبات <i>Physalis</i> :	1-3
45	تحليل النشوء والتطور لأنوعين من جنس نبات <i>Physalis</i> بناءً على التغيرات في منطقة البلاستيدة (cpDNA) chloroplast DNA Region	1-1-3
50	تحليل النشوء والتطور لأنوعين من الجنس <i>Physalis</i> بناءً على التغيرات في منطقة Ribosomal DNA ITS Region	2-1-3
60	تحليل كروماتوغرافيا الغاز - مطيافية الكتلة (Gas Chromatography – mass) للمستخلص النباتي <i>Physalis angulata</i> isolate AH-ZE1	2-3

63	تقييم الفعالية المضادة للاكسدة لنبات <i>Physalis angulata</i> isolate AH-ZE1	3-3
64	عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية	4-3
69	الكشف المظهري عن البكتريا المقاومة للمثيسيلين MRSA	1-4-3
69	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	2-4-3
73	تحديد التراكيز المثبطة لمستخلص النبات <i>Physalis angulata</i> isolate AH-ZE1 ضد بكتريا المكورات العنقودية	3-4-3
77	التعبير عن جين coagulase في <i>Staphylococcus aureus</i>	4-4-3
الاستنتاجات والتوصيات		
81	الاستنتاجات	1-4
82	التوصيات	2-4
83	المصادر	

قائمة الاشكال

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
5	شكل ال- <i>Physalis</i>	1-1
9	خريطة جينية لجينوم <i>Physalis</i> في البلاستيدات الخضراء. يتم نسخ الجينات التي تظهر خارج الدائرة الخارجية في اتجاه عقارب الساعة	2-1
19	اهم عوامل الضراوة في بكتريا المكورات العنقودية	3-1
45	عينات DNA المعزولة من نبات <i>Physalis</i> والمرحلة على هلام الاكاروز (0.9%) لمدة ساعة (4-1 عينات النوع الأول، 5-8 عينات النوع الثاني)	1-3
46	نتائج تفاعل PCR لجين psbA-trnH (ظهور حزمة بحجم 800 pb في العينة الاولى فقط من نبات <i>Physalis</i>)	2-3
47	الشجرة الوراثية تبين العلاقة بين نبات <i>Physalis peruviana</i> isolate AH-ZE1 (محددة بنقطة ذو لون اسود) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات القواعد النايتروجينية لعضية البلاستيدة بالاضافة الى تتابعات سلالات عالمية لبلاستيدات انواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank. ان المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining .	3-3
48	النسبة المئوية للتشابه بين عزلة <i>Physalis peruviana</i> isolate AH-ZE1 (محددة بمستطيل ذو حواف حمراء) وعزلات وسلالات عالمية لانواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank علما ان هذه النسبة قد تم احتسابها بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة البلاستيدة (cpDNA chloroplast DNA باستعمال برنامج Sequence Demarcation Tool)	4-3
49	التطابق بين العينة الاولى التي تم تسجيلها - <i>Physalis peruviana</i> isolate AH-ZE1 مع العينة ذات تحت الرقم التسلسلي HQ216178.1 بنسبة 98.59% والذي ينتمي الى سلالة صينية	5-3
50	نتائج تفاعل سلسلة تفاعل البوليمريز (PCR) لجين ITS في نبات <i>Physalis</i> A) للعينة الأولى، B) للعينة الأولى والثانية)	6-3
52	الشجرة الوراثية للعلاقة بين النوع قيد الدراسة <i>Physalis peruviana</i> isolate AH-ZE1 (محددة بنقطة ذي لون اسود) والتتابعات سلالات عالمية لانواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالاضافة الى المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining .	7-3
53	النسبة المئوية للتشابه بين عزلة <i>Physalis peruviana</i> isolate AH-ZE1 (محددة بمستطيل ذو حواف حمراء) وعزلات وسلالات عالمية لانواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank علما ان هذه النسبة	8-3

	قد تم احتسابها بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA باستخدام برنامج Sequence Demarcation Tool	
54	<i>Physalis peruviana</i> isolate التي تم تسجيلها مع العينة الاولى التي تم تسجيلها AH-ZE1 مع العينة ذات الرقم التسلسلي DQ314161.1 بنسبة تشابه 96.91% توجد الولايات المتحدة الامريكية	9-3
57	الشجرة الوراثية توضح العلاقة بين النوع قيد الدراسة <i>Physalis angulata</i> isolate AH-ZE1 (محددة بنقطة ذي لون اسود) وتتابعات سلالات عالمية لأنواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining .	10-3
58	النسبة المئوية للتشابه بين النوع الثاني <i>Physalis angulata</i> isolate AH-ZE1 (محددة بمستطيل ذو حواف حمراء) وعزلات وسلالات عالمية لأنواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank علما ان هذه النسبة قد تم احتسابها بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA باستخدام برنامج Sequence Demarcation Tool	11-3
59	التطابق بين العينة الثانية التي تم تسجيلها باسم <i>Physalis angulata</i> isolate AH-ZE1 مع العينة ذات الرقم التسلسلي MK412130.1 بنسبة 98.02% الذي ينتمي الى سلالة اسبانية	12-3
62	تحليل GC-mass لمستخلص أوراق <i>Physalis angulata</i>	13-3
64	الفعالية المضادة للاكسدة لمستخلص نبات <i>Physalis angulata</i> AH-ZE1 باستخدام كسح الجذور الحرة	14-3
65	عزل مستعمرات المكورات العنقودية من الحالات السريرية	15-3
66	توزيع نسب عزلات المكورات العنقودية بحسب مصادر عزلها	16-3
67	توزيع نسب عزلات المكورات العنقودية المعزولة من الحالات السريرية مختلفة (الحروق، الجروح، الادرار) للذكور A والاناث B	17-3
68	المستعمرات المكورت العنقودية على وسط (MSA).	18-3
70	توزيع المكورات العنقودية بحسب مقاومتها الى الميثيسيلين	19-3
70	مقاومة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية نوع (MRSA) ضد بعض انواع المضادات الحيوية	20-3
71	مقاومة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية نوع (MSSA) ضد بعض انواع المضادات الحيوية	21-3

79	التعبير الجيني العالي والمنخفض لجين coa العائد لبكتريا المكورات العنقودية عند استخدام المستخلص الكحولي <i>Physalis angulata</i> isolate AH-ZE1	22-3
----	--	------

قائمة الجداول

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
13	اليات عمل مضادات الاكسدة	1-1
17	المفتاح التصنيفي لجنس المكورات العنقودية	2-1
21	الاجهزة المستخدمة	1-2
22	المواد المستخدمة	2-2
23	الايوساط الزراعية المستخدمة	3-2
23	المضادات الحيوية	4-2
24	المواد ذات الاستخدام الواحد	5-2
27	البادئات المستخدمة في الدراسة	6-2
27	مكونات خليط التفاعل Master mix.	7-2
28	وصف الدليل الحجمي للـ DNA	8-2
43	بروتوكول المزيج الكمي الرئيسي القياسي qPCR	9-2
44	برنامج التضخيم qPCR	10-2
49	الطفرات بين التسلسل العينة قيد الدراسة مع العينات المسجلة في البنك الجينات NCBI-BLAST	1-3
55	الطفرات بين التسلسل العينة قيد الدراسة مع العينات المسجلة في البنك الجينات NCBI-BLAST	2-3
59	الطفرات بين التسلسل العينة قيد الدراسة مع العينات المسجلة في البنك الجينات NCBI-BLAST	3-3

61	تحليل GC-mass لمستخلص اوراق <i>Physalis angulata</i> isolate AH-ZE1	4-3
63	المركبات الفعالة باستخدام بعض الكواشف لنبات <i>Physalis</i>	5-3
66	اختبارات المزرعية والكيموحيوية لبكتريا المكورات العنقودية	6-3
74	الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات <i>Physalis angulata</i> isolate AH-ZE1 ضد بكتريا المكورات العنقودية	7-3
75	معدل تأثير مستخلص أوراق نبات <i>Physalis angulata</i> isolate AH-ZE1 في تثبيط بكتريا المكورات العنقودية	8-3
76	الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات الـ <i>Physalis angulata</i> في تثبيط بكتريا المكورات العنقودية	9-3
78	التعبير الجيني لجين (Coa) باستخدام طريقة (Livak methods) لبكتريا <i>Physalis angulata</i> الكولي استخدم المستخلص الكولي <i>Physalis angulata</i> isolate AH-ZE1	10-3

قائمة المختصرات

المعنى	الاختصار
Gram positive identifier	GD
Gram negative identifier	GN-ID
Common lymphoid progenitors	CLP
Common lymphoid progenitors-2	CLP-2
granulocyte macrophage colony stimulating factor	CSF-GM
gas chromatography–mass spectrometry	GC-MS
Microextraction Małgorzata	HS-SPME
solvent-assisted flavor evaporation	SAFE
Amplified Fragment Length	AFLP
Simple Sequence Repeat	SSR
of Polymorphic Random Amplification	RAPD
Sequence-tagged site	STS
Chloroplast DNA	cpDNA

الفصل الأول

المقدمة واستعراض المراجع

Introduction & Literature Review

1-1 المقدمة

يعد التشخيص الصحيح للنباتات أمرًا بالغ الأهمية من أجل الاستخدام الآمن والتسويق التجاري للنباتات المهمة اقتصاديًا وطبيياً لا سيما داخل الأجناس الغنية بالأنواع وان الاعتماد على التباين المظهري في التمييز بين الأنواع ضمن الأجناس أمر صعب للغاية، فعائلة *Solanaceae* تمتلك أكبر تنوع بيولوجي اذ تحتوي ما يقارب 100 جنس و2500 نوع والتي تتوزع بشكل رئيس في المناطق الاستوائية (Pablos *et al.*, 2018).

ومن اهم واكبر اجناسها هو جنس *Physalis* الذي يمتاز بتنوع كبير وله أهمية اقتصادية و طبية (Zhang, and Tong, 2016) فهو غني بالفيتامينات والمعادن وله خصائص طبية كثيرة كونه مضاد للبكتيريا والفطريات ومضاداً للسرطان ومضاداً للأكسدة ومضاداً للتهاب الكبد واضطرابات الكلى ويعالج الإصابة بالمalaria وله خصائص خافضة للحرارة وذلك لاحتوائه على مركبات ثانوية مثل القلويدات والفلافونيدات والكاروتينات والفينولات والصابونيات والفيتامينات والسكريات في أجزاء مختلفة من النبات (Singh *et al.*, 2019) (Popova *et al.*, 2020).

ان أنواع جنس نبات *Physalis* متشابهة جدا ومن الصعب التمييز بينها بسرعة وبدقة بناءً على الخصائص المظهرية اذ توفر معلومات قليلة عن علاقات النشوء والتطور بين عدة انواع ضمن الاجناس ، لذا لا يزال تصنيف الأنواع وتطور نسله *Physalis* مثيراً للجدل الى حد الان .

وفي الآونة الاخيرة أظهرت طرائق التشخيص الجزيئية المعتمدة على الحمض النووي في تحديد الهوية دقة اكثر من الطرائق التقليدية، اذ تحتوي الطرق الجزيئية على تقنيات مهمة و متطورة لدراسة التصنيف والنشوء والتطور والكشف عن الاختلافات والتباين الوراثي في المنطقة المحفوظة مما يساعد على التحديد الدقيق للأنواع ومن اهم هذا التقنيات تقنيات DNA barcoding التي تعتمد على الاختلاف في التتابعات القصيرة والمحفوظة وتمتاز بضمان مستوى عالٍ من التمييز بين الأنواع، ومن اهم المناطق المحفوظة هي منطقة البلاستيدة (Chloroplast cpDNA) وتشمل التتابعات (psbA – trnH، ycf، rbcL، matK، إلخ) اذ قدمت هذه التقنية تطور سريع في مجال علم الجينوم (Wang *et al.*, 2018)، لغاية ايلول من عام 2022 تم إصدار أكثر من 37500 تسلسل جينوم كامل اعتمادا على منطقة cpDNA من ضمنها النوع (*P. peruviana*) (رقم انضمام : GenBank NC_026570) تم توثيقه في قاعدة بيانات الجينوم للمركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI National Center for Biotechnology Information). وبهذا فإن معظم جينومات CP النباتية تحتوي على محتوى جيني محفوظ للغاية (Dong *et al.*, 2021)، (Guo *et al.*, 2021)، اما المنطقة الثانية هي منطقة

المحافظة للحمض النووي الريبوزومي (nrDNA) nuclear ribosomal DNA region تستخدم متواليات فاصل النسخ الداخلي للحمض النووي الريبوزومي (ITS) ribosomal DNA internal transcribed spacer التي تقع بين الوحدات الفرعية الصغيرة والكبيرة من RNA الريبوسوم في منطقة النسخ الكروموسومية وتعد الأكثر شيوعاً في دراسات التمييز بين الأنواع (Feng *et al.*, 2018). ويعد استخدام مزيجاً من الجينات لمناطق المحافظة من البلاستيده والمنطقة النووية أداة فعالة لتحقيق التمييز السريع بين أنواع النباتات.

وعلى الرغم من أن بكتريا *Staphylococcus aureus* تتعايش بشكل طبيعي مع الإنسان كونها تستوطن في (20-30%) من الأشخاص البالغين ، إلا أنها في الوقت نفسه تصنف ضمن الممرضات الغازية (invasive pathogens) إذ إنها تعدّ المسبب الرئيس للإصابات الجلدية والأنسجة الرخوة وإصابات مجرى الدم والقنوات التنفسية والقناة البولية فضلاً عن إمكانية غزوها لأي نسيج في الجسم محدثة مجموعة من الأمراض الخطيرة مثل التهاب نقي العظم (Osteomyelitis) وذات الرئة (Pneumonia) والتهاب شغاف القلب (endocarditis) وأمراض التسمم الغذائي (Costello, 2010; Wertheim *et al.*, 2005; Norm, 2011).

لذا هدفت هذه الدراسة لتحديد الأنواع الموجودة من نبات *Physalis* في العراق عبر تحقيق المحاور الآتية: -

- 1- توثيق نوعين من جنس نبات *Physalis spp* المدخلة الى العراق باستخدام المؤشرات الجزيئية اعتماداً على الاختلافات في تسلسل منطقة البلاستيده (cpDNA) chloroplast DNA region ومنطقة للحمض النووي الريبوزومي (rDNA) nuclear ribosomal DNA region.
- 2- معرفة العلاقة التطورية بين الأنواع المدخلة *Physalis spp* والمقارنة بالتسلسلات الموجودة في البنك الجيني (GeneBank) للأنواع المحددة مسبقاً.
- 3- تحديد المركبات الفعالة في هذا النبات باستخدام تقنية GC mass.
- 4- تحديد بعض الفعاليات الحيوية للمستخلص النباتي مثل الفعالية المضادة للأوكسدة والمضادة للبكتيريا.
- 5- عزل وتشخيص بكتريا *S.aureus* من المرضى الراقدين في ردهة الحروق والجروح والمسالك البولية في المستشفيات.
- 6- تقييم الفعالية التثبيطية لمستخلص أوراق نبات *Physalis* ومقارنتها ببعض المضادات الحيوية.
- 7- دراسة التعبير الجيني الناتج من تأثير المستخلص *Physalis spp* لجين *coagulase Staphylococcus aureus*

2-1 استعراض المراجع

1-2-1 النبات *Physalis*

يعد جنس *Physalis* من أهم اجناس عائلة *Solanaceae* التي تتصف معظم انواعها بكونها نباتات حولية عشبية أو معمرة، وموطنه الأصلي أمريكا الشمالية والجنوبية الاستوائية. بعض الأنواع لها ثمار كروية صالحة للأكل محاط بقشور ورقية عند النضج. يضم أكثر من 70 إلى 95 نوعًا (Pretz and Deanna., 2020).

يتواجد نبات *Physalis* بشكل طبيعي في الأمريكيتين كما يوجد على نطاق واسع في آسيا وأوروبا (Vdovenko et al. 2021, Feng et al. 2020).

يحتوي جنس *Physalis* على أنواع ذات أهمية اقتصادية وغذائية وطبية وتحتوي على فيتامينات، معادن، كاروتينات، ومركبات فينولية لها خصائص مغذية وفوائد صحية كثيرة

(Punkte et al., 2019) (Shenstone et al. 2020) و (Ramadan and Mörsel., 2019). كما تحتوي على مركب α -phellandrene و β -myrcene، والليمونين و مركب p-cymene المضاد للحياة المجهرية والمضادة لمرض السكر والمضادة للفطريات والمضادة للألم و الالتهابات (Punkte et al., 2019).

يعد نبات *Physalis peruviana L* أحد أكثر الأنواع أهمية، وهو نبات عشبي، شبه شجيرة، منتصب، موطنه الأصلي أمريكا الجنوبية الاستوائية (Ramadan and Mörsel, 2019). وخصوصا في كولومبيا، Agronet., (2019) يُزرع هذا النبات في مناطق بين (1500 - 3000) متر فوق مستوى سطح البحر ويمكن أن ينمو إلى ارتفاع يصل إلى (60-90) سنتيمتر، وفي بعض الحالات يمكن أن ينمو حتى يصل إلى 1.8 م. الثمار عبارة عن ثمار توتية دائرية يبلغ متوسط قطرها (20-25) ملم ويبلغ وزنها (4-5) غرام تقريبا، يكون محميًا بكأس لامع ومغطى بقشر أصفر راتنجي لامع، يحتوي داخله حوالي (100 - 200) بذرة صغيرة (Nocetti et al., 2020) كما في الشكل (1-1). تمتلك الثمار خصائص مضادة للتشنج، ومدرة للبول، ومطهرة، وخصائص مسكنة، وتساعد أيضًا على تقوية العصب البصري، والقضاء على الطفيليات المعوية والأميبيا. يتم استخدام هذا النبات على نطاق واسع كعشب طبي لعلاج أمراض مثل السرطان والملاريا والربو والتهاب الكبد والتهاب الجلد والروماتيزم (Akbaba., 2019) حتى الآن، لا توجد دراسات تشير إلى آثار ضارة محتملة لهذا النبات.

يعد هذا النبات بشكل عام ثمرة جذابة للأسواق الدولية بفضل خصائصها الغذائية والطبية الهامة وتكيفها مع الظروف البيئية المتغيرة (SánchezReinoso et al., 2019).

تم تحضير مستخلصاته بطرائق مختلفة لغرض معرفة وتحديد المركبات الفعالة حيويًا باستخدام تقنيات مختلفة تشمل على solvent-assisted flavor evaporation (SAFE) وتقنيات الاستخراج الدقيق للطور الصلب (HS-SPME) headspace—solid phase microextraction و GC-mass تحليل كروماتوجرافيا الغاز – قياس الطيف الكتلي (GC-mass) (gas chromatography–mass spectrometry)

(Małgorzata *et al.*, 2020)



الشكل 1-1: شكل نبات *Physalis* (Shenstone *et al.*, 2020)

2-2-1 تشخيص انواع نبات *Physalis*:

يضم نبات *Physalis*. L اكثر من 95 نوعًا متغيرًا مظهرًا وبيئيًا (POWO., 2022). يتميز الجنس *Physalis* بصفات مورفولوجية متشابهة ومتنوعة التركيب الكيميائي، ومن الصعب التمييز بين الانواع بسرعة وبدقة بناءً على الخصائص المورفولوجية فقط ولهذا ما يزال تصنيف الانواع وتطور نبات *Physalis* مثيرًا للجدل .

لذلك يعتمد على تسلسل القواعد النيتروجينية للصفة ومقارنتها مع سلاسل لقواعد نايتروجينية عالمية (Sandoval-Padilla *et al.*, 2019). تحتوي معظم انواع نبات *Physalis* على 12 كروموسومًا. تتكون عائلة

Solanaceae من خمسة أجناس (*Physalis* و *Withania* و *Przewalskia* و *Margaranthus* و *Nicandra*). يفضل التمييز بين الانواع في هذه العائلة من خلال الواسمات الجزيئية ومن اهم المناطق التي يتم استهدافها لغرض تشخيص الانواع هي مناطق متحفظة للغاية ومنها المنطقة المحافطة لجينات البلاستيده. cp DNA وان المعدل التطوري لجينوم cp DNA عادة ما يكون بطيئًا مقارنة بتسلسل الحمض النووي الرايبي (Sandoval-Padilla *et al.*, 2022).

ان التشخيص الجزيئي للحمض النووي من الأساليب التصنيفية الحاسمة للتحقق من هوية النباتات نظراً لدقتها وإمكانية تكرار نتائجها وكفاءتها وقابليتها للتنفيذ (Cahyaningsih *et al.*, 2022) يمكن أن تُعزى دقة وكفاءة الأدوات الجزيئية الى عدم تأثرها والظروف المناخية والبيئية (Zhan *et al.*, 2020).

1-2-3 الواسمات الجزيئية

تم استخدام تقنيات الواسمات الجزيئية في دراسة العلاقة الوراثية بين الانواع اعتمادا على التشابه والاختلاف بين تلك الأنواع ورسم الخرائط الوراثية والكشف عن الطفرات ولها القابلية على تتبع التغيرات الجينية من جيل الى آخر وبما انها تظهر التباين في التغيرات على مستوى الحمض النووي DNA لذا تمتاز بالثبات والاستقرارية وعدم التأثير بعوامل البيئة و بعدم تأثرها بنوع النسيج او المرحلة التطورية للنبات ولا تحتاج الى وقت محدد لاخذ العينة (Amiteye., 2021) كما ان لها القابلية على كشف التغيرات التي لا يمكن تمييزها عن طريق المؤشرات المظهرية والبروتينية . تطورت التقنيات الجزيئية بشكل سريع وقدمت مجموعة كبيرة من المؤشرات الجزيئية ومنها التضخيم العشوائي لتعدد الاشكال لسلسلة الدنا (Random Amplification of Polymorphic ,RAPD)، وتباين أطوال قطع الدنا المتضاعفة (Amplified Fragment Length ,AFLP) والتتابعات القصيرة المتكررة (SSR, Simple Sequence Repeat) وتعدد الاشكال للنيوكلويدة مفردة

(Single Nucleotide Polymorphism ,SNP) وموقع تسلسل الهدف (Sequence-tagged site ,STS) وغيرها من المؤشرات ويتم اختيار التقنية المناسبة حسب الهدف المراد تحقيقه من العمل (Amiteye., 2021). ومن اهم هذا التقنيات تقنيات DNA barcoding التي تعتمد على دراسة الاختلاف في التتابعات القصيرة والمحافظة وتمتاز بضمان مستوى عالٍ من التمييز بين الأنواع، ومن اهم المناطق المحافظة هي منطقة البلاستيدة (Chloroplast DNA ,cpDNA) والحمض النووي الريبوزومي (nuclear region, rDNA) وribosomal DNA وتعد من التقنيات المتقدمة التي ظهرت على مدى السنوات العشر الماضية اهمية كبيرة في تحديد هوية النباتات الطبية ولها اهمية في تصنيف التنوع البيولوجي (Wang *et al.*, 2022).

يعد تحديد الأنواع أساساً مهماً في التصنيف وإدارة التنوع وبيولوجيا الحفظ. اعتمدت طرائق تحديد الأنواع التقليدية بشكل أساسي على التوصيف المورفولوجي الذي يتسم عادة بكونه يستغرق وقتاً طويلاً وشاقاً وعرضة للخطأ، لذا فإن ظهور تقنية تشفير الحمض النووي الشريطي كان طفرة في تحديد الأنواع اذ يمكن استخدامها لتحديد الكائن بدقة على مستوى الأنواع (Wang *et al.*, 2022).

باستخدام جينات للحمض النووي من البلاستيدات الخضراء والجينوم النووي للنباتات في المؤتمر الدولي الثالث حول الترميز الشريطي للحمض النووي الذي عقد في المكسيك في عام 2009 ، اتفق المشاركون على أن تتابعات جينوم البلاستيدات الخضراء *rbcL* و *matK* ستكون بمثابة الرمز الشريطي الأساسي لتشفير الحمض النووي للنبات ، وتتابعات جينوم البلاستيدات الخضراء *trnH-psbA* وتتابعات الجين النووي ITS سوف يخدم كالرمز الشريطي التكميلي للحمض النووي للنبات ويمكن أن يساعد تطبيق DNA barcoding الترميز الشريطي للحمض النووي للنبات في تحديد بعض الأنواع المشفرة، وكذلك الأنواع الجديدة (Besse et al., 2021) تنوعها الجيني أخذ في التدهور تدريجياً ؛ لذلك ، فإن حماية موارد الأصول الوراثية للأعشاب أمر ضروري (Li et al., 2015).

1-2-4 المؤشرات الجزيئية المستخدمة في التوثيق الجزيئي للنبات *Physalis*

1-4-2-1 جينات البلاستيدة (Chloroplast DNA (cpDNA))

البلاستيدات الخضراء هي عضيات موجودة في الخلايا النباتية والطالب حقيقية النواة التي تجري فيها عملية التمثيل الضوئي ، فهي ليست ضرورية فقط لحياة النباتات ولكن لجميع أشكال الحياة على الأرض. ان البلاستيدة واحدة من عضيتين لهما مواد وراثية خاصة بهما في الخلايا النباتية وجينومات البلاستيدات الخضراء (cpDNA) عبارة عن DNA مزدوج الشريط يتراوح حجمه من (120-200) كيلو بايت (Jiang et al., 2017). والذي يضم ما يقرب من 130 جيناً ، تشارك في عملية التمثيل الضوئي وعمليات التمثيل الغذائي المهمة الأخرى. تُظهر جينومات البلاستيدات الخضراء تبايناً كبيراً داخل الأنواع وفيما بينها ، مما توفر معلومات مهمة لدراسة التطور والنشوء.

تؤدي البلاستيدات الخضراء أيضاً عدداً من الوظائف الأخرى فالبروتينات المشفرة بواسطة الجينات في البلاستوم تشترك بعملية التمثيل الضوئي كوظيفة رئيسية وتشارك في تخليق الأحماض الأمينية والأحماض الدهنية والهرمونات النباتية والفيتامينات وفي امتصاص الكبريت والنيتروجين. بالإضافة إلى دخولها في آليات الاستجابة للظروف البيئية غير المواتية مثل درجات الحرارة القصوى والجفاف والتركيزات العالية للضوء والملوحة (Shen et al. 2020 ؛ Xu and Wang., 2021). والاستجابة المناعية في النباتات و ان حجمها وهيكلها وتركيبها الجيني متنسق تماماً (Jiang et al., 2017) . اذ تحتوي cpDNA على معلومات وراثية غنية ، والتي يمكن على أساسها بناء قاعدة بيانات كبيرة للدراسة المقارنة، (Assaf et al., 2020).

توفر جينومات البلاستيده الخضراء لـ (cpDNAs) لمجموعات نباتية مختلفة أيضًا قدرًا كبيرًا للتحليل المقارن ويمكن أن تعكس التاريخ الوراثي للنبات خاصة ان المعدل التطوري لجينوم cpDNA عادة ما يكون بطيئًا مقارنة بتسلسل الحمض النووي النووي (Irish et al., 2020). ومن خلال التحليل الجينومي المقارن للمناطق البلاستيده المحفوظة يتم الحصول على معلومات تفيد في تصنيف الأنواع النشوء، والتطور، وراثه النسب الجغرافية، وتشخيص الأمراض، ولها دورها المهم في الكشف عن في أصل الأنواع، والتطور البيولوجي والعلاقة الجينية بين الأنواع المختلفة (Li et al., 2015).

في السنوات الحديثه، ظهرت تقارير متزايدة حول تطبيق تسلسل cpDNA في تحديد النباتات الطبية مثل *Magnolia officinalis* (Li et al., 2015)، *M. grandiflora*، *Scutellaria baicalensis* (Jiang et al., 2017)، *Fritillaria cirrhosa* (kim et al., 2019)، وفقًا للإحصاءات تتصف cpDNA لما لا يقل عن 3721 نوعًا من النباتات بدءًا من الطحالب الخضراء إلى النباتات الأرضية والمائية (Dobrogojski et al., 2018). حتى ايلول 2022 تم إصدار أكثر من 37500 تسلسل جينوم كامل اعتمادا على منطقة لـ cpDNA وتشمل هذه المنطقة المحفوظة على التتابعات (psbA – trnH، ycf، rbcL، matK، إلخ) اذ قدمت هذه التقنية تطور سريع في مجال علم الجينوم (Wang et al., 2018).

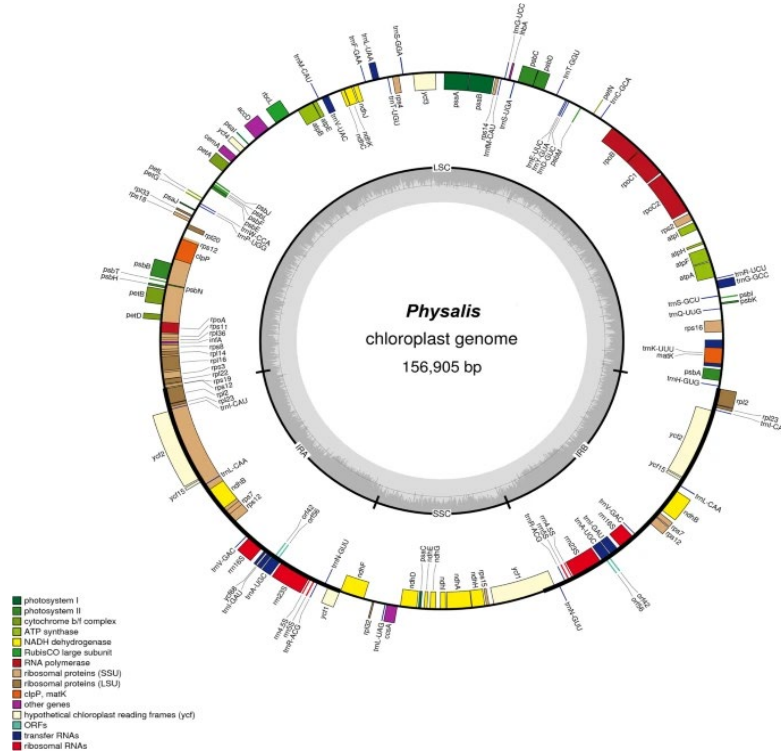
تم إجراء العديد من التحليل المقارن للبلاستوم على عائلة الباذنجان، ولكن بالنسبة *Physalis*، تم إجراء القليل من الدراسات حول جينوم البلاستيدهات الخضراء. استطاع العالم (Feng et al., 2020) بتحليل بلاستوم لخمس أصناف (*P. angulata*, *P. minima*, *P. peruviana*, *P. pubescens*, and *P. alkekengi* L) لوحظ وجود تباين في محتوى النيوكليوتيدات.

توصل (Shangguo et al., 2020) عند دراسة تسلسل جينومات البلاستيدهات الخضراء (cp) الكاملة لتشخيص أربعة أنواع من *Physalis angulata* (*Physalis*) و *Physalis alkekengi* var. *franchetii* و *P. minima* و *P. pubescens*، وتمكن من إجراء أول تحليل شامل لجينوم *Physalis*. ولوحظ ظهور اختلافات واضحة في أربعة جينومات *Physalis sp.* وضعت العلاقات التطورية بين 36 نوعًا من 11 جنسًا من العائلة الباذنجانية بناءً على جينومات cp الخاصة بهم وظهر أن نبات *Physalis* في الجزء الأوسط والجزء العلوي من شجرة النشوء والتطور

تراوح الطول الكامل لجينومات *Physalis* (cpDNA) من 156,578 زوجًا إلى 157007 قاعدة نايتروجينية اذ أظهرت جينومات *Physalis cp* أيضًا بنية رباعية نموذجية، موزعة في منطقة LSC واحدة

86,845) قاعدة نايتروجينية - 88,309 قاعدة نايتروجينية) ، ومنطقة SSC واحدة (18,363) قاعدة نايتروجينية - 18,503 قاعدة نايتروجينية) . وزوج من مناطق IR (A و B - 24953 قاعدة نايتروجينية - 25685 قاعدة نايتروجينية) (كما في الشكل (2-1) (Feng et al., 2020) (Shen et al., 2020).

كان محتوى GC الإجمالي لكل جينوم cpDNA متشابهًا ، اذ تراوح من 37.52 إلى 37.65% . بينما تم توزيع محتوى GC بشكل تفاضلي بين كل منطقة ، مما يُظهر محتوى GC أكبر في مناطق IR مقارنةً بـ LSC أو SSC ، عندما تم حساب الجينات المضاعفة في مناطق IR مرة واحدة فقط ، احتوى كل جينوم من الجينومات الأربعة الجديدة (*P. angulata* و *P. alkekengi var. franchetii* و *P. minima* و *P. pubescens*) على نفس عدد الجينات (114) جينًا موزعة على 80 بروتين- جينات مشفرة ، و 4 جينات من الرنا الريباسي 30 جينًا من الرنا الريباسي (Yang et al., 2002).



الشكل 2-1: خريطة جينية لجينوم *Physalis* في البلاستيدات الخضراء. يتم نسخ الجينات التي تظهر خارج الدائرة الخارجية في اتجاه عقارب الساعة، ويتم نسخ الجينات الموجودة بداخلها عكس اتجاه عقارب الساعة. يتم ترميز الجينات التي تنتمي إلى مجموعات وظيفية مختلفة. يشير اللون الرمادي الغامق في الدائرة الداخلية إلى محتوى GC ، ويشير اللون الرمادي الفاتح إلى محتوى AT. تشير الدائرة الداخلية أيضاً إلى أن جينوم البلاستيدات الخضراء يحتوي على نسختين من التكرار المقلوب (IRA و IRB) ومنطقة نسخة واحدة كبيرة (LSC) ومنطقة صغيرة من نسخة واحدة (SSC).

2-4-2-1. جينات الحمض النووي الريبوزومي (nrDNA) region nuclear ribosomal DNA

الحمض النووي الريبوسومي (rRNA) هو مكون بنيوي أساسي للريبوسومات، وهو موقع تخليق البروتين. تتكون الريبوسومات من وحدتين فرعيتين، كل منهما تتكون من عدة بروتينات وجزئيات الرنا الريباسي. في حقيقيات النوى، تتكون الوحدة الفرعية الكبيرة من ثلاثة جزيئات من الرنا الريبوسومي (26-25 S ، 5.8S و 5 S) ، بينما تشمل الوحدة الفرعية الصغيرة على جزء واحد فقط من الرنا الريباسي (18 S) يتم نسخ العديد من جينات الريبوسوم النووي (nrDNA). تم فصل ثلاثة من جينات الرنا الريباسي الأربعة في حقيقيات النوى ، المشفرة لـ 18 S و 5.8 S و 26 S (يشار إليها جميعاً بـ 35 S) ، عن طريق فواصل نسخ داخلية (ITS) وتشكل معاً وحدة نسخ واحدة (Potapova and Gerton., 2019) . تحتوي جينومات النبات على الآلاف من وحدات النسخ nrDNA، والتي يتم تنظيمها في مصفوفات ترادفية كبيرة تشكل ما يسمى بالمناطق المنظمة النووية (NORs) الموجودة على عدد متغير من الكروموسومات تم العثور على عدد نسخ nrDNA مرتبطة بحجم الجينوم على نطاق واسع في كل من النباتات والحيوانات (Prokopowich *et al.*, 2003). ويعد متواليات الحمض النووي الريبوزومي النووي (nrDNA) الداخلي (ITS spacer) من بين الأكثر استخداماً الأدوات الجزيئية لاستنتاج علاقات النشوء والتطور في النباتات. تمكن (Feng *et al.*, 2016) باستخدام مناطق النسخ الداخلي ITS للتمييز 45 نوع من نبات *Physalis* اذ تم تحديد الاختلاف الوراثي بين الانواع وكان معدل التميز عالي بين الانواع وتم رسم شجرة العلاقة الوراثية بين الانواع اعتماداً على تتابع ITS. وفي دراسة اخرى تمكن (Lamyaa., 2017) من استخدام ITS لتمييز الاختلاف بين سبعة انواع من نبات *Physalis* ويحدث التباين بسبب الطفرات النقطية من خلال عمليات الحذف / الإدخال (indels). واثبت ان تسلسلات ITS يمكن استخدامها على نطاق واسع في الاستدلال على فرضيات النشوء والتطور والجزيئية .

يعد ترميز الحمض النووي (DNA barcoding) حالياً أداة فعالة ومستخدمة على نطاق واسع تتيح التعرف السريع والدقيق على أنواع النباتات ركزت بعض دراسات الترميز الشريطية الحديثة تركيزاً كبيراً على استخدام تسلسلات جينوم البلاستييدة الخضراء بالكامل (Liu *et al.*, 2017).

5-2-1 التركيب الكيميائي والفعاليات الحيوية لنبات *Physalis*:

يحتوي نبات *Physalis peruviana* على المركبات المعززة للصحة مثل الفيتامينات ومنها (C ، B3 ، B6) والكاروتينات والفينولات والفلافونويدات والتانينات والقلويدات (Jakobek & Blesso., 2023). والتي تمتلك فعالية مضادة للأكسدة ومضادة للحياة المجهرية وخصوصا البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام. (et al., 2019 El-Beltagi). كما تحتوي على عناصر البوتاسيوم والمغنيسيوم والنحاس ، كما أظهرت كل من الفاكهة المزروعة والبرية فعالية مضادة للأكسدة كبيرة عبر كسح الجذور الحرة مثل (DPPH) 1-2-Diphényl- Picrylhydrazyle 2- . تعد المركبات الفينولية اهم مركب من المواد الكيميائية النباتية الموجودة في مصادر الغذاء النباتية. وتشمل هذه المركبات حمض الهيدروكسيل البنزويك ومشتقاته ، الفلافونويد ، الفلافونون ، الفلافونول ، الفلافون ، الكاتيكول ، الأنثوسيانين والأنثراكينون. تم التعرف على المكونات الكيميائية النباتية والاستخدامات الطبية لنبات *Physalis* (Jakobek & Blesso., 2023). واتضح من دراسة اخرى أن أنواع *Physalis* تحتوي على العديد من المواد الكيميائية النباتية بما في ذلك withanolides والتي لها خصائص مضادة للحياة المجهرية ومضادة للأكسدة وتستخدم في علاج الأمراض المختلفة بالقلويدات فعالة في علاج تقلصات الجهاز الهضمي والعضلات ومرض باركنسون (Shenstone et al., 2020) ولها خصائص مضادة للحياة المجهرية. اما الفلافونويدات تستخدم كمضاد للأكسدة (Demer et al., 2014) ، تحمي الخلية من التدهور والإجهاد، وتعد من عوامل إزالة السموم (Ballesteros et al., 2019).

كما تقلل من خطر الإصابة ببعض أنواع السرطان ، والقلب والأمراض التنكسية المرتبطة بالعمر (Abou Baker & Rady., 2020) بينما لوحظ أن للأحماض الفينولية خصائص مثبطة ضد السرطان والقابلية المضادة للأكسدة (Ramakrishna et al., 2022) فضلا عن كونها مضادات البكتيريا ومضادات الالتهاب ومضادات الحساسية ومضادة للكبد ومضادة للتخثر ومضاد للفيروسات ، الإجراءات المضادة للسرطان ، وتوسع الأوعية الدموية. تساهم القلويدات (Alkaloids) في نشاط الأنواع النباتية للبقاء على قيد الحياة (Kobeasy et al., 2011).

فهي تحمي النباتات من الإصابة بالحشرات عن طريق إنتاج الطعم المر الذي يصد الحشرات من التغذي على أوراق النبات، هناك دراسات تشير إلى أن تناول ثمار *P. peruviana L*. يقلل من نسبة السكر في الدم بعد 90 دقيقة بعد الأكل في عمر الشباب ، مما يؤدي إلى انخفاض نسبة السكر (hypoglycemic effect) في الدم تأثير بعد هذه الفترة (El-Beltagi et al., 2019).

بين (Mazumder et al., 2020) ان الفحص الكيميائي النباتي لنبات *Physalis angulata* احتوائه على العديد من المستقبلات الأولية والثانوية مثل الكربوهيدرات والمعادن والفيتامينات والدهون والفيتوستيرون. يحتوي النبات بأكمله على العديد من اللاكتونات الستيرويدية التي تنتمي إلى فيزالين، ويثانوليد مثل *physalis A-I* ، *physagulin A-G*, *withangulatin A*, and *withanolide T*. *Withanolides C-28* تركيب steroid مع δ -lactone group at C-22 و C-26. كما أنه يحتوي على فلافونول جليكوسيد *flavonol glycoside* المسمى *myricetin 3-O-neohesperidoside* (Mazumder et al., 2020).

1-5-2-1 مضادات الاكسدة (Antioxidant)

مضادات الاكسدة هي مواد تتمكن من كسح الجذور الحرة بصورة مباشرة أو غير مباشرة (Yilmaz., 2002) ويمكن تقسيم مضادات الاكسدة اعتمادا على طريقتها في تثبيط الاكسدة الى:

1-1-5-2-1 مضادات الاكسدة الأولية (Primary antioxidants)

وتسمى أيضاً مضادات الاكسدة كاسرة السلسلة (Chain breaking antioxidants) نظراً لكونها تتفاعل مباشرة مع الدهن وجذور البيروكسيل (Peroxyl radicals) وتحولها الى مركبات غير جذرية ثابتة (Stable non-radical compounds) وإن آلية عملها تتم من خلال وهبها للبروتونات الى جذور الدهن ، وإن المعقد المتكون بين مضاد الاكسدة والجذر الناتج من هذا التفاعل يكون أكثر ثباتاً و أقل فعالية مقارنة بجذر الدهن او البيروكسيل . و تعد مضادات الاكسدة الصناعية مثل الـ (BHT) والـ (BHA) و الـ (PG) والـ (TBHQ) ومضادات الاكسدة الطبيعية مثل التوكوفيرولات (Tocopherols) والكاروتنويدات أمثلة لمضادات الاكسدة الأولية .

أما مضادات الاكسدة الانزيمية المتمثلة بأنزيمات *glutathione* و *superoxide dismutase* و *catalase* و *peroxidase*، فتسمى بمضادات الاكسدة المانعة (preventive antioxidants) وتعد البيتا كاروتين أحد أنواع المضادات المانعة نظراً لقابليته على قنص الأوكسجين المفرد (Singlet oxygen) (Allard., 2001).

2-1-5-2-1 مضادات الاكسدة الثانوية (Secondary antioxidants):-

وهي المضادات التي تبطئ من سرعة الاكسدة لذا فهي لا تتمكن من تحويل الجذور الحرة الى انواع غير فعالة. يتميز هذا النوع من المضادات بربط المعادن (Metal chelators) وتجهيز بروتون الى مضادات الاكسدة الأولية، وكسر الهيدروبيروكسيدات الى نواتج غير جذرية (Non-radical products)، وامتصاص الضوء فوق البنفسجي (UV light) ، وتثبيط الأوكسجين المفرد (Deactivate singlet oxygen) أو كسح الاوكسجين ، ومن

الأمثلة عليها ascorbic acid و ascorbylpalmitate و erythroic acid و sulphites و lecithin و malic acid و citric acid و tartaric acid والكاروتنويدات مثل lycopene و lutein و β -carotene (Yilmaz., 2002).

3-1-5-2-1 آلية عمل مضادات الاكسدة:

تمثل مضادات الاكسدة صنفاً من المركبات ذات التراكيب الكيميائية المختلفة وآليات العمل المتنوعة، وإن اهم آلية عمل لها هي تفاعلها مع الجذور الحرة للدهون مكونة بذلك نواتج غير فعالة (Pokorny and Korezak., 2001). ويوضح الجدول (1-1) آليات عمل مضادات الأكسدة.

الجدول 1-1 : آليات عمل مضادات الاكسدة (Hall., 2001)

أمثلة	الآلية عملها	انواع مضادات الاكسدة
المركبات الفينولية	تثبيط جذور الدهون الحرة	مضادات الاكسدة الاصلية (Proper antioxidants)
المركبات الفينولية	منع تحلل بيروكسيد الهيدروجين الى الجذور الحرة	مثبتات بيروكسيد الهيدروجين (Hydroperoxide stabilizers)
حامض الاسكوربيك وحامض الستريك	تحفيز فعالية مضادات الاكسدة الاصلية	المتعاونات (Synergists)
حامض الفسفوريك ومركبات تفاعل Maillard وحامض الستريك	ربط المعادن الثقيلة بالمركبات غير الفعالة	رابطة المعادن (Metal Chelators)
الكاروتينات	تحويل الاوكسجين المفرد الى الاوكسجين الثلاثي	قائصات الاوكسجين المفرد (Singlet oxygen quenchers)
البروتينات والاحماض الامينية	اختزال بيروكسيد الهيدروجين بطريقة غير جذرية	المواد المختزلة لبيروكسيد الهيدروجين (Substances reducing hydroperoxides)

4-1-5-2-1 الفعالية المضادة للأكسدة لنبات *Physalis*:

يلعب الضرر التأكسدي في جسم الإنسان دورًا مسيبيًا مهمًا في بدء المرض وتطوره (Bazalar et al., 2019)، يتم تقليل الضرر بشكل عام عن طريق مضادات الأكسدة الذاتية، ولكن من الضروري وجود حماية إضافية للجسم، وبالتالي فإن العناصر الغذائية من الطعام ضرورية جدا في الوقاية من الأمراض، تشمل مضادات الأكسدة بالفيتامينات الموجودة في الغذاء فيتامين C (حمض الأسكوربيك)، كاروتين وبيتا توكوفيرول. فيتامين C هو أحد مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء والأكثر وفرة في الدم (Mazova et al., 2020).

يرجع النشاط المضاد للأكسدة في نبات *Physalis peruviana* إلى المستويات العالية من مادة البوليفينول ومستويات عالية من الفيتامينات A و C (Jyothibasud et al., 2015) التي لها تأثيرات وقائية ضد العديد من الأمراض مثل السرطان فالنشاط المضاد للأكسدة يعمل على تعطيل الجذور الحرة المتولدة في الأنسجة وأمراض القلب التاجية والتفاعلات الالتهابية (Eisenhauer et al., 2017).

تحتوي فاكهة نبات *Physalis* على أحماض دهنية غير مشبعة (مثل حمض اللينوليك وحمض الأوليك) والذي يلعب دور كعامل ضد الأكسدة. إذ يحتوي هذه المركبات الفعالة بيولوجيًا على قيمة غذائية وخصائص طبية يمكنها منع تلف خلايا الكبد المتسبب بفعل الأكسدة. تتميز هذه الفاكهة أيضًا باحتوائها على المنتجات والمضادة لمرض السكري ومضادة لارتفاع ضغط الدم (Pinto et al., 2009).

2-5-2-1 الفعالية المضادة للأحياء المجهرية في نبات *Physalis*:

تسبب البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية الشائعة واحدة من أكبر المشاكل الصحية العالمية في كل من البلدان المتقدمة والنامية بسبب عوامل مثل عدم كفاية الصرف الصحي وسوء النظافة (Wernli et al., 2017). والآثار الجانبية الشديدة المرتبطة بالأدوية المضادة للبكتيريا كثيرة تشمل على السمية الكلوية، والسمية الكبدية، والتشنج القصي، ونفث الدم، وعدم وضوح الرؤية، والعمى المؤقت، وحتى سرطان الجلد ومع تزايد نسب مقاومة المضادات الحيوية ووصولها لمستويات عالية، برزت حاجة ماسة للبحث عن بدائل للمضادات الحيوية تكون فعالة ورخيصة (Al-Shuneigat et al., 2020)، تعد المركبات النباتية الطبيعية أهداف دوائية جديدة لا تؤثر سلبيًا على الطبيعة الفسلجية والكيميائية للجسم الحي، إذ يعد استكشاف المركبات الفعالة بيولوجيًا كمضاد للبكتيريا نهجًا بارزًا يستخدم في تطوير الأدوية الحديثة نظرًا لسهولة توفرها وبعدها وبعدها وبعدها (Hoda et al., 2019).

تعد النباتات الطبية غنية بمجموعة متنوعة من المركبات الكيميائية فهي تحتوي على مضادات الاحياء المجهرية ، ومضادات الأكسدة ، ومضادات الإسهال ، والسرطان ، ومضادات الملاريا (Firew et al., 2020).

تعمل المكونات الفعالة الموجودة في النباتات على قتل او تثبيط الاحياء المجهرية، وخاصة سلالات البكتيريا المرضية (Vaou et al., 2021).

تم استخدام مستخلص أوراق نبات *Physalis peruviana* في علاج الاطفال المصابين في الديدان والأمعاء عند تسخين اوراقها، (Ivanova et al., 2019) كما اثبت فعالية ضد مشاكل الجلد عند الأطفال وعلاج الحمى والالتهابات البكتيرية وفي علاج الملاريا (Kasali et al., 2021)

اثبت (Valderrama et al., 2022) عبر الفحص الكيميائي النباتي الأولي للمستخلصات الإيثانولية لأوراق *P. peruviana* احتوائها على القلويات والفلافونويدات والتانينات والصابونين والفينولات وهي مواد ايض الثانوي (Secondary metabolites) تعمل كمضادات بكتيريا في الاصابات السريرية، (Jayachithra et al., 2022).

أظهرت نتائج الفعالية المضادة للبكتيريا في دراسة قام بها (Abd-ELmageed et al., 2019) المستخلصات كانت أكثر فاعلية ضد البكتيريا موجبة لصبغة كرام (*S. aureus*) مقارنة البكتيريا سالبة لهذه الصبغة (*E. coli*).

1-2-6 جنس المكورات العنقودية (Staphylococci)

هي مجموعة متباينة من البكتيريا تمثل جزءاً من الفلورا الطبيعية وتقوم بالوقت نفسه بإحداث العديد من الإصابات للإنسان بدءاً من إصابات الجلد الطفيفة وصولاً إلى الإصابات المهددة للحياة (Hirvonen and Kaukoranta., 2013).

تعد المكورات العنقودية من أكثر أنواع البكتيريا انتشاراً في الطبيعة إذ يمكن أن تتواجد على الجلد والأغشية المخاطية والقنوات التنفسية كما أنها تتواجد في المنتجات الحيوانية كالحوم والحليب والأجبان فضلاً عن تواجدها في الهواء والتربة ومياه البحار وتتصف هذه البكتيريا بمقاومتها لمختلف الظروف البيئية (Vasconcelos and Cunha., 2010).

يضم جنس المكورات العنقودية 30 نوعاً (Winn Washington., 2009).

بكتيريا *Staphylococcus* موجبة لصبغة كرام يتراوح قطرها بين (0.5-1.5) مايكرومتر وتتميز بكونها مكورات فردية يمكن أن تنقسم في أكثر من مستوى واحد لتشكل مجموعات تشبه العنب (Kloos and Bannerman., 1994) تتصف هذه البكتيريا بكونها غير متحركة و غير مكونة للسبورات و لاهوائية اختيارية

تحتاج إلى متطلبات غذائية معقدة للنمو (Plata *et al.*, 2009 ; Kloos and Schleifer., 1986; Wilkinson *et al.*, 1997) وتحتوي على نسبة منخفضة من قواعد الكوانين والسايوتوسين (G+C) في الحامض النووي DNA بحدود (30-40) % مول (Foster, 1996). ولها القابلية على تحمل تراكيز عالية من الملح ، فضلا عن كونها مقاومة للحرارة (Plata *et al.*, 2009; Kloos and Lambe 1991). يقسم جنس المكورات العنقودية تقليدياً على مجموعتين اعتماداً على قابلية هذه البكتيريا لإنتاج أنزيم التجلط (Coagulase)، وهو الانزيم الذي يسبب تخثر الدم : المكورات العنقودية الموجبة لإنزيم Coagulase والتي تتضمن أكثر الأنواع المشهورة في هذا الجنس وأهمها *S.aureus* والمكورات العنقودية السالبة للإنزيم (Coagulase Negative *Staphylococci*, CoNS) التي تستوطن الجلد بصورة طبيعية (Ray and Ryan., 2003 ; Foster., 1996).

1-6-2-1 بكتريا *Staphylococcus aureus*

تعود بكتريا *S.aureus* إلى جنس *Staphylococcus* و العائلة *Staphylococaceae*. اكتشفت لأول مرة من قبل Ogston في عام 1882 وبعد عامين تمكن Rosenbach من عزلها من مزرعة نقية وسميت *S. aureus* ، إذ أن أسم البكتريا مشتق من الكلمة اليونانية *Staphyle* وتعني “عنقود” و *Coccus* وتعني "حبة" (Baird-Parker., 1990; Parker., 2000). توصف بكتريا *S.aureus* بأنها موجبة لصبغة كرام ، لاهوائية اختيارية ، موجبة لإنزيم الكاتاليز وسالبة لأنزيم الأوكسيداز . غير متحركة وغير مكونة للспорات. تكون مستعمرات ناعمة محدبة لماعة دائرية يتراوح قطرها بين (0.5-1.5) مايكرومتر ، تنمو خلاياها بشكل تجمعات شبيهة بعنقود العنب. واعتماداً على ظروف النمو فإن لون المستعمرات يتغير من رمادي ، رمادي أبيض مشوب باصفرار إلى برتقالي كما أنها تبدي تحلاً مثالياً (typical β -hemolysis) عند نموها على وسط أكار الدم (Baird-Parker, 2000; Asperger and Zangerl, 2003; Bremer *et al.*, 2004).

تحتاج هذه البكتريا إلى بعض المتطلبات الغذائية لنموها فهي تحتاج إلى فيتامين B (الثيامين وحامض النيكوتينيك) والأملاح اللاعضوية و الأحماض الأمينية كمصدر نيتروجيني و خصوصاً الأحماض Arginine و Cysteine و Valine ، Proline ، في حين تحتاج إلى أحماض أمينية أخرى لغرض إنتاج السم الداخلي (enterotoxin) وتشتمل هذه الأحماض على Glutamic acid و Tyrosine و Leucine (Baird-Parker., 1990; Asperger and Zangerl, 2003; Jay., 2000).

تتمكن هذه البكتيريا من تخمير بعض السكريات وإنتاج الأحماض تحت الظروف الهوائية تشتمل هذه السكريات على الكلوكوز واللاكتوز والمالتوز و المانيتول ، أما تحت الظروف اللاهوائية فتتمكن من إنتاج الأحماض من سكريات أخرى فضلاً عن السكريات الكحولية (Baird-Parker., 2000; Asperger and Zangerl., 2003) تعد الدرجة الحرارية 37م هي المثلى لنمو بكتريا *S.aureus* أما الرقم الهيدروجيني الأمثل لنموها فيتراوح بين 6-7 فيما يبلغ النشاط الماني الأمثل لنموها 0.98 (Stewart.,2003 ; Montville and Mathews., 2008) توجد بكتريا *S.aureus* متعايشة (Commensal) في الجلد والغدد الجلدية و الأغشية المخاطية و خاصة أنوف الأشخاص الأصحاء كما أنها تعد النوع الأكثر إمراضية من بين انواع بكتريا *Staphylococcus* , (Crossley and Archer., 1997)

1-1-6-2-1 تصنيف بكتريا (*S. aureus*)

يمكن تصنيف المكورات العنقودية اعتمادا على تسلسل جين ribosomal RNA, ويبلغ محتوى DNA من قواعد G+C حوالي 33% وهي قريبة الصلة من اجناس *Lactobacilus* و *Streptococcus* و *Enterococcus* و *Listeria* (Afaq ., 2017) .بحسب ما هو موضح في جدول (2) الجدول 2.1: المفتاح التصنيفي جنس المكورات العنقودية (Patil., 2017)

Eubacteria, Grama Positive, Bacteria	Kingdom
Firmicutes	Phylum
Bacilli	Class
Bacillales	Order
Staphylococcaceae	Family
<i>Staphylococcus</i>	Genus
<i>Stapylococcus aureus</i>	Species

2-1-6-2-1 امراضية بكتريا (*S. aureus*)

الامراضية هي قابلية الكائنات المجهرية على احداث او بدء المرض بما يتضمن دخول الكائن المجهرى والاستعمار (Colonization)، وأخيرا النمو داخل العائل. تظهر المكورات العنقودية في كل مكان على الجلد مما يعرض العديد من المجاميع السكانية لخطر الإصابة بها، لهذا تشكل هذه البكتريا تهديدا خطيرا للصحة العامة ولاسيما عند المرضى السكري ومتعاطي المخدرات ومرضى الغسل الكلوي وعمليات القسطرة والحقن وجروح العمليات ومرضى نقص المناعة وحديثي الولادة وكبار السن (Al-Ugaili., 2013).

وبالنظر للصفة الانتهازية لهذه البكتريا فهي تسبب بإحداث امراض للحيوانات والانسان اذ تسبب في الواقع العديد من الاضطرابات منها الإصابات (infection) والخراجات في الجلد (abscesses of the skin) والتهاب الشغاف (Endocarditis) والتهابات المسالك البولية (urinary tract infection) والتهاب نقي العظم (Osteomyelitis) والتهاب السحايا (Meningitis) فضلا عن التسمم الغذائي (food poisoning) (Scudiero et al., 2020).

تتمركز أهمية الجلد في الطبقة القرنية التي تمثل الطبقة الخارجية منه وتتمحور أهميتها بالدفاع عن الجسم عبر التصدي للأحياء المجهرية بما في ذلك المكورات العنقودية الذهبية كما انها تحافظ على توازن الرقم الهيدروجيني ومحتويات الدهون والماء والبيبتيدات المضادة للبكتريا (choi et al 2014). على الرغم من ان الجلد يمثل خط الدفاع الأول ضد غزو الاحياء المجهرية بفضل تركيبه المميز بيد انه يمكن لبعض الممرضات ومنها بكتريا *S. aureus* ان تكسر هذه الدفاعات والتسبب بالعدوى (Kobayashi et al., 2015).

تضطلع بكتريا *S. aureus* في العديد من التهابات الجلد المتنوعة في المجتمع بسبب عوامل ضرواتها المختلفة ومنها البروتينات المثبتة في جدار الخلية البكتيرية والسموم اذ تؤدي الأخيرة الى حدوث مسامات في الغشاء البلازمي للخلية المضيفة وبالتالي تحلل الخلية (Hariharan., 2020).

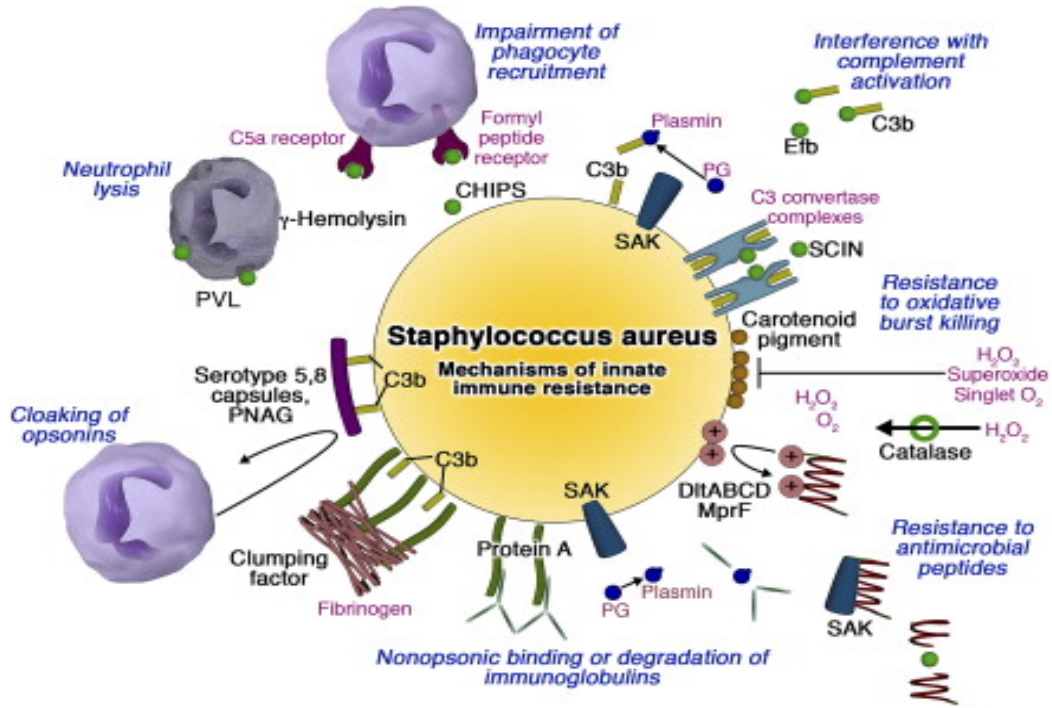
تسبب بكتريا *S. aureus* في حدوث القوباء في مرحلة الطفولة كما انها تعد السبب الرئيس في التهابات موقع الجراحة التي تشكل مشكلة سريرية كبيرة غالبا ما تنتهي بالوفاة (owens and Stoessel., 2008).

اما في ما يخص متلازمة الجلد المسموط (scalded skin syndrome) والمعروفة أيضا بمرض ريتز فتظهر بسبب السموم التي تنتجها أنواع من المكورات العنقودية وتظهر بعد 48 ساعة من الولادة وهي نادرة عند الأطفال ممن تجاوز الست سنوات من العمر ولكنها قد تظهر عند البالغين الذي يعانون من نقص المناعة او المصابين بمرض كلوي حاد (Ross et al., 2022). ومن الامراض الأخرى التي تسببها المكورات العنقودية الذهبية هو تجرثم الدم الذي يعد اكثر أنواع الالتهابات الخطيرة في العالم (Thwaites., 2010)، وبمعدل وفيات يصل الى 20%، اذ تنتشر

العدوى بالدم وتصل الى الأعضاء وتؤدي الى حدوث التهاب الشغاف والتهاب نقي العظم فضلا عن الخراجات (Buis et al., 2022).

ومن جهة أخرى تؤثر هذه البكتريا على الرئة مسببة الالتهاب الرئوي (pneumonia)، وهناك ما يقارب 70000 حالة من الالتهاب الرئوي تحدث بسبب المكورات العنقودية الذهبية في الولايات المتحدة كل عام وذلك بسبب المستضدات الفوقية التي تنتج بكميات عالية بفعل بكتريا *s.aureus* وهذه المستضدات تساهم في حصول الالتهاب الرئوي الحاد ومن هذه السموم Alpha toxin الذي يسبب احتقان رئوي كبير (Spaulding et al., 2013).

تشتمل عدوى العظم والمفاصل المتسببة بفعل بكتريا *s.aureus* على نوعين هما عدوى المفاصل الانتاني والتهاب نقي العظم، اذ تبين ان (37-67)% من التهاب المفاصل الانتاني سببه *s.aureus* (Hariharan., 2020)، وتسبب أيضا المكورات العنقودية الذهبية التهابات المسالك البولية التي تتراوح بين التهاب المثانة الى التهاب الكلية الحاد والتحصي الكلوي ويقدر حوالي (25-50)% من التهابات المسالك البولية على انها عدوى مكتسبة من المستشفى (Gajdács et al., 2019). تمتلك بكتريا المكورات العنقودية عديد من عوامل الضراوة التي يمكن توضيحها في الشكل(1-3).



الشكل 1-3: اهم عوامل الضراوة في بكتريا المكورات العنقودية

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

Materials & Methodology

2- المواد وطرائق العمل (Materials and Methods)

1-2 الأجهزة والمواد المستعملة :

1-1-2 الاجهزة المختبرية المستخدمة:

تم عرض الأجهزة والأدوات في الجدول (1-2)

الجدول 1-2 : الاجهزة المستخدمة

ت	الاجهزة	المنشا	الشركة المصنعة
1	المؤصدة (Autoclave)	Japan	Sony
2	كاميرا رقمية (Digital camera)	Japan	CYAN-Cypress
3	مجدة (Freezer)	Lebanon	Concord
4	نظام تصوير الهلام (Gel documentation system)	UK	Cleaver Scientific
5	جهاز الترحيل الكهربائي الافقي (Horizontal Gel electrophoresis)	Korea	Joagene Bioscience
6	حاوية النيتروجين السائل (Liquid Nitrogen container)	USA	Native Industrialization
7	جهاز الطرد المركزي (Microcentrifuge)	Germany	Witeg
8	جهاز Real-Time PCR	Germany	Analytik Jena
9	الماصة الدقيقة (كل الاحجام) (Micropipettes (all size))	Germany	Slamed
10	جهاز البلمرة الحراري (Thermo cycler)	UK	Native Industrialization
11	جهاز الأشعة فوق البنفسجية (UV- Transilluminator)	UK	LAB- LINE
12	محرك مغناطيسي (Vortex mixer)	USA	Tomy
13	حجرة التعقيم (Hood chamber)	Iraq	Native Industrialization
14	ميزان حساس (Sensitive balance)	Germany	Sartorius
15	ثاقب فليبي (Corkborer)	Iraq	تصنيع محلي
16	ثلاجة (Refrigerator)	Japan	Marubeni
17	جهاز النبد المركزي (Centrifuge)	England	Gallen Kamp
18	جهاز تقطير ماء (Water distillatory)	Japan	Ogawa
19	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني (pH-meter)	Denmark	Radio meter
20	حاضنة (Incubator)	England	Gallen kamp
21	حاضنة هزاة (Shaking incubator)	England	Gallen kamp
22	حمام مائي (Water bath)	Germany	Memmert
23	عروة ناقلة (Loop)	England	Shandon
24	فرن كهربائي (Electrical oven)	England	Gallen kamp

Jlassco	India	فلاسكات حجمية (Volumetric flasks)	25
Marubeni	Japan	كابينة الزرع الجرثومي (Hood)	26
Gallen kamp	England	المزج الدوار (Vortex mixer)	27
Oxford	USA	ماصات دقيقة (Micropipettes)	28
Olympus	Japan	مجهر ضوئي (Light microscope)	29
Gallen kamp	England	مسخنة حرارية (Hot plate)	30
تصنيع محلي	Iraq	مصباح بنزن	31
Millipore Corp	Japan	وحدة ترشيح (ملييور) (Millipore filter Unit)	32
Heidotoph	Germen	جهاز المبخر الدوار (Rotary evaporator)	33
Cleaver Scientific	England	جهاز قياس تركيز ونقاوة DNA (Bio Drop)	34
Biomerieux	Italy	جهاز الفايترك Compact Vitek2	35

2-1-2 المواد الكيميائية والاحيائية المستخدمة:

الجدول 2-2: المواد المستخدمة

الشركة المصنعة	المنشأ	المواد الكيميائية	ت
BHD	Canada	آكاروز (Agarose)	1
Sigma	USA	ماء مقطر منزوع الايونات (Deionized Distilled Water)	2
GCC	UK	كحول الايثانول (Ethanol)	3
Siga	USA	صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide stain)	4
محلي	العراق	النتروجين السائل (Liquid nitrogen)	5
Promega	USA	دارئ (TBE)	6
Promega	USA	دارئ (TE)	7
Sigma	UK	صبغة بروموفينول الزرقاء Bromophenol Blue (BPB)	8
Bionear	Korea	الدليل الحجمي (Molecular Weight marker)	9
BDH	England	بيروكسيد الهيدروجين H ₂ O ₂	10
BDH	England	كاشف الأوكسيدي (Oxidase reagent)	11
BDH	England	عدة صبغة كرام (Gram stain kit)	12
BDH	England	مانيتول (Mannitol)	13
BDH	England	كاشف (DNase)	14
BDH	England	كاشف (Urease)	15
Biomerieux	France	المحلول الملحي الفسلجي	16

3-1-2 الأوساط الزرعية

الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة الحالية وكما موضح في الجدول (3-2) :

الجدول 3-2 : الأوساط الزرعية المستخدمة

الشركة المصنعة	الاستعمال	أسم الوسط	ت
Himedia	لعزل المكورات العنقودية الذهبية وتشخيصها	غراء المانتول الملحي (Mannitol salt agar)	1
Himedia	وسط غذائي لإستنبات وتميز البكتريا المحلل للدم	غراء الدم الاساس (Blood agar base)	2
Himedia	لحفظ العزلات البكتيرية النقية على السطح المائل	وسط غراء المغذي المائل (Slant agar)	3
Himedia	في اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية	وسط غراء مولر هنتون (Mueller-Hinton agar)	4
Himedia	لحفظ العزلات البكتيرية النقية لمدة طويلة	وسط غراء المغذي (Brain heart broth)	5
Himedia	لحفظ العزلات البكتيرية النقية لمدة قصيرة	وسط المرق المغذي (Nutrient broth)	6

4-1-2 أقراص المضادات الحيوية (Antibiotics) :-

يوضح الجدول (4-2) استخدمت أقراص المضادات الحيوية المجهزة من شركة Bioanalyse المستعملة في الدراسة الحالية.

الجدول 4-2: المضادات الحيوية

تركيز القرص µg	المضادات الحيوية	ت
25 µg	Amoxicillin	1
30 µg	Amoxicillin C. A.	2
30µg	Cephalexin	3
5 µg	Ciprofloxacin	4
2 µg	Clindamycin	5
15 µg	Erythromycin	6
10µg	Gentamicin	7
10 µg	Pencillin G	8
5 µg	Rifampin	9
30 µg	Tetracyclin	10
30 µg	Vancomycin	11
30 µg	Cefoxitin	12

الجدول 2-5: المواد ذات الاستخدام واحد

الشركة المجهزة	اسم المادة	ت
BioBasic Inc.	انابيب ابندروف (Eppendorf tubes)	1
Afco-Dipo - Jordan	انابيب مختبرية (Test tube)	2
Afco-Dipo - Jordan	مسحات قطنية معقمة (Sterilized cotton swabs)	3
Afco-Dipo - Jordan	اطباق (Petri dish)	4
Meheco	شرائح زجاجية واغطية شرائح الزجاجية (Slides and cover slips)	5
BioBasic Inc.	ورق ترشيح (Filter paper)	6
Hettich	أطراف الماصة الدقيقة كل الاحجام Micropipette tips(all siz)	7

2-2 طرائق العمل

1-2-2 جمع العينات النباتية (Collection of plant samples)

جمعت عينات من النبات قيد الدراسة *Physalis* اذ تم الحصول على الاول من احد المشاتل التابعة للعتبة العباسية المقدسة/ محافظة كربلاء المقدسة، اما العينة الثانية فتنتشر بصورة طبيعية في بعض البساتين، جمعت بتاريخ 2022 /10/17 وتم تصنيفهما اعتمادا على الشكل المظهري فوجد انهما يعودان الى العائلة الباذنجانية *Solanaceae* ومن الجنس *Physalis* والعينتان يجري إكثارهم ذاتيا

2-2-2 التشخيص الجزيئي (Molecular Identification) للعينات النباتية

جمعت الاوراق الفنية للنوعين وتم غسلها بالماء المعقم لإزالة الاوساخ والأتربة العالقة وتم عزل الدنا من الأوراق بحسب طريقة (Saghai-Maroof *et al.*, 1984). طبقا لخطوات العزل المرفقة بعدة الاستخلاص الجاهزة Genomic DNA Mini Kit of Plant Protocol المجهزة من شركة Geneaid، للحصول على الحامض النووي DNA بشكل نقي من الأنسجة النباتية.

1-2-2-2 عزل DNA من النماذج النباتية (DNA Isolation from Plant Samples)

أجريت عملية عزل DNA بحسب الخطوات التالية:

1. وضع 25 ملغم من الأوراق النباتية الجافة في هاون خزفي وتم سحقها بالنتروجين السائل من خلال إضافته حوالي (4- 5) مرات إلى أن تصبح بشكل مسحوق ناعم (powder).
2. نقل مسحوق الأوراق إلى أنبوبة ابندروف.
3. أضيف 400 µl من دارى GP1 buffer أو دارى GPX1 buffer إلى العينة ومزج الخليط بواسطة الهزاز.
4. حضن المزيج بدرجة حرارة 60 مئوية لمدة 10 دقائق. وخلال هذه الفترة تقلب الأنبوبة كل خمس دقائق. في نفس الوقت يوضع 100 µl من دارى الشطف (Elution buffer) في أنبوبة ابندروف ووضعها في الحمام المائي لغرض استخدامها في الخطوة الأخيرة من الاستخلاص.
5. أضيف 100 µl من دارى GP2 buffer ومزج بواسطة الهزاز وحضن في الثلج لمدة 3 دقائق.
6. وضع عمود التصفية (Filter column) في 2 ml انابيب الجمع (collection tube).
7. نقل المزيج إلى انابيب عمود التصفية ونبذ لمدة دقيقة وبسرعة 1000 xg.
8. استبعد عمود التصفية ونقل العالق في انابيب الجمع إلى أنبوبة ابندروف جديدة.
9. أضيف 1.5 من حجم GP3 buffer (المحتوي على الأيزوبروبانول) للمزيج ومزج بالهزاز لمدة 5 ثواني. (مثلا 750 µl GP3 buffer إلى 500 µl من الخليط).
10. وضع عمود GD column في 2 ml انابيب الجمع collection tube.
11. نقل 700 µl من المزيج (والمحتوي على أي راسب) إلى عمود GD column.
12. نبذ بسرعة (14000 – 16000) xg ولمدة 2 دقيقة.
13. استبعد المتدفق في 2 ml انابيب الجمع collection tube وأضيف المتبقي من المزيج إلى عمود GD column و نبذ بسرعة 14000 – 16000 xg ولمدة 2 دقيقة.
14. استبعد المتدفق ووضع عمود GD column في 2 ml انابيب الجمع.
15. أضيف 400 µl من W1 buffer إلى عمود GD column ونبذ بسرعة (14000 – 16000) xg ولمدة 30 ثانية.
16. استبعد المتدفق ووضع عمود GD column مرة أخرى في 2 ml انابيب الجمع .

17. أضيف $600 \mu\text{l}$ من دارئ الغسل (Wash buffer) (المحتوي على الايثانول) إلى عمود GD column.
 18. نبذ المزيج بسرعة $(14000 - 16000) \text{ xg}$ ولمدة 30 ثانية.
 19. استبعد المتدفق ووضع عمود GD column مرة أخرى في 2 ml انابيب الجمع collection tube.
 20. نبذ المزيج مرة أخرى ولمدة 3 دقائق وبسرعة $(14000 - 16000) \text{ xg}$ لجفاف أرضية العمود.
 21. (الخطوة الاختيارية) أضيف $400 \mu\text{l}$ من الإيثانول المطلق إلى عمود GD column.
 22. نبذ المزيج بسرعة $(14000 - 16000) \text{ xg}$ ولمدة 30 ثانية.
 23. استبعد المتدفق ووضع عمود GD column مرة أخرى في 2 ml انابيب الجمع.
 24. نبذ مرة أخرى ولمدة 3 دقائق وبسرعة $(14000 - 16000) \text{ xg}$ لجفاف أرضية العمود.
 25. نقل عمود GD column الجاف إلى أنبوبة ابندروف جديدة.
 26. أضيف $100 \mu\text{l}$ من دارئ Elution buffer (الساخن) إلى مركز أرضية العمود.
 27. ترك جانبا لمدة (3 - 5) دقائق لكي يمتص دارئ Elution buffer من قبل أرضية العمود. نبذ بسرعة $(14000 - 16000) \text{ xg}$ ولمدة 30 ثانية.
- بعد الاستخلاص تم قياس تركيز والنقاوة الدنا DNA باستخدام جهاز bio drop اذ تعد خطوة مهمة جدا من ضمن خطوات استخلاص الدنا

2-2-2-2 البادئات (Primers) المستخدمة في التشخيص

جهزت البادئات (Primers) المعتمدة في هذه الدراسة من قبل شركة Bioneer كورية المنشأ بشكل مجفد (Lyophilized) (الجدول 6) ، وتم تحضير المحلول الخزين باستعمال دارئ TE للحصول على $100 \text{ بيكومول/مايكروليتر}$ وحفظه في التجميد العميق (Deep Freeze) عند درجة -20 ، ومنه تم تحضير البادئ الذي يستعمل في تجربة تفاعل البلمرة المتسلسل بتركيز $10 \text{ بيكومول/مايكروليتر}$.

الجدول 2-6: البادئات المستخدمة في الدراسة.

ت	اسم البادئ	Traita	تسلسل النيوكليوتيدات (5' → 3')	المصدر
1	psbA-trnH	chloroplast DNA (cpDNA)	<i>psbAF</i> (5 GTTATGCATGAACGTAATGCTC 3) <i>trnHR</i> (5 CGCGCATGGTGGATTCACAAATC 3)	Sang <i>et al.</i> 1997.
2	ITS	nuclear ribosomal DNA(nrDNAs)	ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ITS-5 (5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')	(Sharma <i>et al.</i> , 2002).
3	COAG	<i>coa</i> gene	COAG2: CGA GAC CAA GAT TCA ACA AG COAG3: AAA GAA AAC CAC TCA CAT CA	Himabindu <i>et al</i> , 2009

3-2-2 مكونات Master Mix

جهاز مكونات Master mix من قبل شركة Bioneer في أنابيب معقمة وتحتوي على المكونات التالية وبالتراكيز المبينة بحسب ما هو موضح في الجدول 2-7
الجدول 2-7: مكونات خليط التفاعل Master mix.

حجم التفاعل Reaction size (20µl reaction)	المكونات Component
1Unit	<i>Taq</i> DNA polymerase
250 µM	Each: dNTP (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)
10 mM	Tris-HCl (pH 9.0)
30 mM	KCl
1.5 mM	MgCl ₂
5 µM	Stabilizer and tracking dye

4-2-2 الدليل الحجمي (DNA Ladder)

جهاز الدليل الحجمي (ladder) المستعمل في هذه الدراسة من قبل شركة - Bioneer Korea بتركيز 150 ng/µl ، بمدى يتراوح مدى من (100 - 2000) زوج قاعدي، بحسب ما هو موضح في الجدول 2-8.

الجدول 8-2: وصف الدليل الحجمي للـ DNA

الوصف	
17 حزمة 900 – 800 – 700 – 600 – 500 – 400 – 300 – 200 – 100 2000 – 1600 – 1200 – 1000 – الحزم الاكثر شدة وتآلق 2000 ، 1000 ، 500 bp	الدليل الحجمي (DNA Ladder)

5-2-2 تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction

تم استخدام البادئ psbA–trnH region لمضاعفة المنطقة الموجودة على جينوم البلاستيدة chloroplast DNA (CpDNA) فيما تم استخدام البادئ ITS لمضاعفة منطقة الموجودة nuclear ribosomal DNA (nrDNA) اذ تم تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وفق الخطوات التالية:

1. أجري العمل بارتداء القفازات وفي حجرة التعقيم Hood مع حفظ المحاليل كافة على الثلج.
2. أضيفت 5 مايكرو ليتر من قالب DNA، 1 مايكرو ليتر من كل بادئ، 13 مايكرو ليتر ماء مقطر منزوع الايونات إلى أنبوبة التفاعل الرئيسي (Master Reaction) الجاهزة ليصل حجم المحلول 25 مايكرو ليتر.
3. وضع المزيج في جهاز المبلمر الحراري (Thermocycler) على برنامج خاص لهذا البادئ وكما يلي:

الخطوة	درجة الحرارة (TEMP)	الوقت (TIME)	No. عدد الدورات of cycles
Initial Denaturation	94C°	5 min	1 cycle
Denaturation	95C°	30S	35 cycles
Annealing	58C°	30S	
Extension	72C°	1 min	
Final Extension	72C°	5 min	1 cycle

6-2-2 الترحيل الكهربائي (Electrophoresis)

بعد انتهاء وقت التفاعل رفعت الأنابيب من PCR وتم ترحيلها باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز كالاتي:

1. حضر هلام الاكاروز بتركيز 2% باستخدام محلول 10x في حمام مائي لمدة 15 دقيقة بدرجة 100 ،ترك الهلام ليبرد إلى 65 مئوية ثم أضيف 2 مايكرو لىتر من صبغة بروميد الاثيديوم
2. سكب الهلام ببطء في حوض الهلام، وتجنب تكون أي فقاعات في الهلام وتركه لمدة تصل من 20 إلى 30 دقيقة. رفع المشط والشريط اللاصق بهدوء من الاكاروز المتصلب وثبتت في الحوض المستعمل للترحيل الكهربائي وملء الحوض بدارى TBE بحيث يغطي سطح الهلام.
3. تم إضافة 5 مايكرولىتر من الدليل الحجمي (DNA Ladder) في أول حفرة. واستعمل هذا لمعرفة حجم قطع DNA المفصولة. وضع 8 مايكرولىتر من عينة DNA على غطاء شمعي مطاط Parafilm، ومزج مع 2 مايكرولىتر من صبغة التحميل (بروموفينول الزرقاء) ، ومزج جيدا باستخدام ماصة دقيقة ثم وضع عينات DNA في الحفر أيضا.
4. بعد ذلك إغلاق جهاز الترحيل الكهربائي ومرر التيار الكهربائي بمقدار 70 فولت لمدة ساعة ونصف.
5. فحص الهلام باستعمال مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV transilluminator عند طول موجي (240، 366 نانوميتر)، صور بعدها الهلام باستخدام كامرة.

7-2-2 طريقة تحليل نتائج تسلسل قواعد النايتروجينية للحامض النووي

تم اجراء طريقه تسلسل الحامض النووي لتحديد الانواع بناء على المناطق الجينية المستهدفة للأنواع قيد الدراسة وتم ارسال النتائج PCR الى شركه Macrogen في كوريا لأجراء تحليل تسلسل الحامض النووي بواسطة نظام تسلسل AB DNA وتم اجراء تحليل تسلسل الحامض النووي باستخدام Basic Local Alignment Search Tool لتحديد التشابه بين نوعي النبات قيد الدراسة والانواع المسجلة عالميا في بنك الجينات في المركز الوطني للمعلومات التقانة الاحيائية National Center For Biotechnology Information وتم رسم الشجرة الوراثية للنشوء والتطور باستخدام برنامج الاصدار Mega 11.0 أعقبها تسجيل العينات التسلسل في قاعده بيانات NCBI Genbank - للحصول على رقم انضمام Genbank.

2-3 تحضير المستخلصات النباتية

تم جمع اوراق العينة الثانية لنبات *Physalis* من بعض البساتين في منطقة قضاء الهندية / كربلاء المقدسة اذ تنتشر فيها تلك العينة, ثم طحنت جيدا باستعمال الطاحنة الكهربائية انيا ومن ثم حفظت في عبوات معقمة ذات سدادة محكمة , في ظروف خالية من الرطوبة لحين بدء عمل المستخلصات النباتية منها . تم استخدام نوعين من المذيبات في تحضير المستخلصات من النباتات (مائي وكحولي). اذا تم تحضير مستخلص مائي باستخدام الماء المقطر والكحولي باستخدام الايثانول المطلق اعتمادا على طريقة (تركي واخرون 2019) بأخذ 40 غم من مسحوق نبات الجاف ووضعه في thimble ثم اضيف 400 مل من الماء والكحول كلا على انفراد ولمدة (16 - 20) ساعة وبدرجة حرارة (40 - 45)م° الى ان اصبحت العينة عديمة اللون بعدها رشح المستخلص بمرشح غشائي وجفف باستخدام الفرن وحفظ بالثلاجة بدرجة 4م° لحين الاستخدام .

2-3-1 الكشف عن المركبات الكيميائية الفعالة في اوراق نبات *Physalis*

2-3-1-1 الكشف النوعي والكمي عن المركبات الفعالة

1- تقدير القلويدات الكلية (Determination of total alkaloids):

تم وزن 5 غم من العينة في دورق سعة 250 مل وتمت إضافة 200 مل من حامض الخليك بنسبة 10% في الإيثانول وتغطيته وتركه لمدة 4 ساعات. تمت تصفيته وتركيز المستخلص في حمام مائي إلى ربع الحجم الأصلي. تم إضافة هيدروكسيد الأمونيوم المركز بالتقطير إلى المستخلص حتى اكتمال الترسيب. تم السماح للمحلول بأكمله بالترسيب وتم تجميع المادة المترسبة وغسلها باستخدام هيدروكسيد الأمونيوم المخفف ثم ترشيحها. اذ أن المتبقي هو القلويد، الذي تم تجفيفه ووزنه. (Harborne, 1973)

2- تحديد محتوى التانينات الكلية (TTC) (Determination of total tannin content):

تم تقدير محتوى التانينات الكلي باستخدام الطريقة المعدلة (Butler, 1977) اذ تم خلط 500 مايكرو لتر من المستخلص مع (8 مل) الماء المقطر، و 0.5 مل من 0.1 مولار $FeCl_3$ و 0.5 مل من 8 ملي مولار من سيانيد البوتاسيوم الحديديكي على التوالي وحضنت في درجة حرارة الغرفة (27) \pm 2 درجة مئوية) لمدة 10 دقائق. تم قياس الامتصاص عند طول موجي 720 نانومتر باستخدام المطياف الضوئي بتصفير الجهاز باستخدام عينة ضابطة.

3- تحديد محتوى الفلافونويدات الكلي (TFC)

تم قياس الفلافونويدات الكلي وفقاً لطريقة (Chang *et al.*, 2008) مع بعض التحوير. اذ تم خلط 0.5 مل من المستخلص مع 1.5 مل ماء مقطر و 0.2 مل 5% نترات الصوديوم NaNO₂ وترك المحلول الناتج لمدة دقيقتين عند درجة حرارة الغرفة (27 ± 2 درجة مئوية). بعد ذلك ، تمت إضافة 0.2 مل من 10% (AlCl₃) كلوريد الالمنيوم في الإيثانول و 0.6 مل 1 N هيدروكسيد الصوديوم على التوالي مع تحريكه في كل خطوة. تم تحضير العينات في الظلام عند درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق وتم قياس الامتصاص عند طول موجي 510 نانومتر باستخدام المطياف الضوئي.

4- تقدير المحتوى الفينولي الكلي (Determination of total Phenolic contents):

تم نقل 1 مل من المستخلص النباتي إلى أنبوب اختبار ، ثم تمت إضافة 0.5 مل 2 N كاشف Folin-Ciocalteu و 1.5 مل 20% من محلول كربونات الصوديوم Na₂CO₃ وتم اكمال الحجم الى 8 مل باستخدام الماء المقطر متبوعاً برج قوي وترك لمدة ساعتين وبعد ذلك تم قراءة الامتصاص عند طول موجي 765 نانومتر. تم استخدام هذه البيانات لتقدير المحتوى الفينولي الكلي باستخدام منحنى المعايرة القياسي الذي تم الحصول عليه من التركيزات المخففة المختلفة لحمض الكاليك (Gallic acid). (Tassone, *et al.*, 2000).

5- تقدير الصابونين الكلي (Determination of total saponins):

تم تقدير محتوى الصابونين الكلي بالطريقة الموصوفة بواسطة (Deepinder, *et al.*, 2007) بناءً على تفاعل الفانيلين - حمض الكبريتيك اللوني مع بعض التحوير. تمت إضافة حوالي 50 ميكرو لتر من المستخلص مع 250 ميكرو لتر من كاشف الفانيلين (800 ملغم من الفانيلين في 10 مل من الإيثانول بنسبة 99.5%). أعقبه إضافة 2.5 مل من حمض الكبريتيك 72% و خلط جيداً. تم حفظ هذا المحلول في حمام مائي عند 60 درجة مئوية لمدة 10 دقائق. بعد 10 دقائق ، تم تبريده في ماء بارد مثلج وتمت قراءة الامتصاص عند طول الموجي 544 نانومتر. تم التعبير عن القيم كمكافئات ديوسجينين (mg DE / g extract) اعتماداً على منحنى قياسي.

6- الكشف عن الكلايكوسيدات (Glycosides):

تم الكشف عن الكلايكوسيدات بمزج 1 مليلتر من المستخلص المائي الاوراق النبات مع 2 مليلتر من كاشف بندكت ووضع المزيج في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق ثم ترك المحلول ليبرد فتكون

راسب احمر يدل على وجود الكلايكوسيدات . اما استخلاص الكلايكوسيدات فتتم بإضافة 100 ملليتر من الايثانول (80%) إلى 10 غم من مسحوق النبات وترك المحلول لمدة 24 ساعة ثم رشح للحصول على المستخلص الايثانولي بعدها ركز المحلول بواسطة المبخر الدوار وبدرجة 50 م° للمستخلص المركز ثم اضيف له 50 ملليتر من الايثر و 5 ملليتر من محلول خلات الرصاص حيث طبقة الايثر الطبقة العليا وجفف بدرجة حرارة 30 م° للحصول على الكلايكوسيدات

2-1-3-2 تحليل GC-mass (مطيافية كروماتوغرافيا الغاز)

تم إجراء تحليل GC-mass في هيئة البحث والتطوير الصناعي مركز بحوث ابن البيطار . للفحص الكيميائي النباتي لمستخلص الأوراق ، تم إخضاع مستخلص الأوراق الخام الميثانولي الطازج لتحليل GC-MASS لتحديد المكونات الكيميائية النباتية المختلفة الموجودة في المستخلصات النباتية. المحضر بإذابة 70 مل من الميثانول المطلق مع 30 ملغم من مسحوق الأوراق المجففة، بعدها تم حقن 5 مل من الخليط في موقع الحقن بجهاز GC-mass، كانت الظروف الرئيسية على النحو التالي: كان الغاز الحامل عبارة عن الهيليوم، وعمود هلام السيليكا بطول 30 متر وكان قطره 250 مايكرومتر، ومدة الحقن 18.5 دقيقة، ودرجة الحرارة الأولية 50 درجة مئوية، ودرجة الحرارة النهائية 250 درجة مئوية، والضغط الأولي 8.5، الضغط النهائي 19.5، تغير درجة الحرارة كان 12.12 / دقيقة.

2-3-2. تحديد المكون الكيميائي

تم إجراء تفسير GC-mass باستخدام قاعدة بيانات معيار المعهد الوطني والتكنولوجيا (NIST) الذي يحتوي على أكثر من 6200 نمط. تمت مقارنة طيف المكون غير المعروف بطيف المكون المعروف في مستودع NIST. تم تسجيل زمن الاحتجاز والوزن الجزيئي والصيغة الجزيئية والنسبة المئوية لتكوين مادة العينة.

4-2 إختبار الفعالية المضادة لأكسدة المستخلصات النباتية

تعتمد الطريقة على قياس فعالية المستخلص الكحولية النبات *Physalis* في قابليته على كسح الجذور الحرة مثل (DPPH) 2-Diphényl-1- Picrylhydrazyle (DPPH) وتحويله إلى H⁻

1-1 Diphényl-2 – Picrylhydrazyle DPPH

DPPH+RH ----- DPPH-H+R

اصفر اللون ----- بنفسجي اللون

يتم تحضير المحلول الاصيلي من الجذر الحر بإذابة 2 ملغم من مادة 2-Diphényl-1- Picrylhydrazyle) DPPH في 100مل من الميثانول ثم مزج 5 ملغم من المستخلص الكحولي مع 1مل من الماء والايثانول كان تركيز المحلول الاصيلي 5000 جزء في المليون وباستعمال قانون التخفيف تم تحضير التراكيز (20، 40، 60، 80 ، 100 ، 120 ، 140) (warrier,b1993) بعدها رج المزيج بقوة وترك عند درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة ثم سجل الامتصاص عند طول موجي 517 نانو متر باستعمال المطياف الضوئي (Shah et al .,2013) كان المركب القياسي المستعمل هو حامض الاسكوربيك وتم اجراء التجربة في ثلاث مكررات (Patel et al .,2011)

تم حساب نسبه التثبيط المئوية لجذر DPPH من المعادلة التالية

$$DPPH \% = \{(A0-AS)/A0\} * 100$$

حيث AS هي امتصاص العينة

اما A0 امتصاص الكونترول

5-2 عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية

1-5-2 التعقيم (Sterilization)

- 1- تم تعقيم جميع الأوساط الزرعية باستخدام جهاز المؤسدة عند درجة حرارة 121 م وضغط 15 باوند / إنج² ولمدة 15 دقيقة . في حين عقت المواد التي تتلف بالحرارة باستخدام الترشيح
- 2- عقت جميع الأدوات الزجاجية والمعدنية في الفرن الحراري الجاف ولمدة ساعتين وتحت درجة الحرارة 180 م .

2-5-2 الأوساط الزرععية:

حضرت جميع الأوساط الزرععية بحسب تعليمات الشركات المصنعة ثم عقت بالمؤصدة , وصبت في أطباق معقمة وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة في الحاضنة للتأكد من عدم تلوثها قبل ان تحفظ بالتلاجة بدرجة 4 م° لحين الاستعمال .

1. وسط نقيع القلب الدماغ (Brian Heart infusion broth) :

حضر بإذابة 24 غم من الوسط في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم 1000 مليلتر وعدل الأس الهيدروجيني عند 7.3 وعقم بالمؤصدة .

2. وسط غراء الدم (Blood Agar Medium) :

حضر هذا الوسط وفق تعليمات الشركة المصنعة ثم عقم بالمؤصدة وبرد الى درجة حرارة 45°م عندها تم إضافة الدم الانسان بنسبة 3-5% ومزج جيداً وصب في اطباق معقمة وحفظ في التلاجة لحين الاستعمال (Chesbrough,2006) استعمل هذا الوسط في تنمية البكتيريا وعزلها ومعرفة قابليتها على تحليل الدم ونوع التحليل.

3. وسط المرق المغذي (Nutrient Broth Medium) :

حضر بإذابة 12 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر وعدل الأس الهيدروجيني عند 7.3 وعقم الوسط بالمؤصدة , استعمل لتنمية وتنشيط البكتيريا ولحفظ العينات لفترة طويلة بعد أن يتم إضافة كمية من الكليسرول وبنسبة 10% .

4. وسط الغراء المغذي (Nutrient Agar Medium):

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة بإذابة 28 غم من الأكار المغذي في لتر من الماء المقطر وعقم الوسط بالمؤصدة . وقد استعمل لحفظ العزلات البكتيرية وإدامتها لفترة قصيرة 2-3 أسابيع .

5. وسط المانيتول الملحي (Mannitol Salt Agar Medium):

حضر هذا الوسط وفق تعليمات الشركة المصنعة و عقم بالمؤصدة بعد ذلك ترك ليبرد ومن ثم صب في أطباق معقمة , يستعمل هذا الوسط لعزل وتشخيص المكورات العنقودية الذهبية . *Staph aureus* المخمرة لسكر المانيتول عن المكورات العنقودية البشروية غير المخمرة لهذا السكر.

6. وسط الجيلاتين (gelatin Medium):

حضر بإذابة 128 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر و عدل الرقم الهيدروجيني (pH) عند 7 بعد ذلك تم صبه في أنابيب رفيعة و عقم بالمؤصدة . أستعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية الأنواع البكتيرية على تحليل الجيلاتين (Chakraborty,2011).

7. وسط اكار المولر هنتون (Mueller Hinton Agar Medium):

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة و عقم بالمؤصدة وبرد الوسط إلى درجة 45 م° وتم صبه في أطباق بتري المعقمة وترك ليبرد وحفظ في درجة 4 م° لحين الاستعمال , استعمل هذا الوسط لإجراء اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية والفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية.

8. وسط غراء اليوريا (Urea Agar):

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة , وتم تعقيمه بالمؤصدة وترك ليبرد ثم أضيف له 5 مل من محلول اليوريا بتركيز 40% المعقم بالترشيح بواسطة مرشحات دقيقة بقطر 0.45 مايكرومتر ومزج وتم صبه بطريقة مائلة في انابيب معقمة ومحكمة الغطاء (Atlas,2006) . وقد استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم اليوريز (Urease) .

3-5-2 الكواشف والمحاليل (Reagents and Solutions):

تم تحضير عدد من الكواشف والمحاليل والصبغات المستعملة في الدراسة الحالية على وفق ما ورد في أنظمة التشخيص المعتمدة (Collee et al., 1996) .

1. محاليل صبغة كرام (Gram Stain):

تم الحصول عليها بشكل جاهز , وتتكون من صبغة البلورات البنفسجية , ومحلول اليود, والكحول الايثيلي, وصبغة السفرانين واستخدمت للتفريق بين البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام.

2. محلول الملح الفسيولوجي (Normal Saline Solution) :

تم استعمال المحلول الملحي المجهز من قبل الشركة المصنعة لاستعماله في اجراء التخافيف المطلوبة .

3. محلول بيروكسيد الهيدروجين (Hydrogen peroxide Solution) :

حضر المحلول بتركيز (3%) للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على انتاج أنزيم الكاتاليز (Catalase) والذي يعمل على تحليل مركب بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) الى ماء واوكسجين O_2

4. كاشف الاوكسيديز (Oxidase Reagent) :

حضر بإذابة 1 غم من مادة P – aminodimethylaniline oxidase في 100 مل من الماء المقطر ووضع في قنينة معقمة وحفظ في الثلاجة , استعمل هذا الكاشف للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على انتاج انزيم الأوكسيديز.

5. محلول اليوريا (Urea Solution):

حضر بإذابة 20 غم من مسحوق اليوريا في 50 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 40% وعقم المحلول بالترشيح باستعمال مرشحات Millipore Filters واستعمل هذا المحلول في وسط اليوريا للكشف عن انزيم اليوريز (Forbes *et al.*,2007) .

6. محلول ماكفرلاند القياسي (Mcfarland standard solution):

حُضِر هذا المحلول بحسب الطريقة الموصوفة من قبل (Tille, 2014) اذ يتكون من محلولين:
A- محلول كلوريد الباريوم (1.175%): اذيب 1.175 غم من كلوريد الباريوم في كمية من الماء المقطر وبعد إتمام الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر.

B- محلول حامض الكبريتيك (1%) : اضيف 1 مل من حامض الكبريتيك المركز الى 99 مل من الماء المقطر.

حضر محلول مكفر لاند (انبوبة رقم 0.5) وذلك بإضافة 0.5 مل من محلول A الى 99.5 مل من محلول B ومزجه المحلول جيدا.

2-4-5 عزل البكتريا

جمعت 120 عينة سريرية مختلفة من المرضى المراجعين من مدينة الامام الحسين الطبية ومستشفى الامام الحسن المجتبي العلمي في محافظة كربلاء ومن كلا الجنسين وضمن الفئة العمرية (16 – 45) سنة , وللمدة من 2023/1/5 الى غاية 2023/3/29 . وتضمنت الدراسة جمع عدة مسحات لكل مراجع للفحص المختبري أخذت من الجروح والادرار والحروق إذ استعملت القطيولات القطنية المعقمة (Steril cotton swabs) في أخذ المسحات من الجروح وعلى عمق (0.25) سم وتدويرها عدة مرات في منطقتي الجرح , وكذلك تم استعمال القطيولات في أخذ المسحات من الحروق للمراجعين و 1 مل من الادرار (midstream urine) للمرضى الذين يعانون من التهاب المسالك البولية . وخلال ساعتين نقلت هذه العينات إلى المختبر لغرض الزرع البكتيري.

زرعت تلك العينات على وسط غراء الدم ووسط ماكونكي وحضنت في درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة لكي يتم التعرف على النمو البكتيري ونوع التحلل الدموي الذي تحدثه البكتريا المزروعة. أجري التشخيص الأولي للبكتريا المعزولة اعتماداً على حجم وشكل المستعمرة ولونها. تم حفظ العزلات النقية على وسط غراء المائل بدرجة 4 م° لحين اتمام باقي الاختبارات المظهرية والكيموحيوية لها.

2-4-5-1 تشخيص البكتريا المعزولة:

تم تشخيص البكتريا المعزولة بالاعتماد على الخواص المجهرية والمزرعية والكيموحيوية وبحسب ما مذكور ادناه .

2-4-5-1-1 الصفات المجهرية:

صبغة كرام : نقلت جزء من النمو البكتيري بواسطة العروة الناقلة (Loop) إلى الشريحة الزجاجية النظيفة وبعد تثبيتها وتصبيغها بصبغة كرام تم فحصها باستخدام المجهر الضوئي لملاحظة حجم الخلايا واشكالها وطريقة تجمعها وتفاعلها مع صبغة كرام .

2-1-4-5-2 الصفات الزرعية:

تم تمييز المستعمرات النامية على الأوساط الزرعية العامة والانتقائية من خلال الحجم والشكل واللون، وتحلل الدم بأنواعه المختلفة (ألفا- بيتا - كاما) (Collee *et al.*,1996).

3-1-4-5-2 الفحوصات الكيموحيوية

1. اختبار الأوكسيديز (Oxidase test):

تم الاختبار باستعمال ورقة الترشيح الرطبة إذ أضيفت قطرات من المحلول P – amino dimethylaniline بتركيز 1% إلى ورقة الترشيح لدرجة التشبع ثم أضيف جزء من المستعمرة البكتيرية بواسطة العود الخشبي المعقم إلى ورقة الترشيح. ان ظهور اللون الأزرق خلال ثلاثين ثانية دليل على ايجابية الفحص (Tarrand & Gröschel, 1982).

2. اختبار الكاتاليز (Catalase test):

تم إجراء فحص الكاتاليز السريع باستخدام محلول بيروكسيد الهيدروجين بنسبة 3% إذ أضيفت قطرة من هذه المحلول الى المستعمرة البكتيرية، ان ظهور فقاعات دليل على انتاج الكاتاليز.

3. اختبار التجلط (Coagulase test):

وضع 10.5 مل من بلازما دم الانسان في الأنابيب معقمة ثم نقلت مستعمرة بكتيرية بعمر (24-18) ساعة بواسطة عود خشبي معقم إلى الأنابيب الحاوية على البلازما وبعد مزجها جيدا حصنت بدرجة حرارة (35-37) م لمدة أربع ساعات أن تجلط البلازما دليل على ايجابية الفحص (Katz, 2010)

4. اختبار تخمر المانيتول Mannitol Fermentation test :

زرعت المستعمرات النامية على وسط المانيتول الملحي وتم تحضين الأطباق بدرجة حرارة 37 م ولمدة 24 ساعة عند تحول لون الوسط من الوردي الى الأصفر دليل على أن النتيجة ايجابية لتخمير المانيتول (Macfaddin, 2000).

5. اختبار إنتاج أنزيم اليوريز (Urease test):

اجري هذا الاختبار بالتلقيح مائل وسط أكار اليوريا بمستعمرات نقية عمرها 24 ساعة بطريقة الطعن والتخطيط وبدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة . وقد استدل على النتيجة الموجبة بتغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي وهو ناتج عن قابلية البكتريا على إنتاج أنزيم اليوريز الذي يحلل اليوريا إلى أمونيا مؤديا الى رفع قيمة الأس الهيدروجيني للوسط ومن ثم تغير لون الكاشف (Forbes *et al.*, 2007).

2-4-5-2 تشخيص البكتريا المعزولة باستعمال جهاز الفايترك-Vitek-2 Compact System:

تمت جميع خطوات العمل وفقا لتعليمات الشركة المجهزة Biomerieux وكما يلي :

- 1- يوضع 3 مل من المحلول الملحي (normal saline) في انابيب بلاستيكية معقمة.
- 2- يتم نقل عدد من المستعمرات النقية من البكتريا المراد تشخيصها (والتي يتم تنشيطها على وسط مناسب لمدة (18-24) ساعة وذلك باستخدام عروة نقل معقمة (loop) وتمزج جيدا حتى يصبح المحلول عكرا.
- 3- تتم قياس عكورة المعلق باستخدام جهاز Denis Chek والتي يجب ان تكون مطابقة لعكورة محلول ماكفرلانند ($10^8 \times 1.5$ خلية/مل).
- 4- يتم نقل العالق الى حامل الجهاز وتوضع البطاقة الخاصة في الحامل يعقبها ربط البطاقة والعالق بوساطة قناة توصيل رفيعة جدا ثم يدخل رمز البطاقة بوساطة ماسح ضوئي.
- 5- يوضح الحامل في حجرة خاصة مفرغة من الهواء (Vacuum chamber) اذ يتم نقل البكتريا الى البطاقة وتوزيعها في الحفر الموجودة فيها.
- 6- يتم قطع قناة الوصل أليا ويتم غلق البطاقة جيدا لمنع أي تسرب وتنقل الى الحاضنة وتحضن بدرجة حرارة (35-37)م.
- 7- تتم قراءة نتائج التشخيص من خلال جهاز الحاسوب الذي يحتوي على برنامج خاص يقوم من خلاله قراءة الاطوال الموجية للتفاعلات وترجمتها من خلال التغيرات اللونية والعكورة، فضلا عن النواتج الايضية.

2-4-3 اختبار الحساسية للمضادات الحيوية (Antibiotics Sensitivity test):

استخدمت طريقة انتشار الأقراص (Disk diffusion test) لتحديد حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية على وفق ما جاء في (Morello et al.,2006) بحسب الخطوات الآتية:

1. نشطت عزلات بكتريا *S.aureus* على وسط Blood agar وحضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة.
2. تم نقل كمية قليلة من مستعمرات البكتريا النامية بواسطة العروة (Loop) الى انابيب تحوي المحلول الملحي الفسلجي ومزجت جيدا، وقورنت عكورة النمو مع عكوره محلول ثابت العكورة القياسية (McFarland standatd 0.5) والذي يعطي عددا تقريبا لخلايا $10^8 \times 1.5$ وحدة تكوين مستعمرة / مليلتر.
3. نقل 100 مايكرو لتر من العالق البكتيري بواسطة الماصة الدقيقة (Micropipette)، ثم نشر بواسطة الناشر الزجاجي على سطح وسط اكار مولر – هنتون بصورة متجانسة، بعدها تركت الاطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة (10-15) دقيقة.
4. نقلت أقراص المضادات الحيوية بواسطة ملقط معقم الى الاطباق، ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة.
5. تم قراءة النتائج بقياس اقطار مناطق التثبيط بالملم حول أقراص المضادات الحيوية.

2-6 حفظ العزلات البكتيرية

1. الحفظ لفترة قصيرة :

حفظت العزلات البكتيرية النامية لمدة 24 ساعة على أوساط زرعية مائلة من الأكار المغذي (Nutrient agar) في درجة حرارة 4م° وبدرجة حرارة 37م° اذ انها حفظت للاستخدام اليومي لمدة تتراوح من (1-3) اسابيع مع مراعاة ادامة العزلات دوريا كل اسبوعين واعادة زراعتها لتنشيطها طيلة مدة الدراسة .

2. الحفظ لمدة طويلة :

لحفظ العزلات البكتيرية لمدة طويلة استعمل وسط Brain – Heart infusion broth المضاف إليه كليسرول بنسبة 15% والمحضر بواقع 5 مل لكل انبوب ثم حفظت الانابيب الزجاجية في درجة حرارة -20م° على ان يتجدد كل ثلاثة اشهر (Atlas, 2010).

7-2 اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية ضد البكتريا

تم استعمال طريقة الانتشار في الأكار (Agar diffusion method) بواسطة الحفر (Wells) لاختبار حساسية البكتريا للمستخلصات النباتية عند التراكيز القياسية (5, 10, 15, 20, 25) ملغم/مل في الحفرة من الوسط الغذائي , وكما في (Fritz , 1985) وتضمنت الطريقة عمل ثلاث حفر بأبعاد متساوية في وسط مولر هنتون الصلب وبقطر 6 ملم بواسطة الثاقب الفليني (Cork borer) بعد نشر (0.1) مل من العالق البكتيري على الوسط ومن ثم تركت الاطباق في الثلاجة لمدة ساعة واحدة لانتشار محاليل النبات ومن ثم حضنت الاطباق بدرجة 37 م° ولمدة 24 ساعة وسجلت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط (Inhibition zone) (Zaidan et al., 2005) .

8-2 التحري عن جين Coagulase في بكتريا المكورات العنقودية

1-8-2 طريقة عزل الحامض النووي RNA

تم استخلاص الحمض النووي الريبي من العزلات البكتيرية *S.aureus* باستخدام Total RNA Extraction KitTM (easy-BLUE) وفق لتعليمات الشركة المصنعة على النحو التالي:

1. تم تلقيح عزلات بكتيريا على وسط المحضر وحضنت عند 37 درجة مئوية ، تم حصاد الخلايا البكتيرية ثم استخدام جهاز طرد مركزي بسرعة 13000 دورة / دقيقة، لمدة دقيقة واحدة لترسيب البكتريا و إزالة المادة الطافية.
2. تم تعليق الخلايا البكتيرية عن طريق إضافة كاشف Trizol 1 مل من في درجة حرارة الغرفة لمدة عشر ثوان.
3. تم اضافة 200 مايكرو لتر من الكلوروفورم إلى كل أنبوب ورجها بقوة لمدة دقيقة.
4. تم تحضين الخليط مع الثلج لمدة 5 دقائق. ثم استخدم جهاز طرد عند 13000 دورة / دقيقة، لمدة 15 دقيقة تحت ظروف مبردة.
5. نقلت المادة الطافية إلى أنبوب نظيفة بسعة 1.5 مل، وأضيف 500 مايكرو لتر من مادة الأيزوبروبانول. ثم يخلط المزيج عن طريق قلب الأنبوب (4-5) مرات ويحضن بدرجة 4 م° لمدة 10 دقائق. ثم يرسب الناتج، بالطرد المركزي عند 13000 دورة / دقيقة، 4م درجات مئوية لمدة 10 دقائق.

6. تم التخلص من المادة الطافية، و اضيف 1 مل من إيثانول بتركيز % 80 ثم مزجت جيدا بواسطة الفورتكس بعدها رسب بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة / دقيقة، ولمدة 5 دقائق بدرجة 4 مئوية .

7. تركت جزيئات الحمض النووي الريبي للهواء حتى تجف بعد التخلص من المادة الطافية. تم إضافة (8 – 100) مايكرو لتر من الماء الخالي من النيوكليز إلى كل العينات لغرض إذابة حبيبات الحمض النووي الريبي بعدها تم الاحتفاظ بعينة الحمض النووي الريبي المستخرجة عند -80 م. تم تقدير تركيز ونقاوة الحامض النووي RNA الكلي باستخدام Bio Drop عند الامتصاص (280/260) نانومتر ثم تم معالجة الناتج الاستخلاص باستخدام إنزيم DNase I لإزالة الكميات النزرة من الحمض النووي DNA من الحمض النووي الريبي الكلي وفقا لطريقة المتبعة من شركة Promega.

2-8-2 تصنيع cDNA

تم استخدام عينات الحمض النووي الريبي المستخرجة و المعالجة بـ DNase في خطوة تخليق (كدنا) من قالب الرنا الرسول باستخدام (AccuPower® RocketScript™ RT PreMix) وتم عمل هذه المجموعة وفقاً لتعليمات الشركة على النحو التالي

RT mix	Volume
Total RNA 100µg	10µL
Random Hexamer primer (50pmol)	1µL
DEPC water	9µL
Total	10ul

بعد ذلك، تم وضع مكونات مزيج RT المذكورة في الجدول أعلاه في الأنابيب التي تحتوي على جميع المكونات الأخرى اللازمة لتوليف cDNA مثل (Reverse Transcriptase و 5 x Reaction Buffer و DTT و dNTP و RNase Inhibitor). بعد ذلك ، يتم نقل جميع الأنابيب إلى أجهزة الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة ولمدة 3 دقائق ، ثم تحضينها في جهاز التدوير الحراري على النحو التالي:

Step	Temperature	Time
cDNA synthesis (RT step)	42 °C	1 hour
Heat inactivation	95 °C	5 minutes

3-8-2 إعداد المزيج الرئيسي الكمي في الوقت الحقيقي qPCR.

تم تحضير مزيج qPCR الرئيس باستخدام (RealMODTM Green SF 2X qPCR mix Kit) بناءً على تضخيم الصبغة الخضراء SYBER في نظام PCR في الوقت الحقيقي وتم تحضير مزيج qPCR الرئيس على النحو التالي: مزيج qPCR الرئيسي للجين المستهدفة وجين 16srRNA على النحو التالي :

الجدول 2-9: بروتوكول المزيج الكمي الرئيسي القياسي qPCR

qPCR master mix	Volume
cDNA template (10ng)	5µL
Forward primer(10pmol)	1 µL
Reverse primer (10pmol)	1 µL
qPCR Master Mix	10 µL
Nuclease free water	3 µL
Total	20 µL

بعد ذلك ، تم وضع مكون المزيج الرئيس qPCR المذكور أعلاه في أنابيب وخلطها بواسطة Exispin vortex والطررد المركزي لمدة 5 دقائق ، ثم وضع في نظام MiniOpticon Real-Time PCR ، وفقا للبرنامج المستخدم في تضخيم البادئ .

الجدول 2-10: برنامج التضخيم qPCR

qPCR step	Temperature	Time	Repeat cycle
Initial Denaturation	95 °C	10min	1
Denaturation	95 °C	20 sec	40
Annealing\Extension	58 °C	30 sec	
Detection(scan)			
Melting	65-95°C		1

9-2 التحليل الإحصائي

تم إجراء التحليل الإحصائي باستعمال الحزمة الإحصائية البرمجية للعلوم الاجتماعية (SPSS)، الإصدار 22). تم عرض النتائج بشكل (المعدل ± خطأ معياري) (Mean ± S.E). تم إجراء التحليل الإحصائي لمعرفة الفروقات التي تصل الى المستوى المعنوي باستعمال اختبار T للعينة المستقلة. تمت الإشارة

10-2 تحليل بيانات qPCR Data analysis of

تم جمع نتائج بيانات qPCR للجين الهدف وتحليل التعبير باستخدام (طريقة Livak) الموصوفة بواسطة (Zhou et al 2022)

$$\text{Folding} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\Delta CT = CT_{\text{gene}} - CT_{\text{House Keeping gene}}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Treated}} - \Delta CT_{\text{Control}}$$

CT gene = قيمة حد العتبة للجين المدروس

CT House Keeping gene = قيمة حد العتبة للجين المرجعي الذي تم اختياره

ΔCT = ناتج طرح حد العتبة للجين المرجعي من العتبة للجين المدروس

$\Delta CT_{\text{Treated}}$ = للجين المدروس في جميع العينات

$\Delta CT_{\text{Control}}$ = للجين المدروس في العينة التي تم اختيارها كعينة سيطرة

$\Delta\Delta CT$ = ناتج طرح ΔCT لعينة السيطرة من ΔCT للعينة المدروسة

Folding = هي قيمة عكسية لل CT تمثل العدد 2 مرفوعة للقيمة السالبة

الفصل الثالث

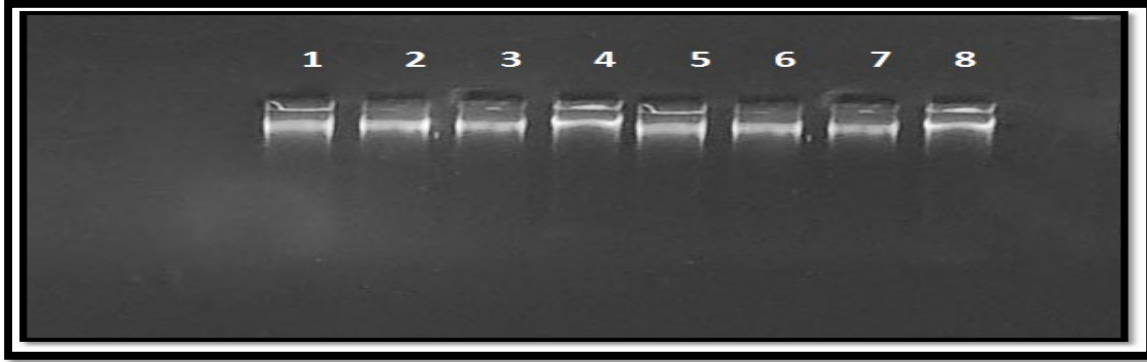
النتائج والمناقشة

Results & Discussion

3- النتائج والمناقشة (Results and Discussion)

1-3 التشخيص الجزيئي لنبات *Physalis*:

أوضحت نتائج الاستخلاص للحامض النووي للعينتين قيد الدراسة ان تركيز الحامض النووي المعزول بلغ 78.7 مايكروغرام /مل وبنقاوة قدرها (~1.97) بعد تحديدها بجهاز biodrop تم بعد ذلك اجراء ترحيل الكهربائي باستخدام الاكاروز نسبة 0.9% لتقييم كفاءة استخلاص الحامض النووي المعزول. بينت نتائج الترحيل الكهربائي ان موقع الحزم بالقرب من أعلى الهلام وشدها يدل على الجودة العالية لان الطريقة المتبعة في الاستخلاص هي الطريقة الملائمة والكفؤة تنتج حزم واضحة كما تمتاز بالسرعة والبساطة (الشكل 1).

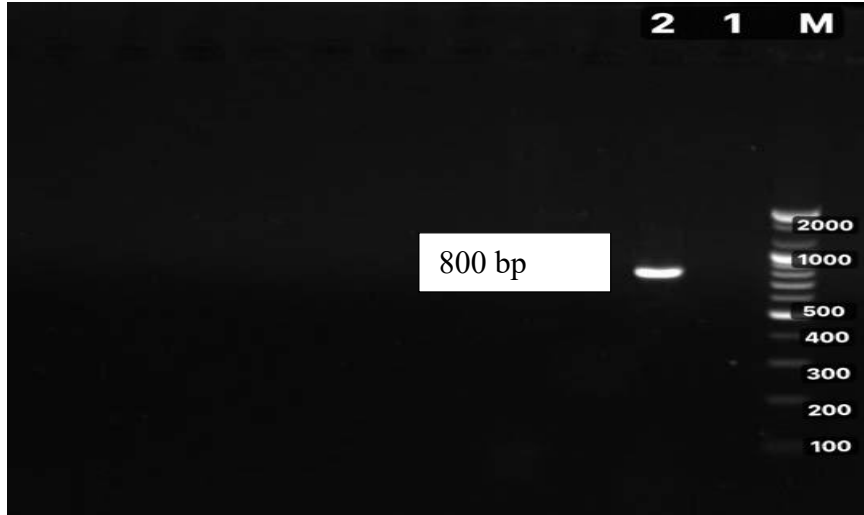


الشكل 1-3: عينات DNA المعزولة من نبات *Physalis* والمرحلة على هلام الاكاروز (0.9%) لمدة ساعة (1-4 عينات النوع الاول، 5-8 عينات النوع الثاني)

1-1-3 تحليل النشوء والتطور لنوعين من جنس نبات *Physalis* بناءً على التغيرات في منطقة

البلاستيدة Region chloroplast DNA (cpDNA)

أوضحت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ان البادئ psbA-trnH الخاص في تشفير chloroplast DNA (cpDNA) تمكن من التعرف على التتابعات المكتملة له في DNA العينة الاولى اذ بلغ الحجم الجزيئي لحزم 800 bp وهذه النتيجة تتفق مع ما وجدته (Lumariz et al., 2019) في حين لم تظهر أي نتيجة في العينة الثانية على الرغم من تكرارها أكثر من مرة والذي يمكن ان يعزى الى غياب الموقع المكتملة لتسلسلات البادئ، ولغرض تسجيل البيانات وتحليلها تم ترحيلها على هلام الاكاروز بعد إكمال برامج PCR وتم تسجيل الملاحظات اعتمادا على حجم و موقع الحزمة (الشكل 2-3).



الشكل 2-3: نتائج تفاعل PCR لجين psbA-trnH (ظهور حزمة بحجم 800 bp في العينة الاولى فقط من نبات *Physalis*)

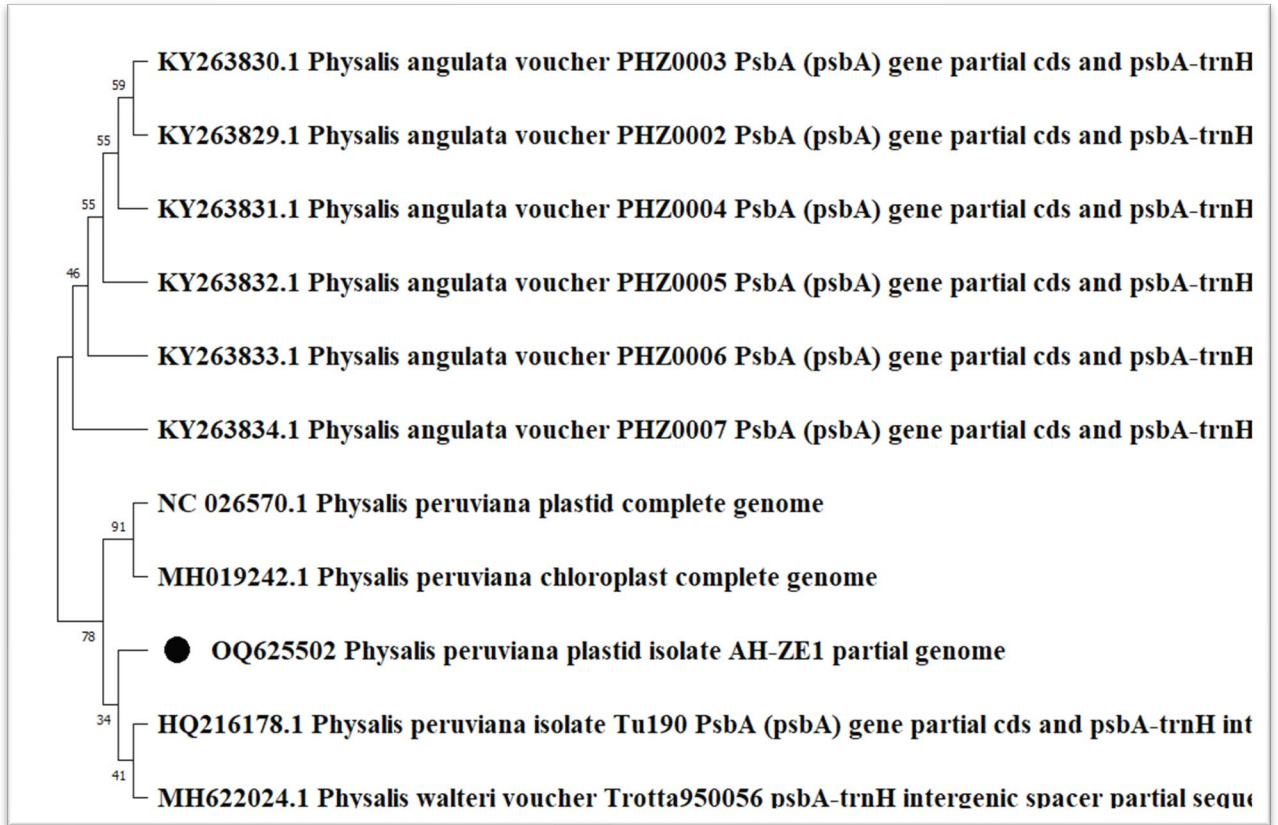
اشارت التسلسلات النيوكليوتيدية الى الهوية الموكدة للمجاميع المتضخمة عن طريق تحليل blast في موقع بنك الجينات NCBI blast بانها تعود الى جنس *Physalis* من خلال وجود تشابه بنسب مختلفة للعينة الاولى مع تسلسل الوراثي للأنواع العالمية المودع في بنك الجينات وتمت المقارنة بينهما واكد ذلك نتائج تحليل النشوء والتطور الوراثي من خلال رسم الشجرة الوراثية باعتماد على تسلسلات القواعد النايتروجينية وحساب المسافة الوراثية بطريقة neighbor-joining واستعمال البرنامج التحليل الوراثي MEGA V.11 (www.megasoftware.net; accessed on 20 August 2022) وهو البرنامج المختص بتحليل ومقارنة التسلسلات الجينية المتماثلة والعلاقات التطورية ونمط التطور سواء للبروتين او الحامض النووي وتم عرض التحليل على شكل شجرة تطورية (Kato et al., 2010).

احتوت الشجرة على ثلاثة انواع مختلفة تنتمي الى جنس *Physalis* و هي *Physalis peruviana* و *physalis angulata* و *Physalis walteri* (الشكل 3-3) ، اذا ارتبط النوع قيد الدراسة بالنوع *Physalis peruviana isolate Tu190* المودع تحت الرقم التسلسلي HQ216178.1 بنسبة 98.59% والذي ينتمي الى سلالة صينية لنفس الجنس ، كما تشابه مع النوع *Physalis peruviana* المودع تحت الرقم التسلسلي NC026570 بنسبة 98.49% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية ، وتشابه مع النوع الاخر *Physalis peruviana* المودع تحت الرقم التسلسلي MH0192421 بنسبة 98.11% والتي تنتمي الى سلالة تم عزلها في الهند ، كما تشابه مع النوع الثاني هو *Physalis walteri* المودع تحت الرقم التسلسلي MH6220224.1 بنسبة 95.01% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية ، كما بينت الشجرة الوراثية بوجود تشابه مع النوع الثالث هو *Physalis angulata* الحاوي على 6 سلالات

هي *Physalis angulata* voucher PHZ0007 PsbA KY263834.1 المودع تحت الرقم التسلسلي ،
 KY263833.1 المودع تحت الرقم التسلسلي *Physalis angulata* voucher PHZ0006 PsbA ،
 KY263832.1 المودع تحت الرقم التسلسلي *Physalis angulata* voucher PHZ0007 PsbA ،
 KY263831.1 المودع تحت الرقم التسلسلي *Physalis angulata* voucher PHZ0007 PsbA ،
 KY263829.1 المودع تحت الرقم التسلسلي *Physalis angulata* voucher PHZ0007 PsbA ،
 KY263830.1 المودع تحت الرقم التسلسلي *Physalis angulata* voucher PHZ0007 PsbA بنسبة
 تشابه تبلغ 93.45% وجميعها ينتمي الى سلالات توجد في الصين. وهذا يتفق مع ما حصل عليه

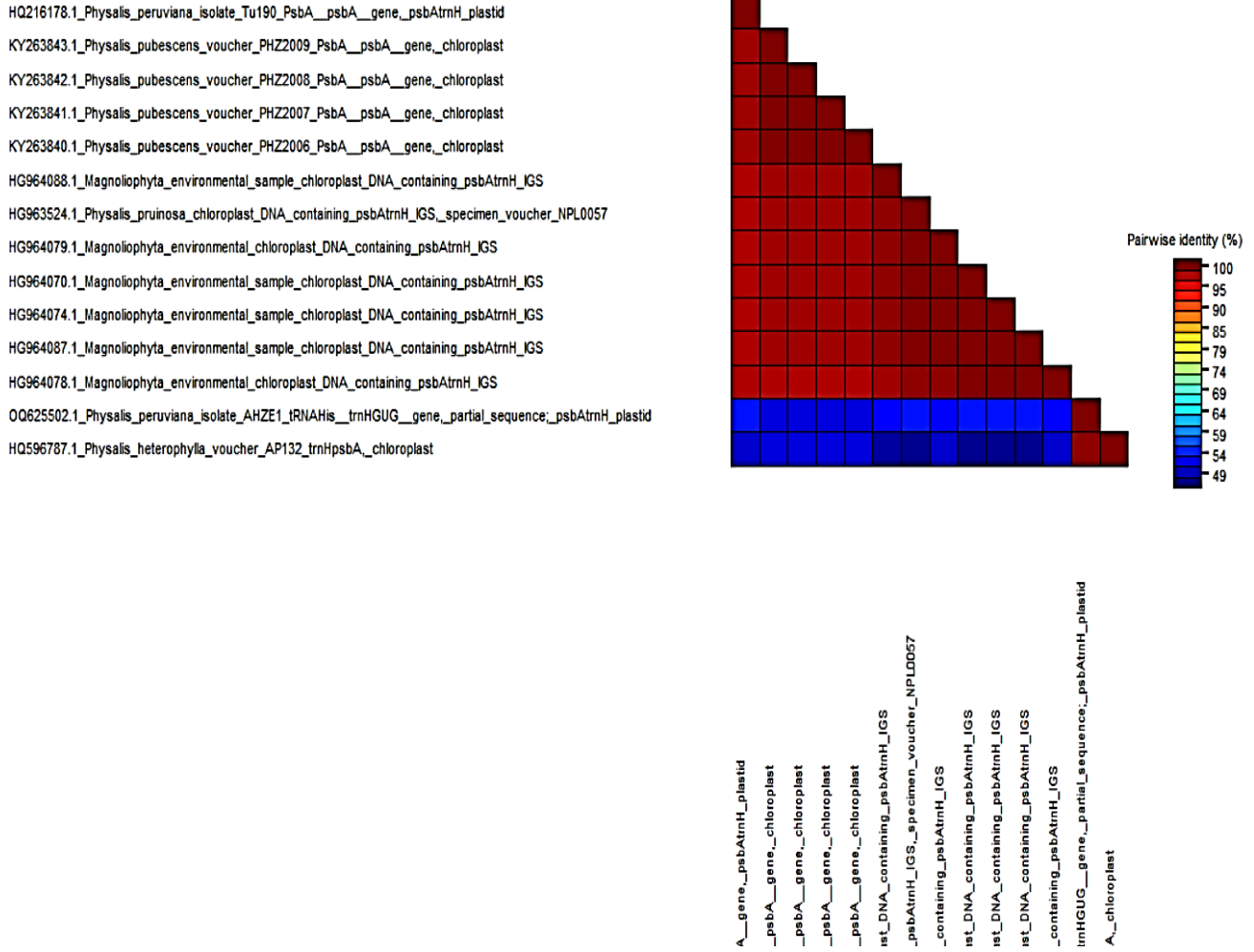
(Sandoval-Padilla et al., 2019). كما تم تسجيل النوع قيد الدراسة من قبل الباحث بإسم *Physalis*

peruviana isolate AH-ZE1 تحت الرقم التسلسلي OQ625502.1



الشكل 3-3: الشجرة الوراثية تبين العلاقة بين *Physalis peruviana* isolate AH-ZE1 (محددة بنقطة ذو لون اسود) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لعضية البلاستيدة ومقارنتها مع تتابعات سلالات عالمية لبلاستيدات انواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank. ان المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining

وباستعمال برنامج Sequence Demarcation Tool تم حساب النسبة المئوية للتشابه بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة البلاستيدة (cpDNA) chloroplast DNA بين العزلة قيد الدراسة *Physalis peruviana* isolate AH-ZE1 (محددة بمستطيل ذو حواف حمراء) وعزلات وسلالات عالمية لأنواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank تراوحت النسبة المئوية للتشابه بين 100% إلى 49% التي تكون اقل نسبة تشابه مع النوع قيد الدراسة بحسب ما هو موضح بالشكل (3-4)



الشكل 3-4: النسبة المئوية للتشابه بين عزلة *Physalis peruviana* isolate AH-ZE1 (محددة بمستطيل ذو حواف حمراء) وعزلات وسلالات عالمية لأنواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank علما ان هذه النسبة قد تم احتسابها بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة البلاستيدة (cpDNA) chloroplast DNA باستعمال برنامج Sequence Demarcation Tool

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
874 bits(473)	0.0	489/496(99%)	4/496(0%)	Plus/Plus
Query 13		TAGCTGCTATCGA-GCTCCATCTAC-AATGGATAAGATCCC		70
Sbjct 1		TAGCTGCTATCGAAGCTCCATCTACAAATGGATAAGATCCC		58
Query 71		GTTTTGAAAAGAAAGGAGCAATAATCATTCTTGT		130
Sbjct 59		GTTTTGAAAAGAAAGGAGCAATAATCATTCTTGT		118
Query 131		CTTTCtttttttctttttatttattgatttacttagtatttt		190
Sbjct 119		CTTTCtttttttctttttatttattgatttacttagtatttt		178
Query 191		tttacattacCATACCATTaaaaaaagtatatcaaacgaagga		250
Sbjct 179		TTTACATTACCATACCATTAAAAAAAGTATATCAAACGAAG		238
Query 251		agaaggagagactatataatataatataaAAGAGAGAAGT		310
Sbjct 239		AGAAGGAGAGACTATATATATATATAAAAGAGAGAAGT		298
Query 311		GTTGTTTTCTTCTTTCATTTAGTAAAGATTGAGCATTGTT		370
Sbjct 299		GTTGTTTTCTTCTTTCATTTAGTAAAGATTGAGCATTGTT		358
Query 371		gaaataataatataaattgataataaattgaattgaaataaga		430
Sbjct 359		GAAATAATAATAAATTGATAATAAATTGAATTGAAATAAGA		418
Query 431		aacttgaatCTTTTGTTTTCTAATTTAAATAATGTAAAAA		490
Sbjct 419		AACTTGAATCTTTTGTTTTCTAATTTAAATAATGTAAAAA		478
Query 491		GGGCGGATGTAGCCAA 506		
Sbjct 479		GGGCGGATGTAGCCAA 494		

الشكل 3-5: التطابق بين العينة الأولى التي تم تسجيلها *Physalis peruviana* isolate AH-ZE1 مع العينة المسجلة تحت الرقم التسلسلي HQ216178.1 بنسبة 98.59% والذي ينتمي الى سلالة صينية

كما بينت النتائج وجود ثلاث طفرات في القواعد النايتروجينية في العينات التي تم فحصها ومقارنتها مع النوع *Physalis peruviana* المودع في بنك الجينات تحت الرقم التسلسلي HQ216178.1 اذا تم استبدال قاعدة السايروسين في الموقع 172 bp بالقاعدة الثايمين واستبدال القاعدة الكوانين بقاعدة الادينين في الموقع 293 bp للعينة المودعة في بنك الجيني كما استبدلت القاعدة الثايمين بقاعدة الكوانين في الموقع 347 bp.

ان الطفرة تولد الاختلاف الجيني الذي تعتمد عليه العملية التطورية يمكن تتبع هذه الطفرات خلال العملية التطورية واستخدامها كدليل على الأصل المشترك (Stettler et al. 2021). وتم عرضها وتوثيقها وفقاً لموقعها في GenBank (الجدول 1-3)

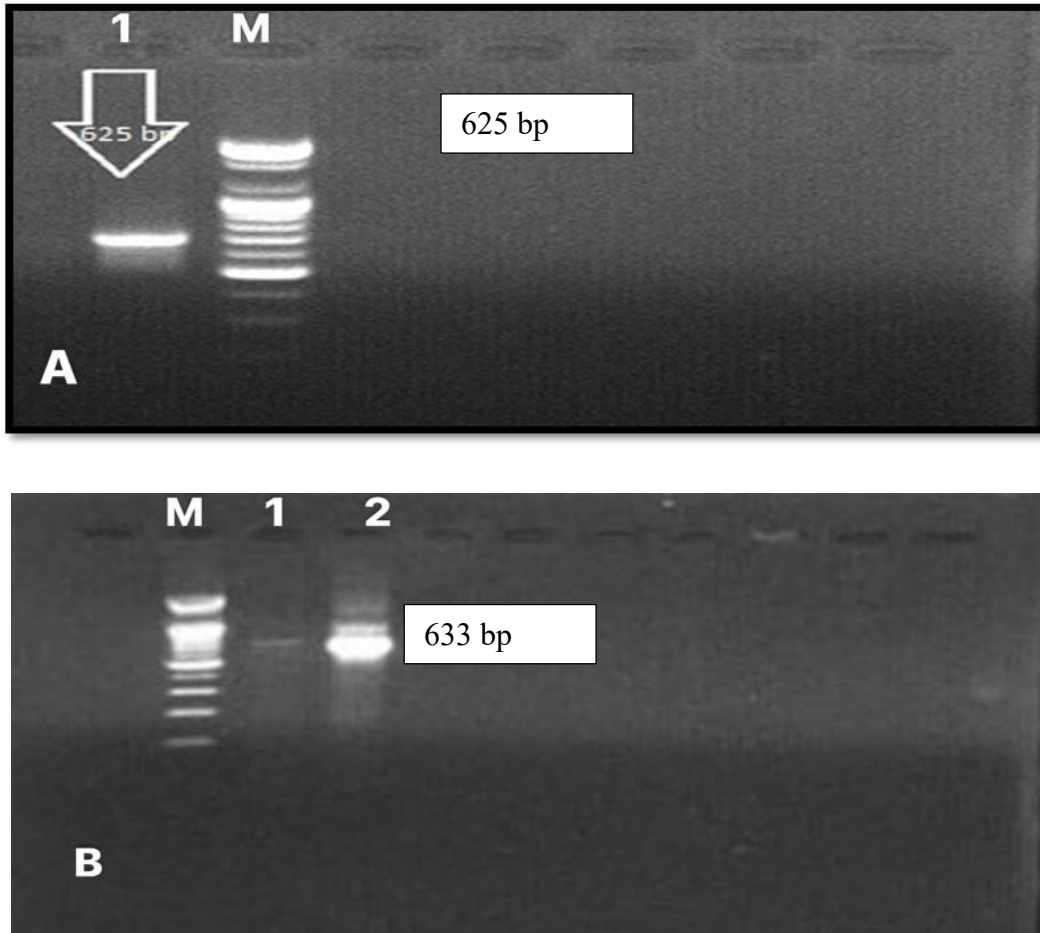
الجدول 1-3: الطفرات بين تسلسل العينة قيد الدراسة مع العينات المسجلة في البنك الجينات NCBI-BLAST

الاسم العلمي	GenBank Accession number	NCBI-BLAST Homology sequence identity(%)			
		Number mutation	Type Of Mutation	Polymorphism Percent(%)	Identity
<i>Physalis peruviana</i>	OQ625502.1	3	T/C G/A T/G	1.41	98.59%

2-1-3 تحليل النشوء والتطور لنوعين من الجنس *Physalis* بناءً على التغيرات في منطقة

Region Ribosomal DNA ITS

اوضحت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ان البادئ ITS تمكن من التعرف على التتابعات المكتملة له في الحامض النووي DNA لعينتي نبات *Physalis* اذ بلغ الحجم الجزيئي للحزم في العينة الاولى 625 bp اما الحجم الجزيئي للعينة الثانية فقد بلغ 633 bp وهذه النتيجة تتفق مع (Lumariz *et al* 2019)، ولغرض تسجيل البيانات وتحليلها تم ترحيلها على هلام الاكاروزبتريكيز 2% بعد اكمال برامج PCR تم تسجيل الملاحظات اعتمادا على حجم و موقع الحزمة كما في الشكل 3-6.



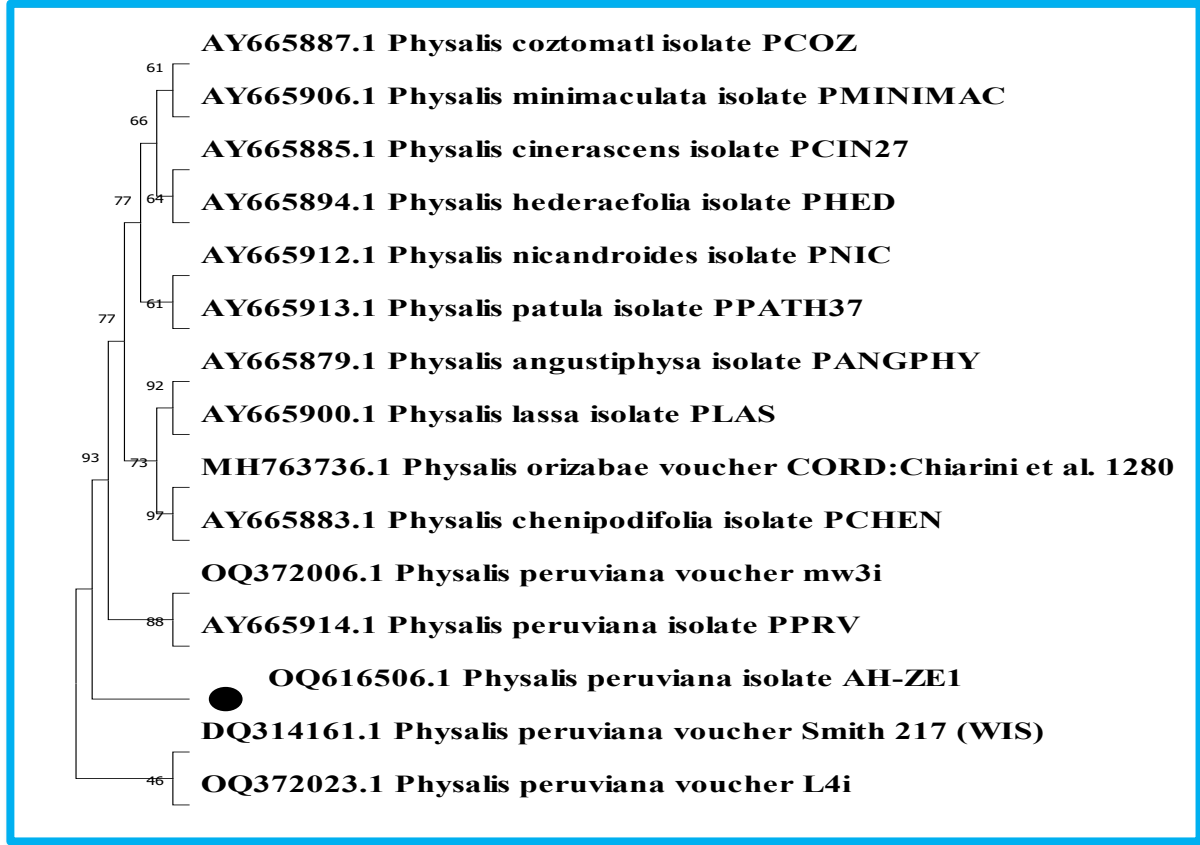
الشكل 3-6: نتائج تفاعل سلسلة البوليمريز (PCR) لجين ITS في نبات *Physalis* (A) للعينة الأولى، B) للعينة الأولى والثانية (

اشارت التسلسلات النيوكليوتيدية الى الهوية الموكدة للمجاميع المتضخمة عن طريق تحليل NCBI blast في موقع بنك الجينات genebank بانها تعود الى جنس *Physalis* من خلال وجود تشابه بنسب مختلفة للعينة الاولى مع تسلسل الوراثي لأنواع العالمية المودعة في بنك الجينات وتمت المقارنة بينهما واكد ذلك نتائج تحليل النشوء والتطور الوراثي من خلال رسم الشجرة الوراثية بالاعتماد على تسلسلات القواعد النايتروجينية وحساب المسافة الوراثية بطريقة neighbor-joining واستعمال البرنامج التحليل الوراثي MEGA V.11 (www.megasoftware.net; accessed on 20 August 2022) وهو البرنامج مختص بتحليل ومقارنة التسلسلات الجينية المتماثلة والعلاقات التطورية ونمط التطور سواء للبروتين او الحامض النووي وتم عرض التحليل على شكل شجرة تطورية (Kato et al 2010).

احتوت الشجرة على احد عشر نوعا مختلفا تنتمي الى الجنس *Physalis* ارتبط النوع قيد الدراسة بالنوع (WIS) *Physalis peruviana voucher Smith 217* في البنك الجيني بالرقم التسلسلي DQ314161.1 بنسبة 96.91% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية. *Physalis* كما تشابه مع النوع *peruviana voucher mw3i* المودع تحت الرقم التسلسلي OQ372006.1 بنسبة 94.90% الذي ينتمي الى سلالة توجد في كينيا ، كما تشابه مع النوع *Physalis peruviana* المودع تحت الرقم التسلسلي AY665914.1 بنسبة 94.64% والذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية ، كما تشابه مع النوع الثاني هو *Physalis angustiphysa* المودع تحت الرقم التسلسلي AY665879.1 بنسبة تشابه 93.84% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية ، كما بينت الشجرة الوراثية وجود تشابه مع النوع الثالث هو *Physalis lassa* المودع تحت الرقم التسلسلي AY665900.1 بنسبة تشابه تبلغ 93.69% والذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية، وتشابه مع النوع *Physalis chenipodifolia* المودع تحت الرقم التسلسلي AY665883.1 بنسبة تشابه 93.52% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية، وتشابه مع النوع اخر هو *Physalis orizabae* المودع تحت الرقم التسلسلي MH763736.1 بنسبة تشابه 93.06% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الارجننتين ، كما تشابه مع النوع *Physalis nicandroides* المودع تحت الرقم التسلسلي AY665912.1 بنسبة تشابه 92.89% ، كما تشابه مع النوع *Physalis coztomatl* المودع تحت الرقم التسلسلي AY665887.1 بنسبة تشابه 92.58% ، كما تشابه مع النوع *Physalis minimaculata* المودع تحت الرقم التسلسلي AY665905.1 بنسبة تشابه 92.38% ، كما تشابه مع النوع *Physalis patula* المودع تحت الرقم التسلسلي AY665913.1 بنسبة تشابه 92.26% ، كما تشابه مع النوع *Physalis Cinerascens* المودع تحت الرقم التسلسلي AY665885.1 بنسبة تشابه 91.94% ، كما تشابه مع النوع *Physalis Hederaefolia* المودع تحت الرقم التسلسلي AY665894.1 بنسبة تشابه 91.79% اذ توجد الانواع الستة الأخيرة في الولايات

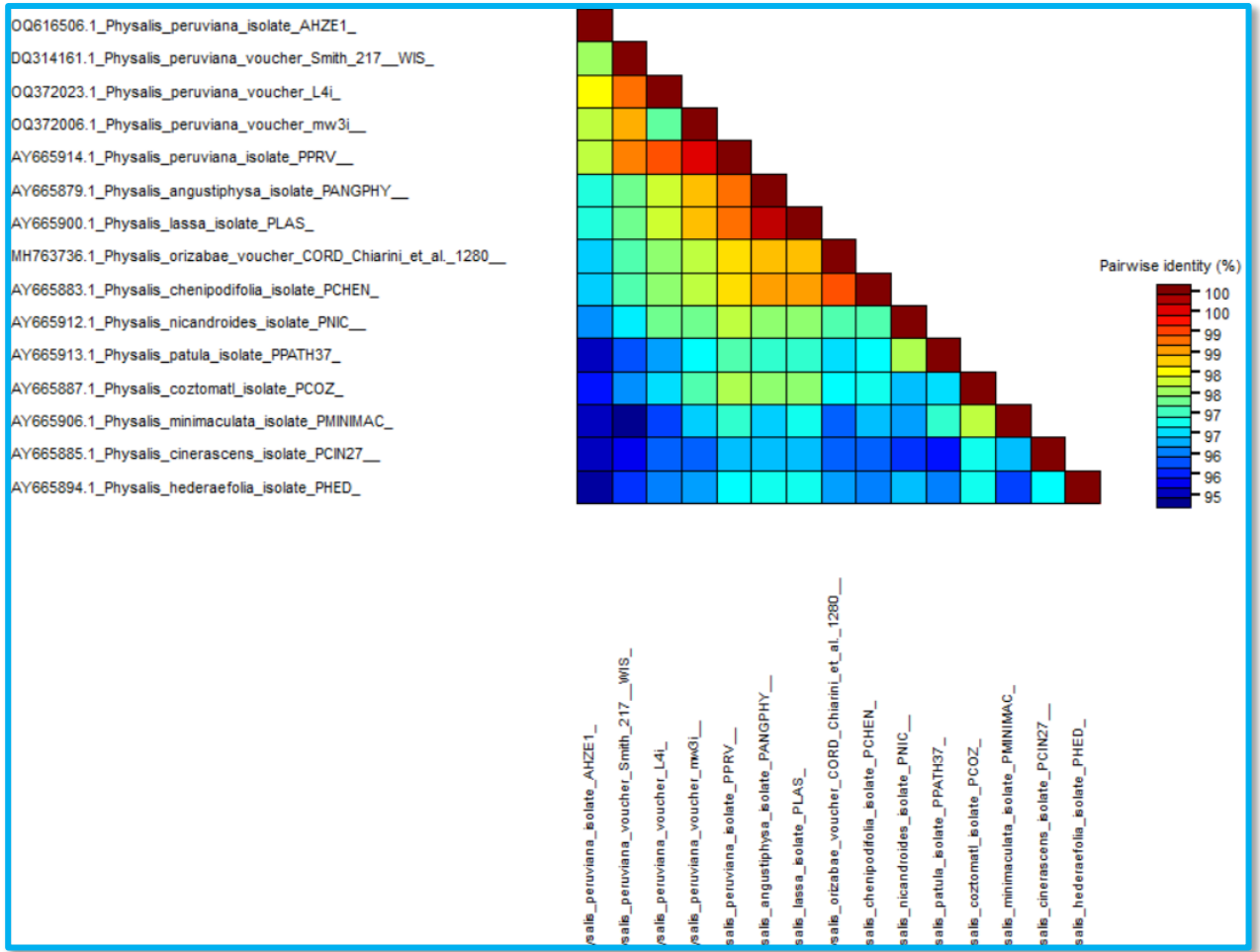
المتحدة الأمريكية، اعتماداً على التسلسلات الريبوزومية التي تم تحليلها وتتفق هذه النتائج مع ما وجدته (Lumarize et al., 2019)

تم تسجيل النوع من قبل الباحث باسم *Physalis peruviana* isolate AH-ZE1 تحت الرقم التسلسلي OQ616506.1



الشكل 3-7: الشجرة الوراثية للعلاقة بين النوع قيد الدراسة *Physalis peruviana* isolate AH-ZE1 (محددة بنقطة) ذي لون اسود) والتتابعات سلالات عالمية لأنواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining .

وباستعمال برنامج Sequence Demarcation Tool تم حساب النسبة المئوية للتشابه بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بين عزلة *Physalis peruviana* isolate AH-ZE1 (محددة بمستطيل ذي حواف حمراء) وعزلات وسلالات عالمية لأنواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank تراوحت النسبة بين 100% الى 95% بين الانواع كما هو موضح بالشكل 3-8.



الشكل 3-8: النسبة المئوية للتشابه بين عزلة *Physalis peruviana* isolate AH-ZE1 (محددة بمستطيل ذي حواف حمراء) وعزلات وسلالات عالمية لأنواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank علما ان هذه النسبة قد تم احتسابها بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA باستعمال برنامج

Sequence Demarcation Tool

كما بينت النتائج التطابق بين هذه العينة مع النوع *Physalis peruviana* voucher Smith 217 (WIS) المودع في بنك الجينات تحت الرقم التسلسلي DQ314161.1 فضلا عن وجود ثمانية طفرات في القواعد النايتروجينية بما يتفق مع نتائج (Paman *et al.*, 2020) اذ يمكن أن تحدث الطفرات أحيانا بسبب التغيرات في الظروف البيئية كالطقس البارد أو تقلبات درجات الحرارة او نتيجة التعرض الى عوامل احيائية وتم عرضها وتوثيقها وفقا لموقعها في GenBank

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
918 bits(497)	0.0	534/551(97%)	7/551(1%)	Plus/Minus
Query 10	CCCCCCCGGA	ACTGGGGGTCGCGGGT	CGGAGCGCCTAAGCGCCGGA	-GGGTCTGTCAGCC 68
Sbjct 570	CCCC-CCTGACCT	-GGGGTCGC-GGT	CGGAGCGCCTAAGCGCCGGAAGGGTCTGTCAGCC 514	
Query 69	GACACGGGCGACGGGTT	CGGCCACGGCACGAGAGTTGAGATTCAACCACCACTTGCC 128		
Sbjct 513	GGCACGGGCGACGGGTT	CGGCCACGGCACGAGAGTTGAGATTCAACCACCACTTGCC 454		
Query 129	GTGACGTCCGTCGACGCGGGCTCGCAATTAGGCCAGCCGCGCGCTGCGAGCGCACGGGAG 188			
Sbjct 453	GTGACGTCCGTCGACGCGGGCTCGCAATTAGGCCAGCCGCGCGCTGCGAGCGCACGGGAG 394			
Query 189	GCCAGTATCCGTCCC	GCAAGCCCCGCGTCGCGGGGCGAGGGGGGCGACGCGATGCGTGA 248		
Sbjct 393	GCCAGTATCCGTCCC	GCAAGCCCCGCGGGGCGAGGGGGGCGACGCGATGCGTGA 334		
Query 249	CGCCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCGCAACTTGC	GTTCAAAGACTC 308		
Sbjct 333	CGCCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCGCAACTTGC	GTTCAAAGACTC 274		
Query 309	GATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCAATTCGCTACGTTCTTCATCG 368			
Sbjct 273	GATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCAATTCGCTACGTTCTTCATCG 214			
Query 369	ATGCGAGAGCCGAGATATCCTTTGCCGAGAGTCGTTTCGTTTCAAGCGAGGCGCAGCTC 428			
Sbjct 213	ATGCGAGAGCCGAGATATCCTTTGCCGAGAGTCGTTTCGTTTCAAGCGAGGCGCAGCTC 154			
Query 429	CCCCGCGCGCGCCGCGAACGGGGCGCGAGGGGCGGGCCGTCGTTAAGTATTCTTGCCG 488			
Sbjct 153	CCCCGCGCGCGCCGCGAACGGGGCGCGAGGGGCGGGCCKTCGTTAAGTATTCTTGCCG 94			
Query 489	CGTTCGCGCCGGGTT	CGTTAGTCGACCGGCGACCGCGCACGCGGACCGCCGGC-GAC 547		
Sbjct 93	CGTTCGCGCCGGGTT	CGTTAGTCGACCGGCGACCGCGCACGCGGACCGCCGGCCGAC 34		
Query 548	AAAAGGGGGGA 558			
Sbjct 33	GA--GGGGGGA 25			

الشكل 3-9: التطابق بين العينة الأولى التي تم تسجيلها *Physalis peruviana* isolate AH-ZE1 مع العينة ذات الرقم التسلسلي DQ314161.1 بنسبة تشابه 96.91% الموجودة بالولايات المتحدة الأمريكية

ان الطفرة تولد الاختلاف الجيني الذي تعتمد عليه العملية التطورية يمكن تتبع هذه الطفرات خلال العملية التطورية واستخدامها كدليل على الأصل المشترك (Stettler *et al.* 2021). إذ تم تسجيل 8 طفرات كما مبين في الجدول 3-2

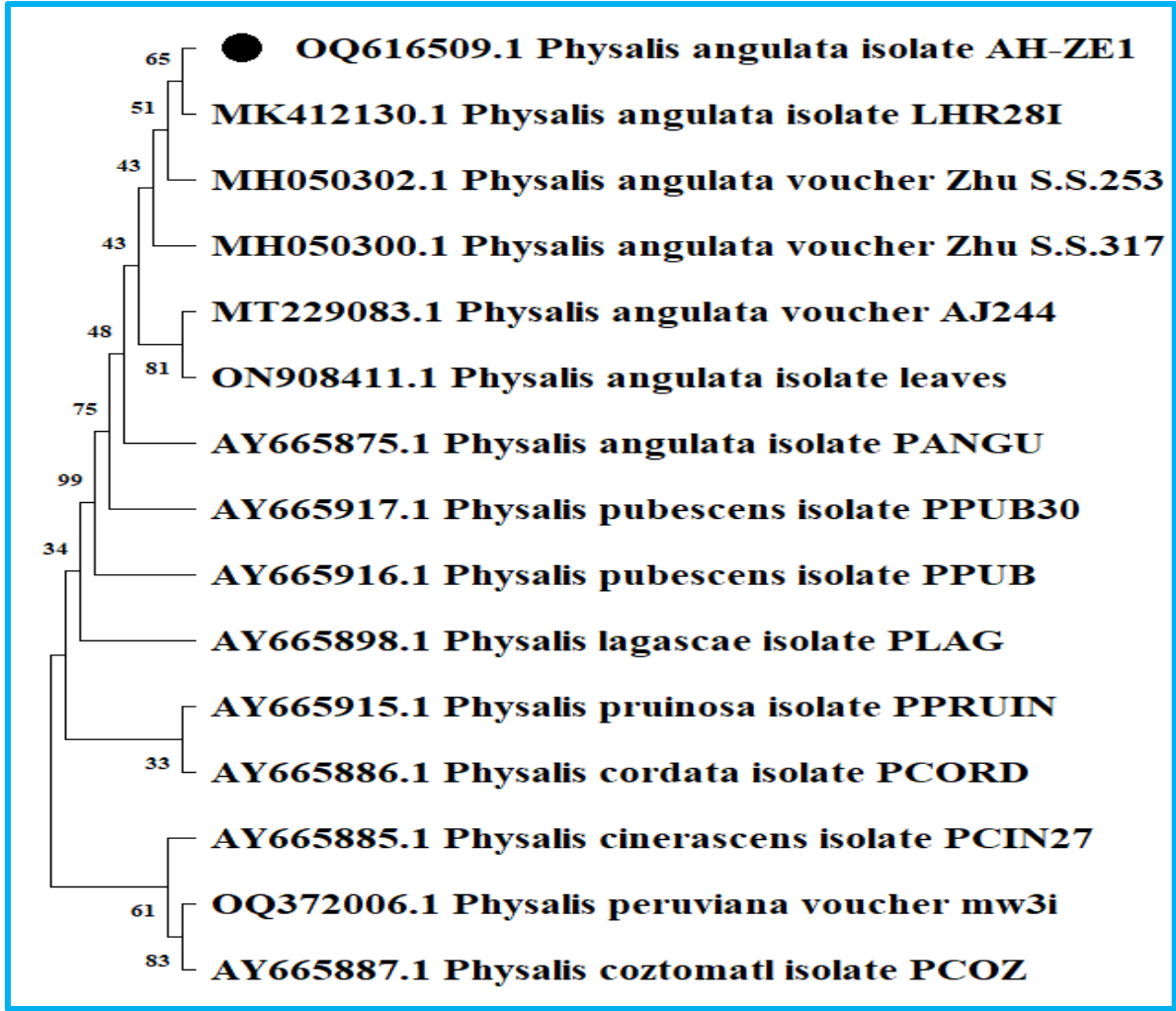
الجدول 3-2: الطفرات بين تسلسل العينة قيد الدراسة مع العينات المسجلة في البنك الجينات NCBI-BLAST

الاسم العلمي	GenBank Accession number	NCBI-BLAST Homology sequence identity(%)			Identity	
		Number mutation	Type Of Mutation	الموقع		
<i>Physalis peruviana</i>	OQ616506.1	8	G/A	512bp	3.09	96.91%
			T/A	427		
			G/T	364		
			T/A	234		
			G/T	192		
			G/A	136		
			G/K	116		
			G/A	33		

اما العينة الثانية فقد اشارت التسلسلات النيوكليوتيدية الى الهوية الموكدة للمجاميع المتضخمة عن طريق تحليل NCBI blast في موقع بنك الجينات genebank بانها تعود الى جنس *Physalis* من خلال وجود تشابه بنسب مختلفة مع التسلسل الوراثي للأنواع العالمية المودع في بنك الجينات وتمت المقارنة بينهما واكد ذلك نتائج تحليل النشوء والتطور الوراثي من خلال رسم الشجرة الوراثية بالاعتماد على تسلسلات القواعد النايبروجينية وحساب المسافة الوراثية بطريقة neighbor-joining واستعمال البرنامج التحليل الوراثي MEGA V.11 (Kato et al., 2010)، احتوت الشجرة على 8 انواع مختلفة تنتمي الى نفس الجنس *Physalis* اذ ارتبط النوع قيد الدراسة بنوع *Physalis angulata* isolate LHR28I المودع في البنك الجيني بالرقم التسلسلي MK412130.1 بنسبة 98.02% الذي ينتمي الى سلالة توجد في اسبانيا ، كما تشابه مع النوع *Physalis angulata* voucher Zhu MH050302.1 بنسبة 97.81% والذي ينتمي الى سلالة توجد في جنوب الصين ، كما تشابه مع النوع *Physalis angulata* voucher Zhu MH050300.1 بنسبة تشابه 97.81% الذي ينتمي الى سلالة توجد في جنوب الصين أيضا ، كما تشابه مع النوع *Physalis angulata* voucher AJ244 المودع تحت الرقم التسلسلي MT229083.1 بنسبة تشابه 97.59% الذي ينتمي الى سلالة توجد في المكسيك ، كما تشابه مع النوع *Physalis angulata* المودع تحت الرقم التسلسلي ON908411.1 بنسبة تشابه 97.13% الذي ينتمي الى سلالة توجد في روسيا، كما تشابه مع النوع *Physalis angulata* PANGU المودع تحت الرقم التسلسلي AY665875.1 بنسبة تشابه 97.10% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية ، كما تشابه مع النوع الثاني *Physalis pubescens* PPUB30 المودع تحت الرقم التسلسلي AY665917.1 بنسبة تشابه 96.86% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية ، كما تشابه مع النوع الثاني *Physalis pubescens* PPUB المودع تحت الرقم التسلسلي AY665916.1

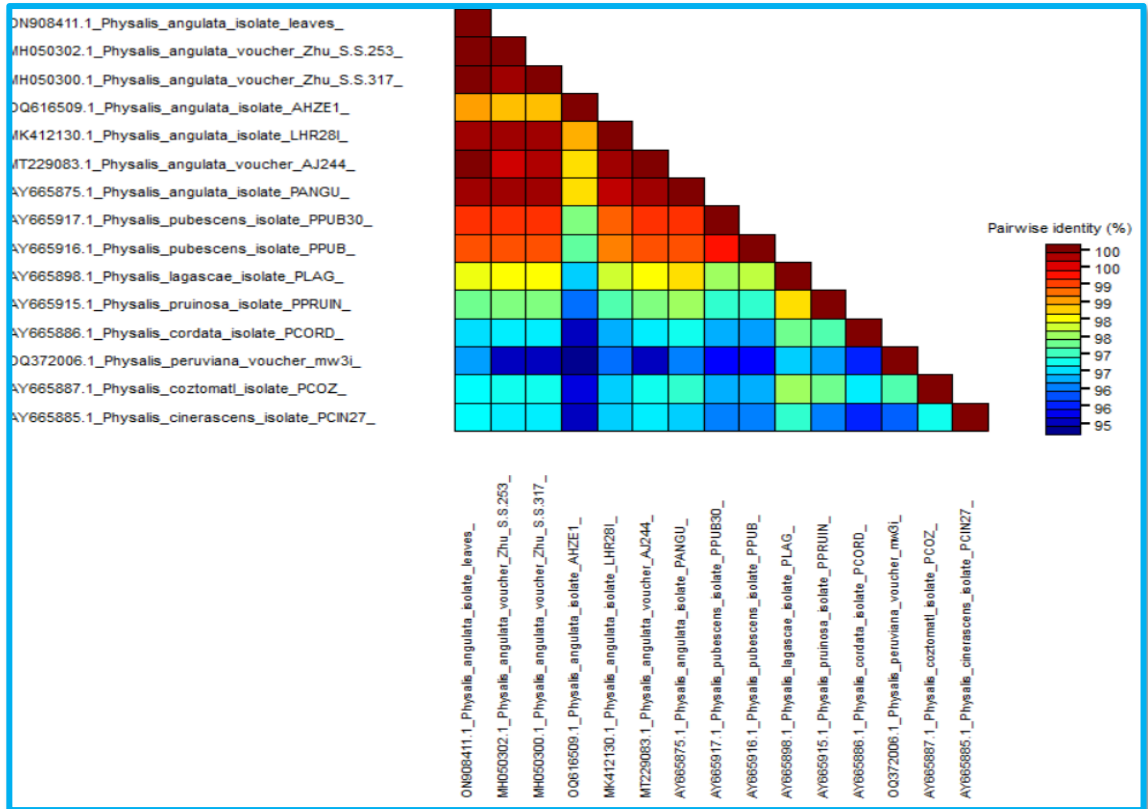
بنسبة تشابه 96.70% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية، كما بينت الشجرة الوراثية وجود تشابه مع النوع الثالث هو *Physalis lagascae* PLAG المودع تحت الرقم التسلسلي AY665898.1 بنسبة تشابه تبلغ 95.45% والذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية وتشابه مع النوع الرابع *Physalis pruinosa* PPRUIN المودع تحت الرقم التسلسلي AY665915.1 بنسبة تشابه 95.16% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية وتشابه مع النوع الخامس *Physalis cordata* PCORD المودع تحت الرقم التسلسلي AY665886.1 بنسبة تشابه 94.03% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية ، كما تشابه مع النوع السادس *Physalis cinerascens* PCIN27 المودع تحت الرقم التسلسلي AY665885.1 بنسبة تشابه 94.43% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية ، كما تشابه مع النوع السابع *Physalis peruviana* mw3i المودع تحت الرقم التسلسلي OQ372006.1 بنسبة تشابه 93.67% الذي ينتمي الى سلالة توجد في كينيا ، كما تشابه مع النوع الثامن *Physalis coztomatl isolate* PCOZ المودع تحت الرقم التسلسلي AY665887.1 بنسبة تشابه 94.04% الذي ينتمي الى سلالة توجد في الولايات المتحدة الامريكية ، تتفق مع كل (Deanna et al 2019) (Rustam et al .2020) اعتماد على التسلسلات الرايبوزمية التي تم تحليلها .

تم تسجيل النوع من قبل الباحث باسم *Physalis angulata isolate* AH-ZE1 تحت الرقم التسلسلي OQ616509.1 (الشكل 3-10).



الشكل 3-10: الشجرة الوراثية توضح العلاقة بين النوع قيد الدراسة *Physalis angulata* isolate AH-ZE1 (محددة بنقطة ذى لون اسود) وتتابعات سلالات عالمية لأنواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining .

وباستعمال برنامج Sequence Demarcation Tool تم حساب النسبة المئوية للتشابه بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بين عزلة *Physalis angulata* isolate AH-ZE1 (محددة بمستطيل ذى حواف حمراء) وعزلات وسلالات عالمية لأنواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank تراوحت النسبة بين 100% الى 95% كما هو موضح بالشكل (3-11) .



الشكل 3-11: النسبة المئوية للتشابه بين النوع الثاني *Physalis angulata* isolate AH-ZE1 (محددة بمستطيل ذي حواف حمراء) وعزلات وسلالات عالمية لأنواع نباتية تعود لنفس الجنس تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank علما ان هذه النسبة قد تم احتسابها بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA باستعمال برنامج

Sequence Demarcation Tool

كما بينت النتائج التطابق بين هذه العينة ومقارنتها مع النوع *Physalis angulata* isolate LHR28I المودع في بنك الجينات تحت الرقم التسلسلي MK412130.1 إضافة الى وجود 10 طفرة في القواعد النايتروجينية المبين في الشكل (3-12) و (الجدول 5) وتم عرضها وتوثيقها وفقا لموقعها في GenBank

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1051 bits(569)	0.0	594/606(98%)	2/606(0%)	Plus/Plus
Query 24	TCG-AACCTGCTAAGCAGAGCGACCCGCGAACCTGTTTGAACACCGGGGAGGC	CGCCTT	82	
Sbjct 1	TCGAAACCTGCTAAGCAGAGCGACCCGCGAACCTGTTTGAACACCGGGGAGGC	CGCCTT	60	
Query 83	GGCTCGCCTCCCCCTCGTCGTCCGGCGGTcgcgcgcgcgcgTTCGCCGGT	CGACCAACGA	142	
Sbjct 61	GGCTCGCCTCCCCCTCGTCGTCCGGCGGTTCGCCGGTTCGCCGGT	CGACCAACGA	120	
Query 143	ACCCCGGCGCGGAACGCGCCAAGGAATACTGAACCGATGGCCTGGCCCTCGCG	CCCCGTC	202	
Sbjct 121	ACCCCGGCGCGGAACGCGCCAAGGAATACTGAACCGATGGCCTGGCCCTCGCG	CCCCGTC	180	
Query 203	CGCGGGCGCGCGCGGGGGACCTGCGCTTCGCATGAAACACGAACGACTCTCG	GCAACGGAT	262	
Sbjct 181	CGCGGGCGCGCGCGGGGGACCTGCGCTTCGCATGAAACACGAACGACTCTCG	GCAACGGAT	240	
Query 263	ATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGA	ATTGCAAG	322	
Sbjct 241	ATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGA	ATTGCAAG	300	
Query 323	AATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAG	GCCGAGGG	382	
Sbjct 301	AATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAG	GCCGAGGG	360	
Query 383	CACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCTCGCCCCGCTAAGCG	CGGGGCG	442	
Sbjct 361	CACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCTCGCCCCGCTAAGCG	CGGGGCG	420	
Query 443	TGGCGGGACGGAGGCTGGCCTCCCGTGCCTCGCAGCGCGCGGCTGGCCTAA	TGCTAGC	502	
Sbjct 421	TGGCGGGACGGATGCTGGCCTCCCGTGCCTCGCAGCGCGCGGCTGGCCTAA	TGCGAGC	480	
Query 503	CCGCGTCGACCGACGTCACGGCGAGTGGTGGTTGAATCTCAACTCTTTAGGT	GCCCGTGG	562	
Sbjct 481	CCGCGTCGACCGACGTCACGGCGAGTGGTGGTTGAATCTCAACTCTTTAGGT	GCCCGTGG	539	
Query 563	CAAAACCCGTCGCGCGCGTCCGGCTGCTAGACCCCTCCCGCGCTTAGGGCG	TCCGACCGCG	622	
Sbjct 540	CCGAACCCGTCGCGCGCGTCCGGCTGCTAGACCCCTCCCGCGCTTAGGGCG	TCCGACCGCG	599	
Query 623	ACCCCA	628		
Sbjct 600	ACCCCA	605		

الشكل 3-12: التطابق بين العينة الثانية التي تم تسجيلها باسم *Physalis angulata* isolate AH-ZE1 مع العينة ذات الرقم التسلسلي MK412130.1 بنسبة 98.02% الذي ينتمي الى سلالة اسبانية

الجدول 3-3: الطفرات بين تسلسل العينة قيد الدراسة مع العينات المسجلة في بنك الجينات NCBI-BLAST

الاسم العلمي	GenBank Accession number	NCBI-BLAST Homology sequence identity(%)				Identity
		Number mutation	Type Of Mutation	الموقع	Polymorphism Percent(%)	
<i>Physalis angulata</i>	OQ616509.1	10	T/A G/A T/G G/T G/C C/T T/A C/A G/A G/C	383 bp 408 433 476 492 525 527 542 543 576	1.98	98.02%

2-3 تحليل كروماتوغرافيا الغاز - مطيافية الكتلة (Gas Chromatography –mass) للمستخلص النباتي

Physalis angulata isolate AH-ZE1

ان الفعالية الدوائية لأي عينة نباتية تعود إلى بعض المركبات الفعالة التي تشتمل عادة على المركبات الفينولية ، والقلويدات ، التانينات ، والصابونين ، والكربوهيدرات ، والجليكوزيدات ، والفلافونويد ، تمثل مركبات البوليفينول الأكثر شيوعاً في المستخلصات النباتية هي الأحماض الفينولية والفلافونويد والتانينات. بعد عملية توثيق الانواع تم تحضير مستخلص كحولي للنوع الثانية *Physalis angulata* isolate AH-ZE1 بينت النتائج المتحصل عليها في كل من المستخلصات الايثانولي، الميثانولي، المائي ، أن استعمال 50 غرام من النبات الجاف مع 500مل من لكل مذيب أعطى ناتج خام للمستخلص الايثانولي يساوي 25.9 غرام بحصيلة مقدارها 30.5% . وفي المستخلص الثاني كان المستخلص الخام يساوي 20.66 غرام بحصيلة مقدارها 24.8%.

بينت نتائج تحليل GC-mass احتواء العينة *Physalis angulata* isolate AH-ZE1 على اربعة وعشرين مركباً فعالا اذ يوضح الجدول 3-4 المركبات الفعالة مع وقت الاحتجاز بها (RT) ، والصيغة الجزيئية ، والمساحة، كما يلاحظ ان المركب Cyclohexane, 1,1'-(2-propyl-1,3-propanediyl)bis- سجل اعلى مساحة area بلغت 27.639 ، اما المركب Acetic acid, ethoxy فقد سجل اقل مساحة area بلغت 0.879.

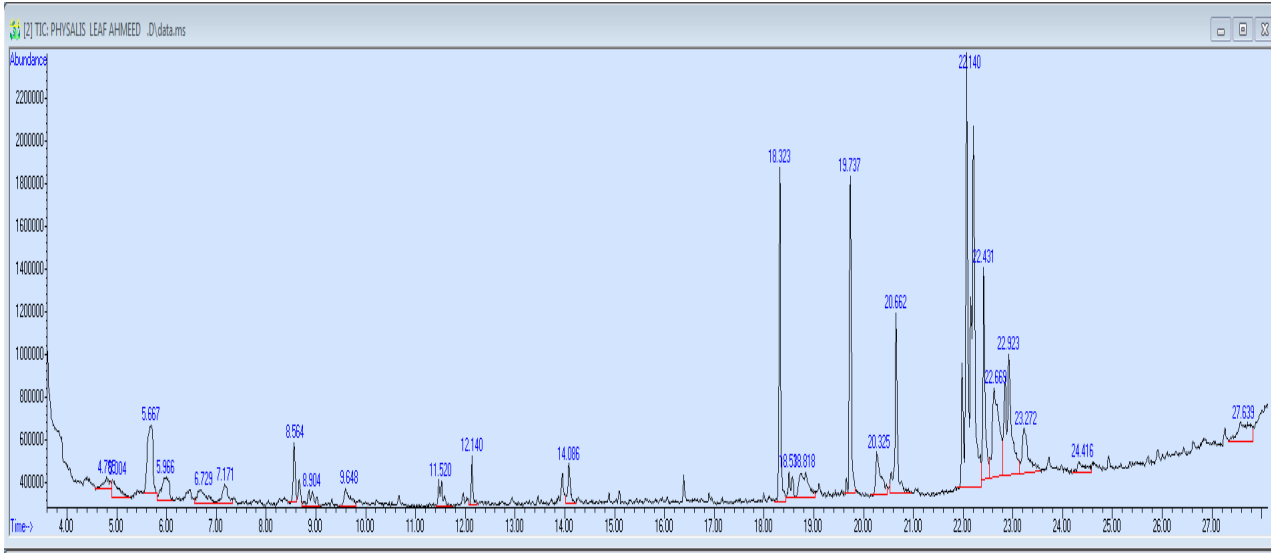
يُلاحظ وجود مركب cis-9-hexadecenal (C-9-H) حيث سجل مساحة (Area) 7.501 وهو من المركبات المهمة التي لها تأثير مضاد لبكتريا المكورات العنقودية، كما يوجد هذا المركب في العديد من النباتات مثل *Myristica fragrans* و *Aegle marmelos* و *Thuja orientalis*. كما ان هذا المركب يلعب دورا مهما في إنه مركب طبيعي فعال بيولوجياً ينتمي إلى مجموعة من الأدهيدات الدهنية الأحادية غير المشبعة الأحادية C16 يمتلك العديد من الخصائص مضادة للميكروبات ومضادة للالتهابات. (Broni et al., 2021) ولم يكن ساماً لخط الخلايا الظهارية الرئوية الطبيعية للإنسان L-132. (Hoda et al., 2019) كشفت بعض المصادر أيضاً أن C-9-H مركب مستقر في ظروف فسيولوجية متنوعة وهو آمن للاستهلاك البشري. (Kang et al., 2021) وتم وصفه بأنه مركب متطاير أليفاتي طويل السلسلة يساعد في تحلل الأحماض الدهنية وله رائحة قوية مميزة.

كما بينت نتائج تحليل GC-mass احتواء العينة *Physalis* على مركب Isopropyl myristate الذي يعد من المركبات المهمة يمتلك فعالية مضادة بكتيرية ويستخدم في مستحضرات التجميل والمستحضرات الصيدلانية الموضوعية اذ يسهل امتصاصه من قبل الجلد كما يتم استخدامه لإزالة البكتيريا من تجويف الفم كمواد غير مائي

لمنتج غسول. يستخدم Isopropyl myristate أيضاً كمذيب في مواد العطور وفي عملية إزالة المكياب .
(Chandra et al., 2020) كما هو موضح في (الجدول 3-4 والشكل 3-13).

الجدول 3-4: تحليل GC-mass لمستخلص اوراق *Physalis angulata* isolate AH-ZE1

Name اسم المركب	Molecular Formula الصيغة الجزيئية	Area% المساحة	R. Time وقت الاحتجاز	رقم
Octadecenoic acid, methyl ester	C19H36O2	27.634	22.140	1
9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)-	C20H34O2	8.076	22.923	2
cis-9-Hexadecenal	C16H30O	7.501	22.669	3
Hexadecanoic acid, methyl ester	C17H34O2	6.878	19.737	4
Isopropyl myristate	C17H34O2	6.740	18.323	5
Methyl stearate	C19H38O2	5.635	22.431	6
Hexadecanoic acid, ethyl ester	C18H36O2	5.125	20.662	7
1H-Indole, 3-ethyl-2-(2-pyridyl)	C15H14N2	4.426	5.667	8
Ethyl 9-hexadecenoate	C18H34O2	3.357	23.272	9
Cyclohexane, 1,1'- (2-propyl-1,3-propanediyl)bis-	C18H34	2.975	27.639	10
n-Hexadecanoic acid	C16H32O2	2.630	20.325	11
Caffeine	C8H10N4O2	2.619	18.818	12
Acetic acid, hydroxy-, ethyl ester	C4H8O3	2.075	5.966	13
Carbohydrazide	CH6N4O	1.487	5.004	14
Pentasiloxane, dodecamethyl-	C12H36O4Si5	1.474	8.564	15
Acetic acid, ethoxy-, ethyl ester	C6H12O3	1.367	8.904	16
Diethyl sulfate	C4H10O4S	1.350	6.729	17
Ethyl formate	C3H6O2	1.250	9.648	18
Propenone, 3-(2-benzoxazolylthio)-1- phenyl	C16H11NO2S	1.228	11.520	19
Octanoic acid, methyl ester	C9H18O2	1.212	7.171	20
2,3,4,5-Tetrafluorobenzyl alcohol, tert- butyldimethylsilyl	C13H18F4OSi	1.191	14.086	21
Ethanol, 2-bromo	C2H5BrO	1.046	18.538	22
4-Pyrrol3-[1-(2-carboxy-1-phenyl-ethyl)-2- oxo-pyrrolidin-3-ylcarbonyl]- propionylmorpho-piperazine-1-carboxylic acid tert-butyl ester	C26H36N4O7	0.894	24.416	23
Acetic acid, ethoxy	C4H8O3	0.874	4.785	24



الشكل 3-13: تحليل GC-mass لمستخلص اوراق *Physalis angulata*

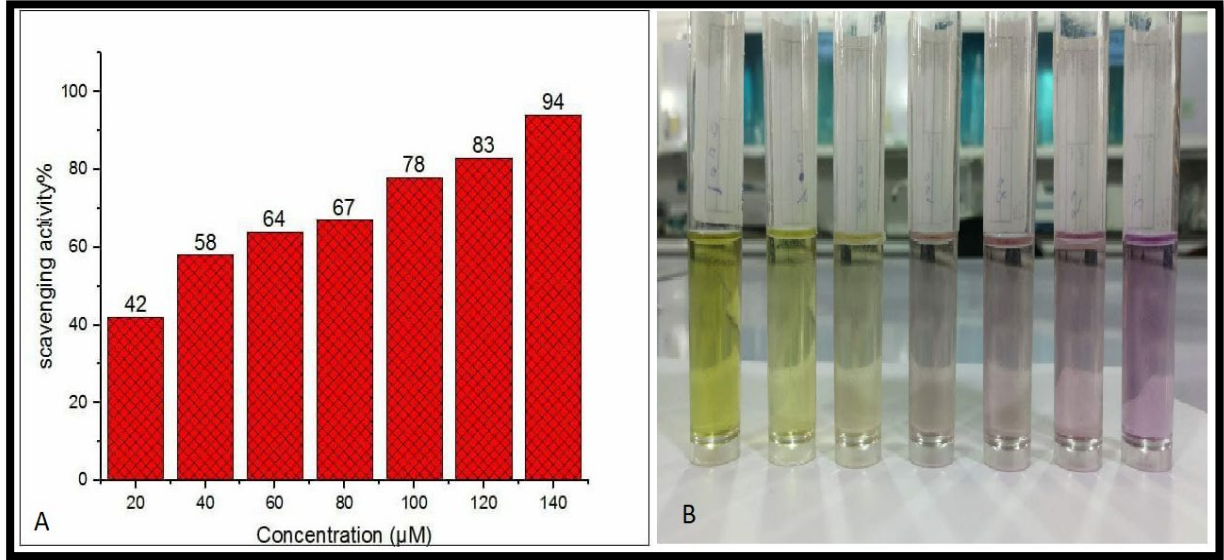
اظهرت نتائج الفحص الكيميائي الموضحة في الجدول 3-5 باستخدام بعض الكواشف ان نبات *Physalis angulata* الذي تم توثيقه يحتوي على الفينولات التي تعد من اهم مركبات الايض الثانوي الموجودة في النباتات وتشمل هذه المركبات حمض البنزويك ومشتقاته ، الفلافانون ، الفلافونول ، الفلافون ، الكاتيكول ، الأنثوسيانين والأنثراكينون ، تعمل المركبات الفينولية على تلف الغشاء جزئياً في الخلايا البكتيرية ، وتثبيط عوامل الضراوة مثل الإنزيمات والسموم، وايقاف تكوين الأغشية الحيوية البكتيرية وهذا يتفق مع ما وجدته Maria et al., (2018) كما بينت النتائج ان النبات يحوي علي مركبات flavonoids التي تعد مركبات فعالة ضد العديد من انواع البكتيريا بالنظر لقابليتها على تشكيل بروتينات معقدة قابلة للذوبان وخارج الخلية وفي جدران الخلايا البكتيرية وهذه تتفق مع ما حصل عليه Patricio et al, (2021) كما بينت النتائج وجود مركبات Tannins التي لها اهمية في تنشيط البروتينات وتعزيز موت الخلايا البكتيرية (El-Beltagi et al.2019) كما اوضحت نتائج الكواشف وجود كل من الكاربوهيدرات و الصابونين كومانين Coumarins بما تتفق مع نتائج كل من (Dong et al,2019) و (Mazumder et al. 2020).

الجدول 3-5: المركبات الفعالة باستخدام بعض الكواشف لنبات *Physalis*

ت	نوع الكشف	النتيجة
1	كشف التانينات (Tannins Test)	+
2	كشف الكاربوهيدرات (Carbohydrate Test)	+
3	كشف الكلايكوسيدات (Glycosides Test)	-
4	كشف الفينولات (Phenols Test)	+
5	كشف الراتنجات (Resins Test)	-
6	الفلافونويدات (Flavonoid's Test)	+
7	كشف الصابونين (Saponin Test)	+
8	كشف القلويدات (Alkaloid Test)	-
9	كشف البروتين (Protein Test)	-
10	كشف كومارين (Coumarins Test)	+
11	كشف التربينات (Terpenes Test)	-
12	كشف الستيرويدات (Steroids Test)	-

3-3 تقييم الفعالية المضادة للأكسدة لنبات *Physalis angulata* isolate AH-ZE1

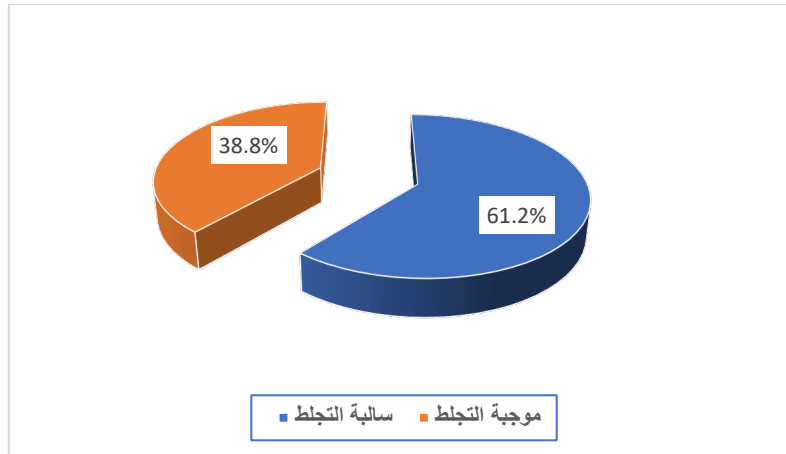
تعد مادة DPPH جذرا حرا ويمكن ان تقبل الكترولنا او ذرة هيدروجين من مادة مضادة للأكسدة واهية لذرة الهيدروجين لذا فان مادة DPPH تختزل وتتحول إلى DPPH – H مختبريا وتم اثبات ان العديد من المستخلصات لها القابلية على اختزال مادة DPPH يتضح من النتائج ان المستخلص الكحولي لنبات *Physalis angulata* يمتلك فعالية مضادة للأكسدة اذ ترتفع النسبة المئوية لتثبيط الجذر الحر بزيادة تركيز المستخلص للنبات لتصل الى اعلاها 94% عند تركيز 140 مايكروغرام / مل فيما بلغ اوطأها 42% عند تركيز 20 مايكروغرام / مل الشكل (3-14) ويمكن ان تعزى النتيجة الى احتواء نبات (*Physalis*) على نسبة عالية من الفينول اذ تكون العلاقة طردية بين محتوى الفينول والفعالية المضادة للأكسدة وهذا يتفق مع كثير من الدراسات (Gu et al.2019)، (Vilkickyte et al 2020) و(Vadim et al.2022)



الشكل 14-3 : الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص نبات *Physalis angulata* AH-ZE1 باستخدام كسح الجذور الحرة

4-3 عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية

تم جمع (120) عينة سريرية من المرضى الذين يعانون من التهاب المسالك البولية والحروق والجروح (74 أنثى و 46 ذكور) ، للمدة من بداية كانون الثاني 2023 إلى نهاية اذار 2023. أوضحت النتائج ان 62 (51.6%) عينة ظهر فيها نمو على الوسط التفرقي (Manitol Salt agar). تم تحديد 24 منها (38.8%) عزلة على أنها المكورات العنقودية الموجبة لتخثر الدم وتم تحديد 38 عزلة (61.2%) على أنها مكورات عنقودية سالبة لتجلط الدم (CoNS) (الشكل 15-3).



الشكل 3-15: عزل مستعمرات المكورات العنقودية من الحالات السريرية

ظهرت العزلات المخمرة للمانيتول كمستعمرات ذهبية مع تغير لون الوسط من الوردي إلى الأصفر بينما لم يخمر البعض الآخر المانيتول وظهر كمستعمرات وردية دون تغيير لون الوسط. كانت هذه المستعمرات عادة مستديرة، محدبة، ملساء مع سطح لامع، وقطرها حوالي 4 ميكرومتر.

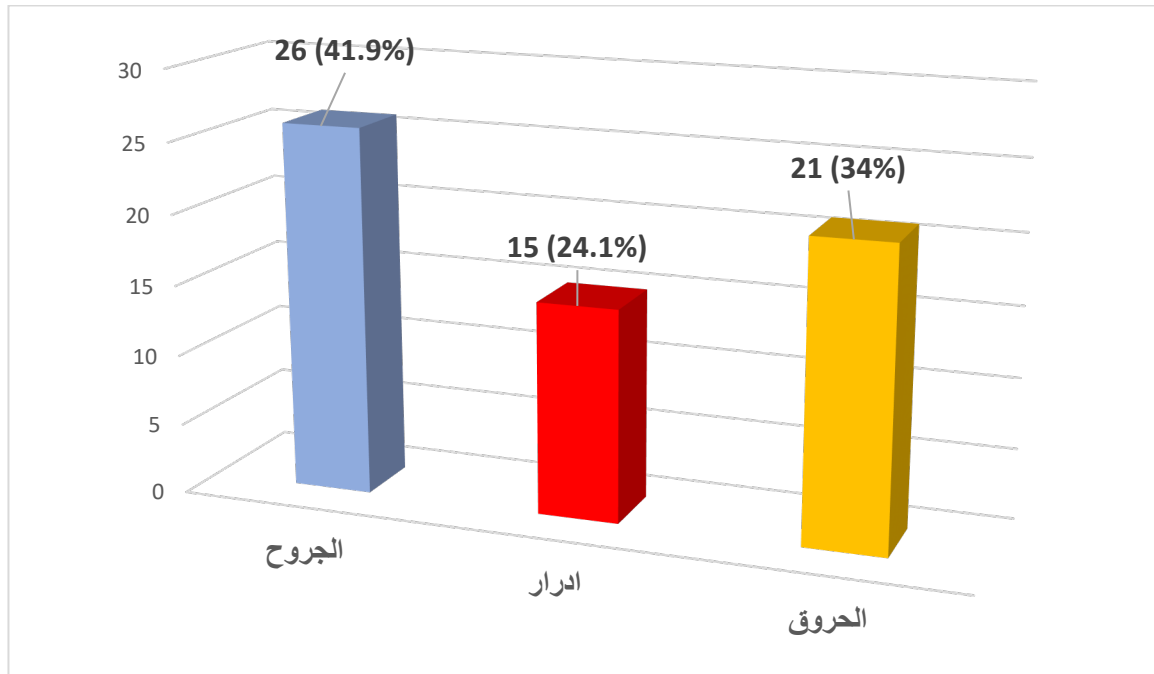
أظهرت زراعة بكتريا غير مخمرة لسكر المانيتول على أجار الدم مستعمرة بيضاء معتمة وناعمة. كانت فريدة من نوعها في النمو على الوسائط التي تحتوي على نسبة عالية من الملح، مثل أجار ملح مانيتول (MSA) وقادرة أيضاً على النمو في وسط عالي الملح يحتوي على 10% كلوريد الصوديوم (Lobeffe&pierce.,2010).

تم التعرف على المكورات العنقودية اعتماداً على الخصائص المظهرية والمجهريّة فضلاً عن الاختبارات الكيميائية الحيوية كما في الجدول 3-6، والتشخيص يتوافق مع استخدام جهاز الفايترك الـ Vitek 2 compact ملحق (e).

تفاوت انتشار المكورات العنقودية بين العينات التي تم جمعها اعتماداً على مصادر العزل ونوع العينات السريرية. إذ كانت هذه المكورات موزعة بواقع 15 (24.1%) في الادرار، و26 (41.9%) عزلات من الجروح 21 (34%) عزلات نقية من الحروق، كما هو مبين في الشكل (3-16).

الجدول 3-6: الاختبارات المزرعية والكيموحيوية لبكتريا المكورات العنقودية

نتائج		الاختبارات الكيميو حيوية
<i>Staphylococcus spp.</i>		
<i>S.aureus</i> (24 isolate)	CoNS(38 isolate)	
Yellow colonies	Pink colonies without changing the color of the medium	الزرع على وسط Manitol Salt agar
Gram positive cocci	Gram positive cocci	صبغة غرام (Gram stain)
(+)	(-)	اختبار التخثر (Coagulase test)
(-)	(-)	اختبار الاوكسيديز (Oxidase test)
(+)	(+)	اختبار الكاتليز (Catalase test)
(-)	(-)	اختبار الحركة (Motility test)
➤ (+) Positive result, (-) Negative result		

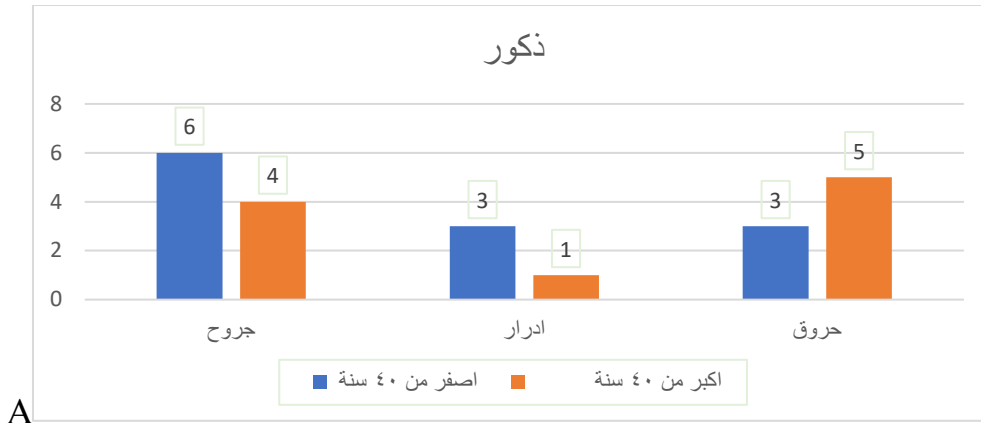


الشكل 3-16: توزيع نسب عزلات المكورات العنقودية بحسب مصادر عزلها

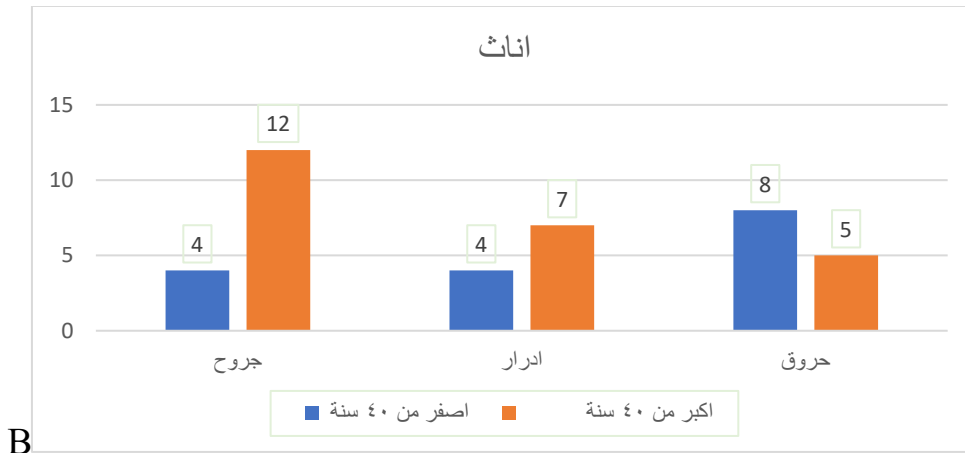
قد تكون الاختلافات بين نسب العزلات مرتبطة بوقت جمع العينات وعددها والاختلافات في مصادر العزلات والمستشفيات المشمولة في كل دراسة. إذ ان عزلات بكتريا CONS هي من بين الأنواع البكتيرية الأكثر عزلة في علم الأحياء الدقيقة السريرية ، ومعظم الإصابات المرتبطة بـ CONS هي من المستشفيات. على الرغم من اعتبار CONS لفترة طويلة غير مسببة للأمراض، بيد انها تعد الآن من مسببات الأمراض الانتهازية (Willemse-Erix et al. 2009).

وكانت هذه النتيجة مماثلة للنتائج التي حصل عليها (jaloot et al., 2007)

يوضح الجدول 3-17 أن نسبة الإصابة بالمكورات العنقودية كانت في الادرار اقل من بقية الحالات السريرية حيث سجلت في الإناث (73.3%) أكثر من الذكور (26.6%) ، وقد يكون هذا بسبب الاختلاف التشريحي بين مجرى البول عند الذكور والإناث إذ أن مجرى البول عند الإناث أقصر وأقرب من فتحة الشرج ومع انخفاض مستوى هرمون الاستروجين لدى المرأة مع انقطاع الطمث ، يزداد خطر إصابتها بالتهاب المسالك البولية بسبب فقدان بكتريا الحامضية النافعة علاوة على ذلك ، يؤدي الجماع أحيانا إلى جروح صغيرة في مجرى البول ودفع البكتيريا إلى المثانة (Bowen, D.K., Dielubanza, E. and Schaeffer., 2015).



A

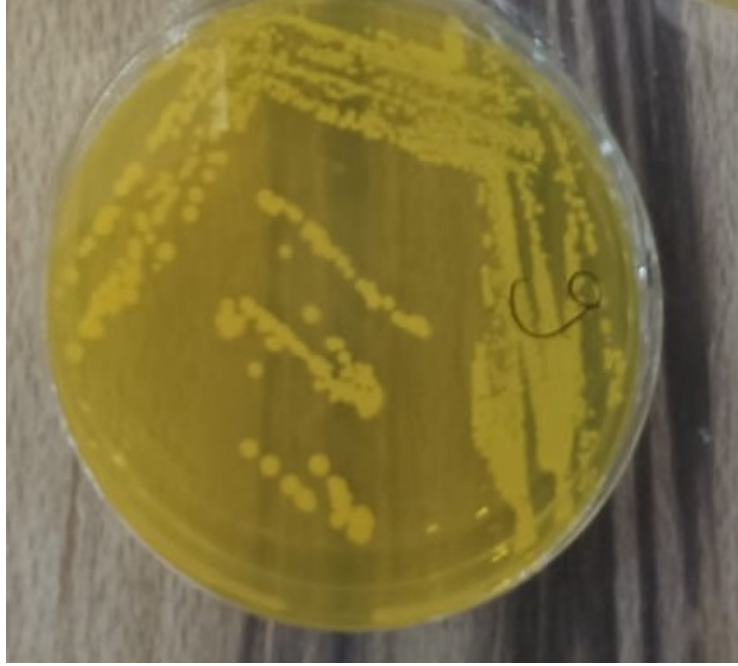


B

الشكل 3-17 توزيع نسب عزلات المكورات العنقودية المعزولة من الحالات السريرية مختلفة (الحروق ،الجروح والادرار) لذكور A

والاناث B

إن وسط اكار المانيتول الملحي هو وسط تفرقي واختياري بسبب احتوائه على نسبة عالية من ملح كلوريد الصوديوم (7.5-10%) الذي يثبط نمو الكثير من الاحياء المجهرية، والتي بالإمكان تحملها من قبل بكتريا *S.aureus*، كما يحتوي على سكر المانيتول وكاشف الفينول الأحمر إذ ظهرت بكتريا *S.aureus* بشكل مستعمرات صفراء لها القابلية على تخمير سكر المانيتول مؤدية الى انتاج حامض يتسبب في تحويل الكاشف من اللون الوردي الى الأصفر بحسب ما هو موضح في الشكل 3-18. اما المكورات العنقودية الأخرى لن تخمر سكر المانيتول (Leboffe & Pierce, 2010).



الشكل 3-18 : المستعمرات المكورة العنقودية على وسط (MSA).

ان انزيم (Coagulase) هو إنزيم له فعالية شبيهة بالبروثرومبين قادر على تحويل الفيبرينوجين إلى الفيبرين ، مما أدى إلى تكوين جلطة مرئية. يهدف اختبار تجلط الدم إلى استخدامه في التمايز بين بكتريا *S. aureus* التي لها القابلية على تجلط الدم من تلك غير القادرة فيها (CoNS) (Murray et al. 2007). لم تتمكن المكورات العنقودية الذهبية و CoNS من تطوير لون أزرق أو بنفسجي يشير إلى إنتاج أوكسيديز مما يعني عدم القدرة على امتلاك أوكسيديز السيتوكروم الذي يحفز نقل الإلكترونات من المركبات المانحة إلى متقبلات الإلكترون التي تميزها عن *Micrococcus spp* (Colaninno, 2008) تم استخدام اختبار الكاتلاز بشكل شائع للتمييز بين المكورات العنقودية (سلبية الكاتلاز) والمكورات العنقودية (إيجابية الكاتلاز). الكاتلاز هو إنزيم بكتيري يحلل بيروكسيد الهيدروجين إلى أكسجين وماء. مما يتسبب بحدوث فقاعات أو فوران (Murray et al. 2007).

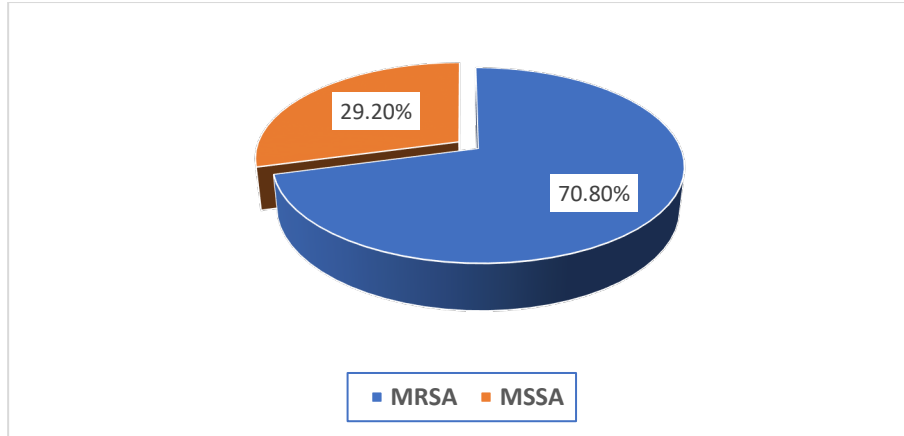
3-4-1 الكشف المظهري عن البكتريا المقاومة للميثيسيلين MRSA

استخدمت طريقة الانتشار بالأقراص (Disk diffusion test) في الكشف المظهري عن البكتريا المقاومة للميثيسيلين عن تلك الحساسة منها عبر استخدام المضادين البنسلين (Penicillin) والسيفوكستين (Cefoxitin)، وتبين من النتائج الموضحة ان جميع العزلات البكتيرية كانت مقاومة للبنسلين (Penicillin) أي بنسبة 100% فيما كانت 77.41% منها مقاومة للسيفوكستين (Cefoxitin) وتتفق النتائج المستحصلة من هذه الدراسة مع ما تم الحصول عليه في دراسة أجريت في بنكلادش قام بها Hasan.,(2016) الذي أوضح ان جميع العزلات المستخدمة في دراسته كانت مقاومة للبنسلين فيما كانت (75%) من مقاومة للميثيسيلين (Methcillin)، كما كانت هذه الدراسة مطابقة أيضا لدراسة أخرى أجريت في بنكلادش اذا كانت البكتريا مقاومة للاوكساسيلين (Oxacilin) بنسبة (77.3%) (Sultana .,2019)، وتم استبعاد العزلات البكتيرية الحساسة للميثيسيلين فيما تم الاحتفاظ بالعزلات المقاومة منها لإجراء الدراسات اللاحقة.

يختلف المضاد Methcillin عن البنسلين بإضافة مجموعة ميثوكسي (Methoxy group) ضمن مجموعة الفينول الموجودة في البنسلين، اذ يعمل الميثيسيلين على تثبيط البكتريا بالية مشابهة لعمل البنسلين باستثناء ان مجموعة الميثوكسي تنتج انزيما يقلل ألفة *Staphylococcal β-lactamase* (Stapleton&taylor.,2008).

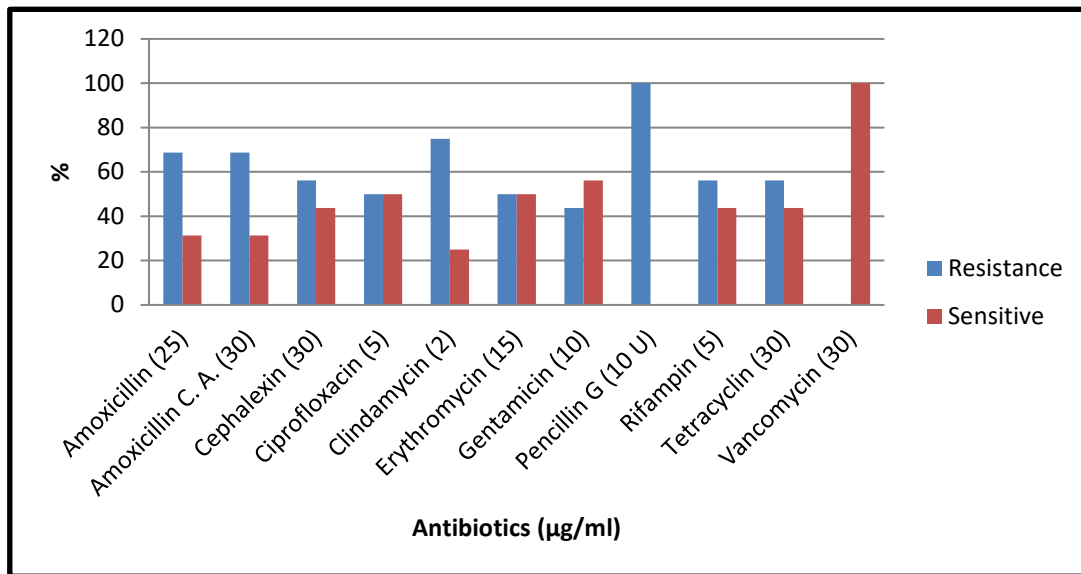
3-4-2 اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

تم تحديد اختبارات الحساسية لعزلات *S.aureus* لـ 12 مضادًا حيويًا مختلفًا بطريقة الانتشار القرصي . واتضح من النتائج تفاوت حساسية العزلات للمضادات الحيوية المستخدمة. وتبعًا لحساسية *S. aureus* للميثيسيلين ، قسمت العزلات إلى مجموعتين: - 17 عزلة (70.8%) كانت مقاومة للميثيسيلين *S.aureus* (MRSA) فيما استعملت مجموعة أخرى على 7 عزلات (29.2%) والتي كانت حساسة للميثيسيلين (MSSA) كما هو موضح في الشكل (3-19) وتتفق مع نتائج (Panáček et al, 2009)

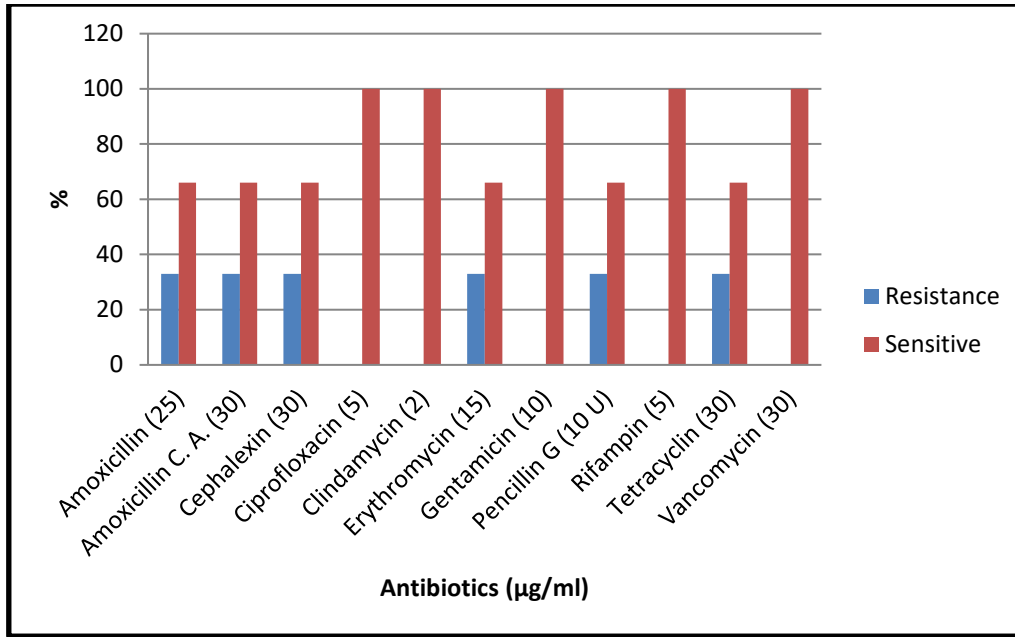


الشكل 3-19 : توزيع المكورات العنقودية بحسب مقاومتها الى الميثيسيلين

زادت مقاومة الميثيسيلين في عزلات بكتريا *S.aureus* المعزولة من المستشفيات بشكل كبير ، وترتبط أيضًا بمقاومة المركبات المفيدة الأخرى المضادة للمكورات العنقودية ويتضح من الجدولين (3-20 و 3-21). ان عزلات بكتريا MSSA كانت حساسة بنسبة 100% للجنتيميسين والريفامبين والكليندامايسين والسيبروفلوكساسين والفانكوماييسين ، بينما أظهرت عزلات بكتريا MRSA حساسية بنسبة 100% للفانكوماييسين فقط.



الشكل 3-20 : مقاومة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية نوع (MRSA) ضد بعض انواع المضادات الحيوية



الشكل 3-21 : مقاومة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية نوع (MSSA) ضد بعض انواع المضادات الحيوية

في هذه الدراسة كانت مقاومة MRSA ضد البنسلين 100% و 33% من MSSA بينما اوضحت النتائج التي حصل عليها (Agricola et al.2005) ، أن 80% من بكتريا *S.aureus* المقاومة للبنسلين، اما البكتريا MRSA المقاومة لأموكسيسيلين وحمض أموكسيسيلين كلافلونيك فبلغت 68.7% ، بينما بلغت مقاومة MSSA لأموكسيسيلين وحمض أموكسيسيلين كلافلونيك 33%.

يحتوي البنسلين على حلقة β -lactam في تركيبه ويمكن ان تحقق مقاومة البكتريا لهذا المضاد بثلاث اليات الأولى: تتمثل بإفراز انزيمات β -lactamase التي تعمل على تحلل حلقة البيتا لاكتام الموجودة في المضاد والثانية: تقليل نفاذية البكتريا للمضاد وبالتالي تمنعه من الدخول الى داخل الخلية، اما الثالثة: فتعتمد على تغيير الهدف المحدد للمضاد الموجود في الخلية مما يتعذر الارتباط بالهدف المرسوم له، وبالتالي عدم قتل البكتريا (Kumar&Varela.,2013).

وتشير النتائج أيضا الى ان عزلات بكتريا *S.aureus* قيد الدراسة كانت مقاومة 100% أيضا للسيفالوسبورينات بجميع اجيالها تشتمل على عائلة (Cephalosporins) ولجميع اجيالها المتمثلة في Cefadroxil وCephalexin من الجيل الأول وCefuroxime من الجيل الثاني و Cefixime و Cefpodoxime وceftriaxone وCefotaxime وCeftizoxime وCefoperazone وCeftazidime من الجيل الثالث وCefepime وCefpirome من الجيل الرابع. تتفق هذه النتائج في جزء منها مع ما حصل عليه (2021) ،. Al-Naqshbandi et al في دراسة محلية في أربيل إذ بلغت مقاومة البكتريا 100% للمضادين Cefotaxime وCeftriaxone.

تحتوي السيفالوسبورينات على حلقة β -lactam ويمكن ان تعزى مقاومة البكتريا لهذه المضادات الى إمكانية تحلل تلك المضادات بفعل انزيمات β -lactamase او تحويل البروتينات المرتبطة بالبنسلين (PBP) او من خلال تقليل نفاذية المضاد الى داخل البكتريا (Byarugaba.,2010).

بأن مقاومة الاريثروميسين والكلينداميسين من المحتمل أن تكون مرتبطة بالنمط الظاهري (-macrolid lincosamid-streptogramin) ، والذي قد يفسر الارتباط القوي (95%) لوحظ بين المقاومة لهذه المضادات الحيوية. كانت مقاومة MRSE للريفامبين 56.2% ولم تظهر مقاومة في MSSA ، وهي نفس النتيجة التي حصل عليها (de Araujo et al 2006)

أجريت دراسة في أمستردام قام بها (Bonko et al .,2021) واتضح ان بكتريا *S.aureus* المعزولة من البلعوم الانفي كانت منخفضة المقاومة للـ Ciprofloxacin بنسبة 4.5% والى جانب ذلك هناك دراسة محلية في مصر اشارت الى ارتفاع المقاومة لعزلات *S.aureus* المستحصل عليها من مصادر سريرية مختلفة وكانت حوالي 80% منها مقاومة (Ghoniem et al.,2014).

تتمكن البكتريا من مقاومة مضادات Fluoroquinolon عبر تقليل نفاذية جدار البكتريا لهذه المضادات وبالتالي تمنعها من الدخول الى داخل الخلية البكتيرية (Kumar&Varella .,2013). وتتضح اليات عمل مضادات Fluoroquinolones من خلال ايقافها لعملية تكرار الحامض النووي (DNA replication) بتثبيطها لأنزيم DNA gyrase مما يؤدي الى توقف نمو الخلية البكتيرية فيما بعد (Soni.,2012).

كانت مقاومة MRSA للنتراسيكلين والسيفاليكسين 56.2% و 33% كما هو موضح في الشكل (3-20) و (3-21) . تحدث مقاومة النتراسيكلين من خلال ثلاث آليات وهي تدفق ، وحماية الريبوسوم ، والتعديل الكيميائي (brooks ، 2007). بينما كانت مقاومة MRSA للجنتاميسين 43.7% ولم تظهر مقاومة MSSA للجنتاميسين.

ينتمي المضاد Gentamycin الى مجموعة مضادات Aminoglycosides وتقاوم البكتريا هذه المضادات عبر اليات عدة تتضمن الأولى تثبيط المضادات من خلال انزيم يعمل على تغيير تركيب المضاد عن طريق نقل مجموعة فعالة (functional group) للمضاد مثل مجاميع acyl و ribosyl و Thiol و phosphoryl عن طريق تغيير تركيب المضاد بفعل انزيم Nucleotide transferase والثانية تتمثل بتحويل الهدف للمضاد الحيوي بواسطة عملية Methylation على الحامض النووي 16srRNA والثالثة بتغيير نفاذية جدار البكتريا للمضادات الحيوية وبالتالي تمنعها من الدخول الى داخل الخلية البكتيرية (Kumar&Varella .,2013).

يعد مضاد Gentamicin قاتلا للبكتريا لكونه يرتبط مع مستقبلات بروتينية على الوحدة الريبوسومية 30S وتثبيط تصنيع البروتين البكتيري الطبيعي (Gentilini et al .,2000)

ويلاحظ ان نسبة حساسية العزلات للمضادين Clindamucin و Erthromycin منخفضة نوعا ما اذ بلغت (62.5 و 66.7%) على التوالي، ينتمي هذان المضادات الى مجموعة الماكروليدات (Macrolides) التي تتلخص الية عملها بالارتباط بالوحدة الرايبوسومية 50S مما يؤدي الى تثبيط تصنيع البروتين، تعد هذه المضادات موقفة لنمو البكتريا (Bacteriostatic) في التراكيز الواطئة بيد ان تأثيرها يصبح قاتلا عند التراكيز العالية او يعتمد على نوع الكائن المجهرى (Tomisic.,2011).

أظهرت النتائج ان مضادات مجموعة Glycopeptide ذات فعالية ممتازة ضد بكتريا *S.aureus* اذ بلغت حساسية العزلات 100% لمضاد Vancomycin. تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكره Roy et al., (2015) اذ ان عزلات البكتريا المذكورة المتحصل عليها من مرضى وحدة الجراحة بإحدى مستشفيات بنغلادش كانت حساسة بنسبة 100% للمضادات قيد الدراسة كما تم الحصول على نسبة الحساسية ذاتها لبكتريا *S.aureus* المعزولة من المرضى في احدى مستشفيات اثيوبيا (Taddesse et al.,2014).

تتلخص الية عمل الفانكوميسين بارتباطه الى النهاية الكربوكسيلية للثمالة D- ALa -D-Ala للبيتيد الخماسي (Pentapeptide) مما يؤدي الى تثبيط تكوين الجسر العرضي (Cross bridge) بين البيتيد الخماسي (Hu et al.,2016).

كان الفانكوميسين هو الدواء الرئيسي المستخدم لعلاج المكورات العنقودية المقاومة للميثيسيلين ، ولكن استعادة العزلات ذات المقاومة المتوسطة والتقارير عن العديد من حالات المقاومة عالية المستوى للفانكوميسين حفزت البحث عن عوامل أحدث (brooks., 2009).

اما مضاد Tetracycline وينتمي الى مجموعة Glycylcyclines. وعلى الرغم من ان الية عمله مشابهة لآلية عمل Tetracycline وهي تثبيط بناء البروتين في الخلية البكتيرية من خلال الارتباط مع tRNA في الموقع A للرايبوسوم الا انه يمتاز بتجاوزه لكل اليات المقاومة المذكورة سابقا والتي تقاوم بها البكتريا مضادات Tetracyclines مما يعزز من فعاليته لعلاج أنواع مختلفة من الإصابات البكتيرية (Schedlbauer et al.,2015).

3-4-3 تحديد التراكيز المثبطة لمستخلص نبات *Physalis angulata isolate AH-ZE1* ضد بكتريا المكورات العنقودية

تم تحديد فعالية مستخلص نبات *Physalis* ضد بكتريا المكورات العنقودية باستخدام تراكيز مختلفة (25، 20، 15، 10، 5) ملغم / مل من خلال طريقة النشر على وسط الاكار. تم استخدام المضادات الحيوية (Cefotaxin و Neomycin و Doxycycline) كمضادات قياسية لغرض المقارنة.

وتم مقارنة النتائج اعتمادا على NCLS في سنة 2020 .

اظهرت نتائج الدراسة الحالية (الجدول 3-7) عند استخدام النبات بتركيز 25 ملغم/مل كان اكثر كفاءة في التثبيط المكورات العنقودية غير منتجة لأنزيم التجلط اذ بلغ معدل التركيز المثبط الادنى (22.43 ± 1.24) ملم مقارنة مع معدل وانحراف قياسي لمستعمرة المكورات العنقودية موجبة انزيم التجلط (18.34 ± 1.24) بمستوى معنوية ($P < 0.05$)، من جانب اخر ظهر افضل تركيز مثبط ادنى عند استخدام المضاد الحياتي دوكسي سايكلين اذ وصل الى 1.88 ± 42.47 ملم و 1.76 ± 42.6 لكلا من المستعمرات العنقودية الموجبة والسالبة لأنزيم التجلط على التوالي مع عدم وجود فروقات معنوية بين مضادات الحيائية.

الجدول 3-7 الفعالية التثيضية لمستخلص نبات *Physalis angulata* AH-ZE1 ضد بكتريا المكورات

العنقودية

قطر التثبيط (ملم) باستخدام 25 ملغم/مل					المكورات العنقودية
جنتاميسين	نيومايسين	دوكسي	سيفالين	<i>Physalis</i>	
41 ± 1.65	38.27 ± 1.22	42.47 ± 1.88	31.13 ± 1.25	18.34 ± 1.24	معدل وانحراف قياسي لمستعمرة <i>Co+ S.aureus</i>
40.67 ± 1.4	38.07 ± 0.96	42.6 ± 1.76	31.33 ± 0.9	22.43 ± 1.24	معدل وانحراف قياسي لمستعمرة <i>Co- S.aureus</i>
0.85	0.69	0.48	0.57	0.043	التحليل الاحصائي

اظهرت نتائج الدراسة الحالية عند استخدام النبات بتركيز 20 ملغم/مل كان كفاءة في التثبيط مع المكورات العنقودية غير منتجة لأنزيم التجلط اذ اظهر التركيز المثبط الادنى بمعدل وانحراف قياسي (19.93 ± 0.8) ملم مقارنة مع معدل وانحراف قياسي لمستعمرة المكورات العنقودية موجبة انزيم التجلط (15 ± 0.93) بمستوى معنوية ($P < 0.05$)، من جانب اخر ظهر اقل تركيز مثبط ادنى عند استخدام المضاد الحياتي Cephalexin حيث وصل الى 28.1 ± 1.73 ملم و 1.62 ± 27.73 لكل من المستعمرات العنقودية موجبة وسالبة انزيم التجلط على التوالي مع عدم وجود فروقات معنوية بين المضادات الحياة عند مستوى معنوية ($P < 0.05$).

الجدول 3-8 معدل تأثير مستخلص أوراق نبات *Physalis angulata* isolate AH-ZE1 في تثبيط بكتريا المكورات العنقودية

قطر التثبيط (ملم) عند استخدام التركيز 20 ملغم/مل					المكورات العنقودية
جنتاميسين	نيومايسن	دوكسي	سيفالين	<i>Physalis</i>	
38± 2.41	34.19± 2.45	36.67± 1.23	28.1± 1.73	15± 0.93	معدل وانحراف قياسي لمستعمرة <i>S.aureus</i> Co+
39.84± 1.79	34.27± 1.18	36.6± 1.18	27.73± 1.62	19.93± 0.8	معدل وانحراف قياسي لمستعمرة <i>S.aureus</i> Co-
0.39	0.44	0.59	0.66	0.032	التحليل الاحصائي

اما بتركيز 15 ملغم/مل كان التركيز المثبط الادنى للمكورات العنقودية غير منتجة لأنزيم التجلط بمعدل (14.73±0.36) ملم مقارنة مع معدل وانحراف قياسي لمستعمرة المكورات العنقودية موجبة انزيم التجلط (0.49±12.33) بمستوى معنوية (P< 0.05)، من جانب اخر اظهر افضل تركيز مثبط ادنى عند استخدام المضاد الحياتي دوكسي سايكلين اذ وصل الى 35.15 ±2.57 ملم و 35.87 ± 2.48 لكل من المستعمرات العنقودية موجبة وسالبة انزيم التجلط على التوالي مع عدم وجود فروقات معنوية بين المضادات الحياتية.

الجدول 3-9 الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات *Physalis angulata* AH-ZE1 في تثبيط بكتريا المكورات العنقودية

قطر التثبيط (ملم) باستخدام التركيز 15 ملغم/مل					المكورات العنقودية
جنتاميسين	نيومايسن	دوكسي	سيفالين	<i>Physalis</i>	
36± 2.26	31.18± 2.46	35.15± 2.57	20.53± 0.99	12.33± 0.49	معدل وانحراف قياسي لمستعمرة Co+ S.aureus
38.54± 2.19	30.77± 1.48	35.87± 2.48	19.87± 0.91	14.73± 0.36	معدل وانحراف قياسي لمستعمرة Co+S.aureus
0.63	0.52	0.33	0.74	0.059	التحليل الاحصائي
قطر التثبيط (ملم) باستخدام التركيز 10 ملغم/مل					معدل وانحراف قياسي لمستعمرة Co+ S.aureus
25.11± 0.26	26.73± 0.19	24.05± 1.25	13.46±1.56	11.26± 0.92	
30.24± 1.04	30.56± 0.54	31.67± 1.05	17.48±1.94	15.63± 0.45	معدل وانحراف قياسي لمستعمرة Co- S.aureus
0.044	0.033	0.025	0.032	0.041	التحليل الاحصائي
قطر التثبيط (ملم) باستخدام التركيز 5 ملغم/مل					معدل وانحراف قياسي لمستعمرة Co+ S.aureus
26.37± 0.64	25.49± 1.07	26.12± 0.47	11.14± 0.08	11.14± 0.08	
30.47± 0.94	29.17± 1.01	30.19± 1.12	15.92± 1.27	15.19± 1.27	معدل وانحراف قياسي لمستعمرة Co- S.aureus
0.026	0.042	0.033	0.011	0.037	التحليل الاحصائي

تتضح من النتائج أعلاه الطريقة التي اتبعت بقياس قيم MIC أن المكورات العنقودية كانت أكثر حساسة ضد تركيزي (25 و 20) ملغم/مل من المستخلص النباتي لنبات *Physalis angulata* AH-ZE1 وهذا يتفق مع ما حصل عليه (Osho et al., 2010). يعود نشاط المضاد لمستخلص *Physalis angulata* AH-ZE1

ضد البكتيريا العنقودية السالبة وموجبة انزيم التجلط الى مركبات كيميائية ذات خصائص مضادة للجراثيم مثل مركبات الفلافونويد والفينول والتانينات مما قد يفسر تثبيط نمو البكتيريا. اذ تُعزى آليات عمل المركبات الفينولية على الخلايا البكتيرية إلى تلف جزئي للغشاء البكتيري، وتثبيط عوامل الفوعة مثل الإنزيمات والسموم، وقمع تكوين الأغشية الحيوية البكتيرية كما تمنع نمو الميكروبات عن طريق تغيير طبيعة البروتينات وتعطيل الأغشية. اما مركبات الفلافونويد فتكون فعالة ضد العديد من انواع البكتيريا لأنها يمكن أن تشكل بروتينات معقدة قابلة للذوبان. خارج الخلية وفي جدران الخلايا البكتيرية. (Maria et al., 2018) و (Patricio et al., 2021)

4-4-3 التعبير عن جين coagulase في *Staphylococcus aureus*

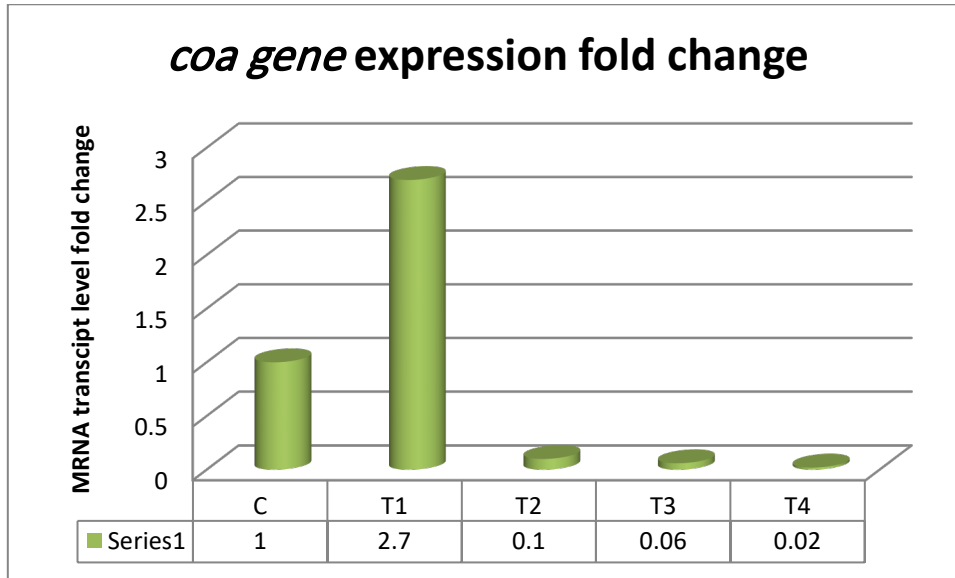
تم استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل R T – PCR للكشف عن مستوى التعبير الجيني لجين coa المسؤول عن إنتاج انزيم التخثر (Coagulase) في عزلات البكتريا المكورات العنقودية المعزولة سريريا *Staphylococcus aureus* وتم الاعتماد على طريقة التعبير الكمي النسبي اذ يتم تقديم البيانات بالنسبة للجين المرجعي اذ يتم التعبير عن الجينات المرجعية في الكائن الحي في ظل الظروف المرضية والطبيعية ولمقارنة مستويات النسخ ل RNA تمت المقارنة بين قيم حد العتبة للجين المدروس (ct) و هي عدد الدورات اللازمة لانبعث التآلق الفلورسنت) باستخدام طريقة (ct $\Delta\Delta$ -2) المعتمدة على عملية التصحيح Normalization في كل معاملات الدراسة ومجموعة السيطرة لإتمام عملية التصحيح في التعبير الجيني بينت نتائج دراسة التعبير الجيني لجين coa وجود فروقات معنوية وواضحة في مستويات التعبير الجيني في عزلت المعاملات ومجموعة السيطرة ، حيث بينت نتائج التعبير الجيني انخفاض واضح في المعاملة الثانية T2 ذي تركيز 50% من المستخلص الكحولي *Physalis angulata* انخفاض بمقدار 0.10 downregulation في التعبير الجيني وايضا الثالثة T3 ذي تركيز 75% من المستخلص الكحولي لنبات *Physalis angulata* انخفاض بمقدار 0.06 downregulation في التعبير الجيني كما نلاحظ انخفاض كبير بمقدار 0.02 downregulation في التعبير الجيني للمعاملة الرابعة T4 ذي تركيز 100% من المستخلص الكحولي لنبات *Physalis angulata* عند مقارنتهم مع معاملة الاولى ذي تركيز 25% اذ سجلت مستوى التعبير الجيني بمقدار 2.70 وعند مقارنتهم مع التعبير الجيني لمجموعة السيطرة التي تعادل تعبيراً جينياً بمقدار 1 (fold change) حسب طريقة Livak وكما موضح في الجدول (3-10).

الجدول 10-3 التعبير الجيني لجين (Coa) باستخدام طريقة (Livak methods) لبكتريا المكورات العنقودية

عند استخدام المستخلص الكحولي *Physalis angulata* isolate AH-ZE1

Group	No. sample	CT (coa)	CT (16srRNA)	ΔCT Test	ΔCT Control	ΔΔCT	Fold change (2 ^{-ΔΔCT})	Mean	S.D.
	1	34.27	34.28	0.01	-0.85	0.86	0.551		
	2	22.56	26.24	-3.68	-0.85	-2.83	7.111		
	3	36.58	31.63	4.95	-0.85	5.8	0.018		
	4	26.78	30.09	-3.26	-0.85	-2.41	5.314		
	5	32.10	32.76	-0.66	-0.85	0.19	0.877	2.70	2.70±. 2.547
T1 25%	6	28.30	31.50	-3.21	-0.85	-2.36	5.134		
	7	28.10	31.06	-2.96	-0.85	-2.11	4.20		
	8	37.38	32.53	4.95	-0.85	5.8	0.018		
	9	32.12	31.08	-1.4	-0.85	-0.55	1.464		
	10	28.70	30.08	-2.1	-0.85	-1.25	2.378		
	1	29.05	28.16	0.89	-0.85	1.74	0.299		
	2	26.25	27.45	1.20	-0.85	2.05	0.24		
	3	34.84	31.4	3.44	-0.85	4.29	0.051		
	4	26.87	28.29	1.58	-0.85	2.43	0.186		
	5	32.58	3.33	2.03	-0.85	2.88	0.136	0.10	0.107± 0.10
T2 50%	6	35.55	30.50	5.05	-0.85	5.9	0.017		
	7	33.76	29.45	4.31	-0.85	5.16	0.023		
	8	38.70	32.37	6.33	-0.85	7.18	0.007		
	9	35.83	29.91	4.29	-0.85	5.99	0.029		
	10	34.71	29.34	5.37	-0.85	6.22	0.013		
	1	31.42	29.16	2.26	-0.85	3.11	0.115		
	2	32.59	29.83	2.76	-0.85	3.61	0.080		
	3	36.30	31.27	5.29	-0.85	6.14	0.014		
	4	33.45	28.46	5.03	-0.85	5.88	0.017		
	5	32.01	29.20	2.81	-0.85	3.66	0.079	0.060	0.488±0.060
T3 75%	6	32.94	28.31	4.63	-0.85	5.48	0.029		
	7	38.32	32.42	5.90	-0.85	6.75	0.009		
	8	34.59	30.34	4.25	-0.85	5.1	0.029		
	9	31.63	29.78	1.85	-0.85	2.70	0.153		
	10	32.55	29.83	2.72	-0.85	3.57	0.084		
	1	37.67	27.97	9.79	-0.85	10.64	0.001		
	2	34.23	30.80	3.36	-0.85	4.21	0.054		
	3	31.02	27.68	3.34	-0.85	4.19	0.055		
	4	33.50	30.33	3.17	-0.85	4.02	0.062		
	5	32.62	27.46	5.16	-0.85	6.01	0.016		
T4 100%	6	35.32	27.87	7.45	-0.85	8.30	0.003	0.023	0.0231±0.02
	7	36.51	30.21	6.30	-0.85	7.15	0.007		
	8	35.43	30.56	4.87	-0.85	5.72	0.019		
	9	34.02	28.82	5.20	-0.85	6.05	0.015		
	10	36.07	28.70	7.37	-0.85	8.22	0.015		
Control mean	C	28.54	29.39	-0.85	-0.85	0	1	1	

وهذا المستوى يدل على ان هناك فروقات معنوية في التعبير الجيني بين المجاميع وبالمقارنة مع مجموعة السيطرة واطهر الشكل البياني (3-22) للتعبير الجيني النسبي لجين coa وجود فرق معنوي بين معاملات التجربة (T1, T2, T3 and T4) ومجموعة السيطرة عند مستوى احتمالية $p < 0.05$



الشكل 22-3 التعبير الجيني العالي والمنخفض لجين coa العائد لبكتريا لـ للمكورات العنقودية عند استخدام

المستخلص الكحولي *Physalis angulata* isolate AH-ZE1

ان تركيز 50% ، 75% و 100% من محلول من المستخلص الكحولي لـ *Physalis angulata* يوثر بشكل سلبي (تقليل تركيز الـ RNA) على مستوى التعبير الجيني وبهذا يوثر على تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *Staphylococcus aureus* مما يؤدي الى تقليل نمو البكتريا ، في حين ان تركيز 25% من المستخلص اظهر تأثيرا واضحا على زيادة مستوى التعبير الجيني لجين Coa (زيادة في تركيز الـ RNA) فهو يدل على نشاط وفعالية هذا الجين في تنشيط وادامة الغشاء الحيوية مما يؤدي الى زيادة نمو البكتريا المرضية . وكذلك اشارت الدراسة الحالية ونتائج التعبير الجيني الى انه كلما زاد التركيز المستخلص (50،75 و 100) لكل من المعاملة (T2, T3 and T4) على التوالي، انخفض التعبير الجيني لجين Coa لبكتريا *Staphylococcus aureus* مما يدل على كفاءة مستخلص الكحولي *Physalis angulata* ذي تركيز (50،75 و 100) % كمضاد للغشاء الحيوي Anti-biofilm formation وتوافق هذه النتائج مع ما اوضحه (Favian et al (2020) الذي أشار الى فعالية المستخلص *Physalis* كمضاد للغشاء الحيوي.

ان ميكانيكية التثبيط غير معروفة في تثبيط فعالية تكوين الغشاء الحيوي فقد اشارت بعض الدراسات (Sahu, et al., (2019) الى استخدام المستخلص كمثبط للبروتين والانزيمات وان احتواء المستخلص لنبات *Physalis* على بعض المواد الفينولية والقلوية ومركبات التانينات يمكن ان تغير من الشحنة في السطح ومن ثم تتفاعل مع مكونات الخلية وتتفاعل مع عملية تكوين الغشاء (Mostafa, et al., 2018).

اذ تعمل التانينات على تثبيط الانزيمات والبروتينات الموجودة في غشاء الخلية تقلل من قابلية الخلية الميكروبية على الالتصاق وتعمل ايضاً على تكوين معقدات مع السكريات المتعددة ، من ناحية اخرى فأن للفينولات المتوافرة لمستخلص نبات *Physalis* اثرا في تثبيط الانزيمات بوصفها مركبات مؤكسدة ، ومن المحتمل انها تتفاعل مع مجموعة الفوسفوليبيد الموجودة في جدار الخلية ، إذ تؤثر بشكل كبير في تغيير طبيعة البروتينات والاضرار بالأغشية من خلال ارتباطها بالمواقع الفعالة للأنزيمات الخلوية و التفاعلات الايضية الضرورية التي تسيطر عليها تلك الانزيمات

الاستنتاجات والتوصيات

**Conclusions &
Recommendations**

4 - الاستنتاجات والتوصيات

1-4 الاستنتاجات

- 1- كفاءة الطرائق الجزيئية في تشخيص الأنواع المختلفة لنبات *Physalis*.
- 2- يعد نبات *Physalis* غنياً بالمواد الفعالة بايولوجياً ذات الأهمية الطبية والعلاجية بالإضافة إلى القيمة الغذائية
- 3- كفاءة الاستخلاص الكحولي لأوراق نبات *Physalis angulata* يمتلك بالنظر لإعطائها حصيلة جيدة
- 4- يمكن الاعتماد على نتائج تفاعل RT-PCR في تأكيد فعالية المستخلصات النباتية في تثبيط تكوين الأغشية الحيوية.

2-4 التوصيات

- 1- الاعتماد على تسلسلات جينوم البلاستيدات الخضراء بالكامل في التشخيص الجزيئي للنباتات لكنه متاحا ويعطي تشخيصا موثوقا به.
- 2- اجراء دراسة لتنقية المركبات الفعالة من نبات *Physalis angulata* مثل الفيولولات التي يعود لها تأثير التثبيطي على البكتريا والبحث في آلية للتفاعل مع المضادات الحيوية.
- 3- دراسة الفعالية التثبيطية التأزرية للمستخلص الفيولي مع المركبات النانوية كمضاد للبكتريا والفطريات.
- 4- دراسة تأثير مستخلصات *Physalis spp* على التعبير الجيني لعدد من الجينات وفي انواع اخرى من البكتريا والفطريات.
- 5- الاهتمام بزراعة هذا الانواع قيد الدراسة بشكل اوسع لما لها اهمية طبية وغذائية كبيرة.

المصادر العربية

تركي، وآخرون. (2019). كتاب تحضير المستخلصات النباتية، دار المسيرة للنشر والتوزيع، عدد الصفحات 250.

المصادر الانكليزية

- Abd-ELmageed**, S. M., Abushady, H. M., & Amin, A. A. (2019). Antibacterial and antioxidant activities of *Physalis peruviana* and *Hyphaene thebaica* extracts. African Journal of Biological Sciences, 15(1), 73-86.
- Abo Baker**, E. A., & El-Beltagi, H. S. (2010). Constituents of apple, parsley and lentil edible plants and their therapy treatments for blood picture as well as liver and kidneys function against lipidemic disease. EJEAFChe, 9(6), 1117-1127.
- AFAQ**, N.(2017). Screening And Molecular Characterization Of VRSA And Visa Among The MRSA Isolates From The Purified Compounds Of Cannabis Sativa L And Allium Sativum L.
- Agricola**, E., Bove, T., Oppizzi, M., Marino, G., Zangrillo, A., Margonato, A. and Picano, E., 2005. "Ultrasound comet-tail images": a marker of pulmonary edema: a comparative study with wedge pressure and extravascular lung water. Chest, 127(5), pp.1690-1695.
- Agronet**. (2019). Producción nacional por producto: Uchuva. In: https://www.agronet.gov.co/Documents/39-UCHUVA_2017.pdf; consulted: November, 2019
- Akbaba**, U. (2019). Elements identification in golden strawberries (*Physalis peruviana* L.) using wavelength dispersive X-Ray fluorescence. Turk. J. Agric. Food Sci. Technol. 7(6), 851-855. Doi: 10.24925/turjaf.v7i6.851-855.2386
- Allard**, J.P. (2001). Oxidative stress and infection. In: Micronutrients and HIV. Infection, Fris, H. (ed.). CRC press LLG, Boca Raton, FL.

- Al-Naqshbandi**, A. A.; Hassan, H. A.; Chawsheen, M. A.; & Abdul Qader, H. H. (2021). Categorization of bacterial pathogens present in infected wounds and their antibiotic resistance profile recovered from patients attending Rizgary hospital-Arbil. ARO- The Scientific Journal of Koya University, 9(2), 64-70.
- Al-Shuneigat**, J., Al-Sarayreh, S., Al-Sarairah, Y., & Al-Qudah, M. (2020). Effect of *Achillea santolina* essential oil on bacterial biofilm and its mode of action. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci*, 33, 83-89.
- Al-Ugaili**, D. (2013). Bacteriological and Genetic Studies on Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Some Hospital in Baghdad City (Doctoral dissertation, Ministry of Higher Education).
- Amiteye**, S., 2021. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7(10).
- Asperger**, H. and Zangerl, P. (2003). *Staphylococcus aureus*. In: Roginski H, Fuquay J, Fox P, editors. *Encyclopedia of Dairy Science*. San Diego: Academic Press pp. 2563-2569.
- Assaf**, D., Gutman, Y.A., Neuman, Y., Segal, G., Amit, S., Gefen-Halevi, S., Shilo, N., Epstein, A., Mor-Cohen, R., Biber, A. and Rahav, G., 2020. Utilization of machine-learning models to accurately predict the risk for critical COVID-19. *Internal and emergency medicine*, 15, pp.1435-1443.
- Atlas**, R. M. (2006). *The handbook of microbiological media for the examination of food*. CRC press.
- Atlas**, R. M. (2010). *Handbook of microbiological media*. CRC press.
- Baird-Parker**, A. (1990) *The Staphylococci: an introduction*. *J. appl. bacteriol. symp. suppl.* 1S-8S.

- Baird-Parker, T.** (2000). *Staphylococcus aureus*. In: Lund B, Baird- Parker T, Gould G, editors. The Microbiological Safety and Quality of Food. Gaithersburg: Aspen Publishers. pp. 1317-1330.
- Ballesteros-Vivas, D., Álvarez-Rivera, G., del Pilar Sánchez-Camargo, A., Ibáñez, E., Parada-Alfonso, F., & Cifuentes, A.** (2019). A multi-analytical platform based on pressurized-liquid extraction, in vitro assays and liquid chromatography/gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for food by-products valorisation. Part 1: withanolides-rich fractions from goldenberry (*Physalis peruviana* L.) calyces obtained after extraction optimization as case study. *Journal of Chromatography A*, 1584, 155-164.
- Bazalar Pereda, M.S., Nazareno, M.A. and Viturro, C.I.,** 2019. Nutritional and antioxidant properties of *Physalis peruviana* L. fruits from the Argentinean northern Andean region. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(1), pp.68-75.
- Besse, P., Da Silva, D., and Grisoni, M.** (2021). Plant DNA barcoding principles and limits: A case study in the genus *Vanilla*. *Methods Mol. Biol.* 2222, 131–148. doi: 10.1007/978-1-0716-0997-2_8
- Bonko, M. D. A.; Lompo, P.; Tahita, M. C.; Kiemde, F.; Karama, I.; Some, A. M.; ... & DFH Schallig, H.** (2021). Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* Isolates from the Nasopharynx of Febrile Children under 5 Years in Nanoro, Burkina Faso. *Antibiotics*, 10(4), 444.
- Bowen, D.K., Dielubanza, E. and Schaeffer, A.J.,** 2015. Chronic bacterial prostatitis and chronic pelvic pain syndrome. *BMJ clinical evidence*, 2015.

- Bremer, K., Friis, E. and Bremer, B., 2004.** Molecular phylogenetic dating of asterid flowering plants shows early Cretaceous diversification. *Systematic Biology*, 53(3), pp.496-505.
- Broni, E., Kwofie, S. K., Asiedu, S. O., Miller III, W. A., & Wilson, M. D. (2021).** A molecular modeling approach to identify potential antileishmanial compounds against the cell division cycle (Cdc)-2-related kinase 12 (crk12) receptor of leishmania donovani. *Biomolecules*, 11(3), 458.
- Brook, I. (2009).** Role of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in head and neck infections. *The Journal of Laryngology & Otology*, 123(12), 1301-1307.
- Brooks, G. F., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2007).** The staphylococci. Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology. 24th ed. New York; McGraw-Hill.
- Buis, D. T. P.; Sieswerda, E.; Kouijzer, I. J. E.; Huynh, W. Y.; Burchell, G. L.; Berrevoets, M. A. H.; ... & Sigaloff, K. C. E. (2022).** [18F] FDG-PET/CT in *Staphylococcus aureus* bacteremia: a systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 1-10.
- Bulter, B.L., 1977.** Common sense applications of solar energy in the home (No. SAND76-0685). Sandia National Lab.(SNL-NM), Albuquerque, NM (United States).
- Byarugaba, D. K. (2010).** Mechanisms of antimicrobial resistance. In *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*(pp. 15-26). Springer, New York, NY.
- Cahyaningsih, R., Compton, L. J., Rahayu, S., Magos, J. & Maxted, N. (2022).** DNA Barcoding medicinal plant species from Indonesia. *Plants* 11, 1375. doi: 10.3390/plants11101375

- Chakraborty, S. P., Mahapatra, S. K., & Roy, S. (2011).** Biochemical characters and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(3), 212-216.
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020).** Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial cell factories*, 19, 1-42.
- Chang, J. C., Lin, C. C., Wu, S. J., Lin, D. L., Wang, S. S., Miaw, C. L., & Ng, L. T. (2008).** Antioxidative and hepatoprotective effects of *Physalis peruviana* extract against acetaminophen-induced liver injury in rats. *Pharmaceutical biology*, 46(10-11), 724-731.
- Chesbrough, H., 2006.** Open innovation: a new paradigm for understanding industrial innovation. *Open innovation: Researching a new paradigm*, 400, pp.0-19.
- Choi, J. H.; Seo, H. S.; Lim, S. Y.; & Park, K. (2014).** Cutaneous immune defenses against *Staphylococcus* infections. *Journal of Lifestyle Medicine*, 4(1), 39.
- Colaninno, N., 2008.** Modelli di urbanizzazione costiera: morfologia e complessità strutturale, a scala urbana e territoriale, nella Regione Metropolitana di Barcellona (Master's thesis, Universitat Politècnica de Catalunya).
- Collee, J. G., Mackie, T. J., & McCartney, J. E. (1996).** Mackie & McCartney practical medical microbiology. Harcourt Health Sciences.
- Costello, M.C. (2010).** Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping of Community Acquired Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus*, including the subtyping of PVL toxin producers using Real-Time PCR. MSc thesis. the Queensland University of Technology.

- Crossely, K.B. and Archer, G.L. (1997).** The Staphylococci in human disease, Churchill Livingstone.
- de Araujo, G. L., Coelho, L. R., de Carvalho, C. B., Maciel, R. M., Coronado, A. Z., Rozenbaum, R., ... & Teixeira, L. A. (2006).** Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 57(5), 855-864.
- Deanna, R., Larter, M.D., Barboza, G.E. and Smith, S.D., 2019.** Repeated evolution of a morphological novelty: a phylogenetic analysis of the inflated fruiting calyx in the Physalideae tribe (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 106(2), pp.270-279.
- Deepinder, F., Makker, K. and Agarwal, A., 2007.** Cell phones and male infertility: dissecting the relationship. *Reproductive biomedicine online*, 15(3), pp.266-270.
- Demer, L. L., & Tintut, Y. (2014).** Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 34(4), 715-723.
- Dobrogojski, J., Spsychalski, M., Luciński, R. and Borek, S., 2018.** Transgenic plants as a source of polyhydroxyalkanoates. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, pp.1-17.
- Dong B., An L., Yang X., Zhang X., Zhang J., Tuerhong M., Jin D.-Q., Ohizumi Y., Lee D., Xu J.(2019).** Withanolides from *Physalis peruviana* showing nitric oxide inhibitory effects and affinities with iNOS. *J. Bioorganic Chem.* ;87:585–593.
- Dong, S.; Zhang, S.; Zhang, L.; Wu, H.; Goffinet, B.; Liu, Y.(2021).** Plastid genomes and phylogenomics of liverworts (Marchantiophyta):

- Conserved genome structure but highest relative plastid substitution rate in land plants. *Mol. Phylogenet. Evol* , 161, 107-171.
- Eisenhauer**, B., Natoli, S., Liew, G., & Flood, V. M. (2017). Lutein and zeaxanthin—Food sources, bioavailability and dietary variety in age-related macular degeneration protection. *Nutrients*, 9(2), 120.
- El-Beltagi**, H. S., Mohamed, H. I., Safwat, G., Gamal, M., & Megahed, B. M. (2019). Chemical composition and biological activity of *Physalis peruviana* L. *J.Gesunde Pflanzen*, 71(2), 113-122.
- Favian** Bayas-Morejon, Angelica Tigre-Leon, Marcelo Tapia-Verdezoto, Fabian Flores-Ribadeneira .(2020). Antibacterial Activity Of Golden Berry (*Physalis Peruviana*) Extract Against *Escherichia Colispp.* Isolates From Meats In Ecuador . *J. Current Pharmaceutical Research*. Vol 12, (2) : 115-118
- Feng** S, Jiang M, Shi Y, Jiao K, Shen C, Lu J, Ying Q and Wang H (2016) Application of the Ribosomal DNA ITS2 Region of *Physalis* (Solanaceae): DNA Barcoding and Phylogenetic Study. *Front. Plant Sci.* 7:1047. doi: 10.3389/fpls.2016.01047
- Feng** S, Zheng K, Jiao K, Cai Y, Chen C, Mao Y, Wang L, Zhan X, Ying Q, & Wang H. (2020) Complete chloroplast genomes of four *Physalis* species (Solanaceae): Lights into genome structure, comparative analysis, and phylogenetic relationships. *J. BMC Plant Biology* 20(1): 1–14.
- Feng**, S.; Jiao, K.; Zhu, Y.; Wang, H.; Jiang, M.; Wang, H. (2018).Molecular identification of species of *Physalis* (Solanaceae) using a candidate DNA barcode: The chloroplast psbA-trnH intergenic region. *J. Genome*, 61, 15–20.

- Firew, A. H., Israel, P., & Abdurezak, M. (2020).** Extraction and Phytochemicals Determination of Traditional Medicinal Plants for Anti-microbial Susceptibility Test. *Health Sciences*, 1(1), 37.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2007).** Diagnostic microbiology (pp. 288-302). St Louis: Mosby.
- Foster, T. (1996).** Staphylococcus., in: Baron (Ed.), *Medical Microbiology*, University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas. (citted from Costa et al., (2013).
- Fritz, R.B., Skeen, M.J., Chou, C.H., Garcia, M. and Egorov, I.K., 1985.** Major histocompatibility complex-linked control of the murine immune response to myelin basic protein. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 134(4), pp.2328-2332.
- Gajdács, M.; & Albericio, F. (2019).** Antibiotic resistance: from the bench to patients. *Antibiotics*, 8(3), 129.
- Gentilini, E.; Denamiel, G.; Llorente, P.; Godaly, S.; Rebuelto, M.; & DeGregorio, O. (2000).** Antimicrobial susceptibility *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of dairy science*, 83(6), 1224-1227.
- Ghoniem, E. M.; El Hendawy, G. R.; Moteleb, T. M. A.; Hassan, H. A.; & Khalil, H. A. E. R. (2014).** Characterization of vancomycin- resistant *Staphylococcus aureus* in the National Liver Institute. *Menoufia Medical Journal*, 27(4), 825.
- Gu, C.; Howell, K.; Frank, R.; Dunshea, F.R.; Suleria, H.A.R. 2019.** LC-ESI-QTOF/MS characterisation of phenolic acids and flavonoids in polyphenol-rich fruits and vegetables and their potential antioxidant activities. *J. Antioxidants* , 8, 405.
- Guo, Y.Y.; Yang, J.X.; Li, H.K.; & Zhao, H.S. (2021).** Chloroplast genomes of two species of *Cypripedium*: Expanded genome size and

- proliferation of AT-biased repeat sequences. *Front. Plant. Sci*, 12, 609729.
- Hall, C.** (2001). Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In: Pokorny J., Yanishlieva, N., Gordon, M., editors. *Antioxidants in food: practical applications*. Cambridge Cambridge England: Woodhead Publishing Limited. P 159-209.
- Harborne, J.B.** and Harborne, J.B., 1973. Phenolic compounds. *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, pp.33-88.
- Hariharan.**(2020). *Staphylococcus* Evaluation of anti-methicillin resistant of selected *aureus* (MRSA) activity of phytochemicals and other beneficial microorganisms, microbiology division csir - central leather research institute adyar, chennai - 600 020 India November 2020.
- Hasan, R.; Acharjee, M.; & Noor, R.** (2016). Prevalence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolated from burn wound infections. *Tzu Chi Medical Journal*, 28(2), 49-53.
- Hirvonen, J.J.** and Kaukoranta, S. (2013). GenomEra MRSA/SA, a fully automated homogeneous PCR assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and the marker of methicillin resistance in various sample matrixes. Department of Clinical Microbiology, 2-4 B2, FI-65130 Vaasa, Finland.ISSN 1473- 7159.
- Hoda S.; Gupta L.; Agarwal H.; Raj G.; Vermani M.; Vijayaraghavan P.**(2019)Inhibition of *Aspergillus fumigatus* biofilm and cytotoxicity study of natural compound cis-9-hexadecenal.*J. Pure Appl. Microbiol.* , 13, 1207–1216.

- Hu, Q.;** Peng, H.; & Rao, X. (2016). Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology*, 7, 1601.
- Irish, S.R.,** Kyalo, D., Snow, R.W. and Coetzee, M., 2020. Updated list of Anopheles species (Diptera: Culicidae) by country in the Afrotropical Region and associated islands. *Zootaxa*, 4747(3), pp.zootaxa-4747.
- Ivanova, T.,** Popova, V., Mazova, N., Stoyanova, A., & Damyanova, S. (2019). Extracts from *physalis* leaves (*Physalis peruviana* L.) for prospective application in medicine and cosmetics. *J. Ukrainian food* , (8, Issue 1), 34-44.
- Jakobek, L., & Blesso, C. (2023).** Beneficial effects of phenolic compounds: native phenolic compounds vs metabolites and catabolites. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-19.
- Jaloot, A.S.,** Owaid, M.N., Naeem, G.A. and Muslim, R.F., 2020. Mycosynthesizing and characterizing silver nanoparticles from the mushroom *Inonotus hispidus* (Hymenochaetaceae), and their antibacterial and antifungal activities. *Environmental nanotechnology, monitoring & management*, 14, p.100313.
- Jay, J. (2000).** Staphylococcal gastroenteritis. In: Jay J, editor. *Modern Food Microbiology*. Gaithersburg: Aspen Publishers. pp. 441-459.
- Jayachithra Ramakrishna Pillai, Adil Farooq Wali, Godfred Antony Menezes, Muneeb U. Rehman, Tanveer A. Wani, Azher Arafah, Seema Zargar, and Tahir Maqbool Mir . (2022)** Chemical Composition Analysis, Cytotoxic, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Physalis angulata* L.: A Comparative Study of Leaves and Fruit. *j. Molecules*. 27(5): 1480.

- Jiang**, Y. and Jiang, Z.P., 2017. Robust adaptive dynamic programming. John Wiley & Sons.
- Jyothibas**, T., & Ramana, K. V. (2015). Pharmacological review on *Physalis* species: a potential herbal cure-all. World J. Pharmaceutical Research, 4(2), 247-256.
- Kang**, Y., Eo, H. J., Park, Y., & Park, G. H. (2021). Extract from the branches of *Rhamnus yoshinoi* exerts anti-cancer effects on human prostate cancer cells through Wnt/ β -catenin proteasomal degradation and identification of compounds by GC/MS. J. Plant Biotechnology, 48(2), 106-114.
- Kasali**, F. M., Tusiimire, J., Kadima, J. N., Tolo, C. U., Weisheit, A., & Agaba, A. G. (2021). Ethnotherapeutic uses and phytochemical composition of *Physalis peruviana* L.: an overview. J.The Scientific World Journal, 2021.
- Katoh**, K. and Toh, H., 2010. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. Bioinformatics, 26(15), pp.1899-1900.
- Katz**, M., 2010. Capturing sound: How technology has changed music. Univ of California Press.
- Kim**, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B.A., Thiessen, P.A., Yu, B. and Zaslavsky, L., 2019. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. Nucleic acids research, 47(D1), pp.D1102-D1109.
- Kloos** W.E. and Schleifer, K.H. (1986). Genus IV-Staphylococcus., in :Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; and Sharpe, M.E. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2. Williams and Wilkins, Baltimore..(citted from Costa et al., 2013).

- Kloos**, W.E. and **Bannerman**,T.L..(1994).Update on clinical significance of coagulase-negative Staphylococci *Clinical Microbiology Reviews* 7[1], 117-140.
- Kloos**, W.E. and **Lambe**, D.W.J. (1991). *Staphylococcus.*, in: **Barlows A**, **Hausler WJ**, **Hermann KL**, **Isenberg HD**, and **Shadomy HJ** (Eds.),*Manual of clinical Microbiology*, ASM, Washington D.C., pp.222-237. (citted from **Costa et al.**,2013).
- Kobayashi**, S. D.; **Malachowa**, N.; & **DeLeo**, F. R. (2015). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. *The American journal of pathology*, 185(6), 1518-1527.
- Kobeasy**, M. I., **El-Beltagi**, H. S., **El-Shazly**, M. A., & **Khattab**, E. A. (2011). Induction of resistance in *Arachis hypogaea* L. against Peanut mottle virus by nitric oxide and salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(2), 112-118.
- Kumar**, S.; & **Varela**, M.F. (2013). Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.).
- Lamyaa M. Sayed**. 2017. Utilization Of Internal Transcribed Spacer (Its) As A Molecular Marker For Phylogenetic Relationship Of Solanaceae Family Egypt. *J. Genet. Cytol.*, 46: 167-178
- Leboffe**, M. J.; & **Pierce**, B. E. (2010). *Microbiology: Laboratory Theory and Application*. 3d ed. Morton Publishing Company. Englewood, CO.
- Li**, X., **Yang**, Y., **Henry**, R. J., **Rossetto**, M., **Wang**, Y., & **Chen**, S. (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews*, 90(1), 157-166.

- Liu, Z. F., Ci, X. Q., Li, L., Li, H. W., Conran, J. G., & Li, J. (2017).** DNA barcoding evaluation and implications for phylogenetic relationships in Lauraceae from China. *PloS one*, 12(4), e0175788.
- Lumariz Hernandez Rosario, Juan O. Rodríguez Padilla, Desiree Ramos Martínez, Alejandra Morales Grajales, Joel A. Mercado Reyes, Gabriel J. Veintid_os Feliu, Benjamin Van Ee, and Dimuth Siritunga.** 2019. DNA Barcoding of the Solanaceae Family in Puerto Rico Including Endangered and Endemic Species. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 144(5):363–374. 2019.
- Macfaddin, J.F. (2000).** Biochemical tests for identification of medical Williams and Wilkins Baltimore, Bacteria .1sted., the Williams X USA. *Manual of Clinical Microbiology*, ASM, Washington D.C., pp. 222-237..(citted from Costa et al., 2013).
- Małgorzata A., Magdalena Scheibe, and Henryk H. Jeleń.** 2020. "Identification of Odor Active Compounds in *Physalis peruviana* L." *J. Molecules* 25, no. 2: 245.
- Maria M.-M., Małgorzata K., Robert D. Wojtyczka, D. , and Tomasz J. Wąsik* ,(2018)** Phenolic Compounds Diminish Antibiotic Resistance of *Staphylococcus Aureus* Clinical Strains. *Int J. Environ Res Public Health.* ; 15(10): 2321.
- Mazova, N., Popova, V. and Stoyanova, A., 2020.** Phytochemical composition and biological activity of *Physalis* spp.: A mini-review. *Food Science and Applied Biotechnology*, 3(1), pp.56-70.
- Mazumder, K.; Biswas, B.; Raja, I.M.; Fukase, K.** 2020. Review of Cytotoxic Plants of the Indian Subcontinent and a Broad-Spectrum Analysis of Their Bioactive Compounds .*J. Molecules* , 25, 1904.
- Montville, T.J. and Matthews, K.R. (2008).** Food microbiology: An introduction. 2nd ed, ASM Press, Washington D.C.

- Morello**, J.A.; Mizer, H.E.; & Granato. (2006). Laboratory manual and workbook in microbiology applications to patient care. 18th.ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York: 95-99.
- Mostafa**, A.A., Al-Askar, A.A., Almaary, K.S., Dawoud, T.M., Sholkamy, E.N. and Bakri, M.M., 2018. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. Saudi journal of biological sciences, 25(2), pp.361-366.
- Murray**, E.A., 2007. The amygdala, reward and emotion. Trends in cognitive sciences, 11(11), pp.489-497.
- Nocetti**, D., H. Núñez, L. Puente, A. Espinosae, and F. Romeroa. 2020. Composition and biological effects of goldenberry byproducts: an overview. J. Sci. Food Agric. 2020. Doi: 10.1002/jsfa.10386
- Norm**, V. (2011). Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway. Tromsø/Oslo. 2012. ISSN:1502-2307 (print)/1890-9965 (electronic). Available at: www.antibiotikaresistens.no. Accessed 2013 April 12.
- Osho**, A., Adetunji, T., Fayemi, S. O., & Moronkola, D. P. (2010). Antimicrobial activity of essential oils of *Physalis angulata* L. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 7(4).
- Owens**, C.D; Stoessel K. (2008). Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention, 0195-6701 - see front matter, The Hospital Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
- Pablos**, M., González-Zamora, Á., Sánchez, N. and Martínez-Fernández, J., 2018. Assessment of root zone soil moisture estimations from SMAP, SMOS and MODIS observations. Remote Sensing, 10(7), p.981.

- Paman, A., Sukumar, G., Ramakrishna, B. and Madhu, V., 2020.** An optimization scheme for a multilayer armour module against 7.62 mm armour piercing projectile. *International Journal of Protective Structures*, 11(2), pp.185-208.
- Panáček, A., Kolář, M., Večeřová, R., Pucek, R., Soukupová, J., Kryštof, V., Hamal, P., Zbořil, R. and Kvítek, L., 2009.** Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*, 30(31), pp.6333-6340.
- Patel Rajesh, M., and J. Patel Natvar. 2011.** “In Vitro Antioxidant Activity of Coumarin Compounds by DPPH, Super Oxide and Nitric Oxide Free Radical Scavenging Methods.” *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* 152–68.
- Patil, N. R.(2017)** Detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with special reference to mec A gene.
- Patricio M., Felipe P., Mario J., Germán F., Sepúlveda Ch., and Claudio P., 2021.** Chemical Characterization, Nutritional and Bioactive Properties of *Physalis peruviana* Fruit from High Areas of the Atacama Desert. *J. foods*, 10(11): 2699
- Pinto, M. D. S., Ranilla, L. G., Apostolidis, E., Lajolo, F. M., Genovese, M. I., & Shetty, K. (2009).** Evaluation of antihyperglycemia and antihypertension potential of native Peruvian fruits using in vitro models. *Journal of medicinal food*, 12(2), 278-291.
- Plata, K., Rosato, A., & Węgrzyn, G. (2009).** *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochimica Polonica*, 56(4), 597-612.
- Pokorny, J and Korezak, J (2001).** Preparation of natural antioxidant. In: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., editors. *Antioxidants in food: practical application*. Cambridge England: Wood head Publishing Limited. P311-41.

- Popova** ,V., Stoyanova, A. and Mazova, N., (2020). “Phytochemical composition and biological activity of *Physalis* spp.: a mini-review,” *Food Science and Applied Biotechnology*, vol. 3, no. 1, pp. 56–70.
- Potapova**, T. A., and Gerton, J. L. (2019). Ribosomal DNA and the nucleolus in the context of genome organization. *Chromosom. Res.* 27, 109–127. doi: 10.1007/s10577-018-9600-5
- POWO** (2022) Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.plantsoftheworldonline.org/> [accessed 31 July 2022]
- Pretz**, C. & Deanna, R. Typifications and nomenclatural notes in *Physalis* (Solanaceae) from the United States. *Taxon* 69, 170–192 (2020).
- Prokopowich**, C. D., Gregory, T. R., and Crease, T. J. (2003). The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome* 46, 48–50. doi: 10.1139/g02-103
- Puente**, L., D. Nocetti, and A. Espinosa. 2019. *Physalis peruviana* Linnaeus, an update on its functional properties and beneficial effects in human health. In: Mariod, A. (ed.). *Wild fruits: Composition, nutritional value and products*. Springer Nature, Switzerland. Doi: 10.1007/978-3-030-31885-7_34
- Ramadan**, M.F. and J.-T. Mörsel. 2019. Goldenberry (*Physalis peruviana*) oil. pp. 397-404. In: *Fruit oils: chemistry and functionality*, Springer Nature Switzerland AG, Switzerland. Doi: 10.1007/978-3-030-12473-1_19

- Ramakrishna Pillai, J., Wali, A. F., Menezes, G. A., Rehman, M. U., Wani, T. A., Arafah, A., ... & Mir, T. M. (2022).** Chemical Composition Analysis, Cytotoxic, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Physalis angulata* L.: A Comparative Study of Leaves and Fruit. *Molecules*, 27(5), 1480.
- Ray, C. and Ryan, K.J. (2003).** Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases. McGraw Hill. USA.
- Ross, A.; & Shoff, H. W. (2022).** Staphylococcal scalded skin syndrome. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Roy, P. C.; Shaheduzzaman, M.; Sultana, N.; & Jahid, I. K. (2015).** Comparative antibiotic sensitivity pattern of hospital and community acquired *Staphylococcus aureus* isolates of Jessore, Bangladesh. *Journal of Biosciences and Medicines*, 3(10), 17.
- Rustam, F., Reshi, A.A., Mehmood, A., Ullah, S., On, B.W., Aslam, W. and Choi, G.S., 2020.** COVID-19 future forecasting using supervised machine learning models. *IEEE access*, 8, pp.101489-101499.
- Sahu, N., Graham, A.W. and Davis, B.L., 2019.** Black hole mass scaling relations for early-type galaxies. I. MBH–M*, sph and MBH–M*, gal. *The Astrophysical Journal*, 876(2), p.155.
- Sánchez-Reinoso, A.D., Y. Jiménez-Pulido, J.P. Martínez-Pérez, C.S. Pinilla, and G. Fischer. 2019.** Chlorophyll fluorescence and other physiological parameters as indicators of waterlogging and shadow stress in lulo (*Solanum quitoense* var. *septentrionale*) seedlings. *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 13(3), 325-335.
- Sandoval-Padilla, I., Pérez-Alquicira, J., Rodríguez, A., del Pilar Zamora-Tavares, M., & Vargas-Ponce, O. (2022).** The plastome of the husk tomato (*Physalis philadelphica* Lam., Solanaceae): a comparative

- analysis between wild and cultivated pools. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 69(3), 1391-1405.
- Sandoval-Padilla**, I., Pérez-Alquicira, J., Zamora-Tavares, M. D. P., Rodríguez, A., Cortés-Cruz, M., Alcalá-Gómez, G., & Vargas-Ponce, O. (2019). Complete sequence of wild *Physalis philadelphica* chloroplast genome. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(2), 3295-3297.
- Schedlbauer**, A.; Kaminishi, T.; Ochoa-Lizarralde, B.; Dhimole, N.; Zhou, S.; López-Alonso, J. P.; & Fucini, P. (2015). Structural characterization of an alternative mode of tigecycline binding to
- Scudiero**, O.; Brancaccio, M.; Mennitti, C.; Laneri, S.; Lombardo, B.; De Biasi, M. G.; ... & Pero, R. (2020). Human defensins: A novel approach in the fight against skin colonizing *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 9(4), 198.
- Saghai-Marooof**, M.A.; Soliman, K.M.; Jorgensen ,R.A. and Allard, R.W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *J. Proceedings National Academy of Sciences*, 81: 8014-8018.
- Shah**, S., Ahmed, A. and Ahmad, N., 2013. Role of packaging in consumer buying behavior. *International Review of Basic and Applied Sciences*, 1(2), pp.35-41.
- Shangguo** Feng Kaixin Zheng , Kaili Jiao , Yuchen Cai , Chuanlan Chen , Yanyan Mao , Lingyan Wang , Xiaori Zhan , Qicai Ying and Huizhong Wang .2020 .Complete chloroplast genomes of four *Physalis* species (Solanaceae): lights intogenome structure, comparative analysis, and phylogenetic relationships. *J. . BMC Plant Biology* , 20:242pp 1:14

- Shen** J, Zhang X, Landis JB, Zhang H, Deng T, Sun H, Wang H. (2020) Plastome evolution in *Dolomiaea* (Asteraceae, Cardueae) using phylogenomic and comparative analysis. *Frontiers in Plant Science* 11: e376. 10.3389/fpls.2020.00376
- Shenstone**, E., Lippman, Z., & Van Eck, J. (2020). A review of nutritional properties and health benefits of *Physalis* species. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75, 316-325.
- Singh** N., Singh S., Maurya P.(2019) . “An updated review on *Physalis peruviana* fruit: cultivational, nutraceutical and pharmaceutical aspects,” *Indian Journal of Natural Products and Resources*, vol. 10, no. 2, pp. 97–110
- Soni**, K. (2012). Fluoroquinolones: Chemistry & Action - A Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Science*; 2(1): 43-53.
- Spaulding**, A. R.; Salgado-Pabón, W.; Kohler, P. L.; Horswill, A. R.; Leung, D. Y.; & Schlievert, P. M. (2013). Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 26(3), 422-447.
- Stapleton**, P. D.; & Taylor, P. w. (2008). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* mechanisms and modulation, *Sci prog.* 85: 57-72.
- Stetter**, J., 2021. Spinoza's Argument for Substance Monism.
- Stewart** C.M. (2003) *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxin Ch 12 In: Hocking, A.D. (ed) *Foodborne microorganisms of public health significance*. 6th ed, Australian Institute of food science and Technology (NSW Branch), Sydney, p. 359-380. supplement, pp. 153–157.
- Sultana**, H.; Sattar, H.; Tarafder, S.; Sarker, J. N.; Bhuiyan, M. T. H.; Rahman, M. M.; & Naz, F. M. U. (2019). Evaluation of Oxacillin Disk

Diffusion Test for the Phenotypic Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*.

Taddesse, Z.; Tiruneh, M.; & Gizachew, M. (2014) *Staphylococcus aureus* and its Antimicrobial Susceptibility Pattern in Patients, Nasal carriage of Health Personnel, and objects at Dessie referral hospital, Northern Ethiopia. Global Journal of Medical research: Online ISSN: 2249-4618 & Print ISSN: 0975-5888.

Tarrand, J. J., & Gröschel, D. H. (1982). Rapid, modified oxidase test for oxidase-variable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(4), 772-774.

Tassone, F., Hagerman, R.J., Taylor, A.K., Gane, L.W., Godfrey, T.E. and Hagerman, P.J., 2000. Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 66(1), pp.6-15.

Thwaites, G. E.; & United Kingdom Clinical Infection Research Group (UKCIRG). (2010). The management of *Staphylococcus aureus* bacteremia in the United Kingdom and Vietnam: a multi- centre evaluation. *PLoS One*, 5(12), e14170.

Tille P.M.(2014). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. 13th Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc.

Tomisic, Z. B. (2011). The story of azithromycin. *J Chem Chem Eng*, 60, 603-617.

Vadim G. Lebedev; Tatyana N. Lebedeva; Elena O. Vidyagina; Vladimir N. Sorokopudov; Anna A. Popova and Konstantin A. Shestibratov. 2022. Relationship between Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Berries and Leaves of Raspberry Genotypes and Their Genotyping by SSR Markers. *J . Antioxidants* 11(10), 1961; <https://doi.org/10.3390/antiox11101961>

- Valderrama**, I. H., Echeverry, S. M., Rey, D. P., Rodríguez, I. A., Silva, F. R. M. B., Costa, G. M., ... & Aragón, D. M. (2022). Extract of Calyces from *Physalis peruviana* Reduces Insulin Resistance and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Pharmaceutics*, 14(12), 2758.
- Vaou**, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms*, 9(10), 2041.
- Vasconcelos**, N. G. and Cunha, M.L.R.S.(2010). Staphylococcal enterotoxina: Molecular aspects and detection methods. *J Public Health Epidemiol*; 2:29- 42.
- Vdovenko** SA, Polutin OO, Muliarchuk OI, Hareba OV, Havrys IL (2021) Peculiarities of tomatillo (*Physalis philadelphica*) field production in Ukraine with the use of different elements of technology. *Research on Crops* 22(1): 116–128.
- Vilkickyte**, G.; Raudone, L.; Petrikaite, V. Phenolic fractions from *Vaccinium vitis-idaea* L. and their antioxidant and anticancer activities assessment. *Antioxidants* 2020, 9, 1261. [Google Scholar] [CrossRef]
- Wang J**, Yan Z, Zhong P, Shen Z, Yang G and Ma L (2022) Screening of universal DNA barcodes for identifying grass species of Gramineae. *Front. Plant Sci.* 13:998863. doi: 10.3389/fpls.2022.998863
- Wang S**, Yang CP, Zhao XY, Chen S, Qu GZ.(2018) Complete chloroplast genome sequence of *Betula platyphylla*: gene organization, RNA

- editing, and comparative and phylogenetic analyses. *BMC Genomics*. ;19(1):950.
- Warrier, P.K.**, 1993. *Indian medicinal plants: a compendium of 500 species* (Vol. 5). Orient Blackswan.
- Wernli, D.**, Jørgensen, P. S., Harbarth, S., Carroll, S. P., Laxminarayan, R., Levrat, N., ... & Pittet, D. (2017). Antimicrobial resistance: the complex challenge of measurement to inform policy and the public. *PLoS medicine*, 14(8), e1002378.
- Wertheim, H.F.**; Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W.; van Belkum, A.; Verbrugh, H.A. and Nouwen, J.L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*,5(12):751-762.
- Wilkinson, B.J.**; Crossley, K.B. and Archer, G.L.(1997) (Eds.), *The Staphylococci in Human Diseases*. Churchill Livingstone.
- Willems-Erix, D.F.**, Scholtes-Timmerman, M.J., Jachtenberg, J.W., van Leeuwen, W.B., Horst-Kreft, D., Bakker Schut, T.C., Deurenberg, R.H., Puppels, G.J., van Belkum, A., Vos, M.C. and Maquelin, K., 2009. Optical fingerprinting in bacterial epidemiology: Raman spectroscopy as a real-time typing method. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(3), pp.652-659.
- Winn Washington, A.S.**; William, J.; Elmer, K.; Gray, P.; Paul, S. and Gail, W. (2009). *Koneman's color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* Lippicott Williams and Wilkins Philadelphia.
- Xu X, Wang D.** (2021) Comparative chloroplast genomics of *Corydalis* Species (Papaveraceae): Evolutionary perspectives on their unusual large scale rearrangements. *Frontiers in Plant Science* 11: e600354. 10.3389/fpls.2020.600354 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef]

- Yang**, F.L., Chen, H.Y., Chen, F.C., Huang, C.C., Chang, C.Y., Chiu, H.K., Lee, C.C., Chen, C.C., Huang, H.T., Chen, C.J. and Tao, H.J., 2002, December. 25 nm CMOS omega FETs. In Digest. International Electron Devices Meeting, (pp. 255-258). IEEE.
- Yilmaz**, Y. (2002). Antioxidant activities of grape skin and grape seed polyphenolics and potential use of antioxidants in food as a functional food ingredient Ph. D. dissertation. Athens, Georgia.
- Zaidan**, M. R., Noor Rain, A., Badrul, A. R., Adlin, A., Norazah, A., & Zakiah, I. (2005). In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. Trop biomed, 22(2), 165-170.
- Zhan**, X., Luo, X., He, J., Zhang, C., Liao, X., Xu, X., ... & Lu, J. (2020). Bioactive compounds induced in *Physalis angulata* L. by methyl-jasmonate: an investigation of compound accumulation patterns and biosynthesis-related candidate genes. Plant molecular biology, 103, 341-354.
- Zhang**, W.N.; Tong, W.Y. Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Physalis*. Chem. Biodivers. 2016,13, 48–65.
- Zhou**, B.; Ye, Q.; Chen, M.; Li, F.; Xiang, X.; Shang, Y.; Wang, C.; Zhang, J.; Xue, L.; Wang, J.; et al. Novel species-specific targets for real-time PCR detection of four common pathogenic *Staphylococcus* spp. Food Control 2022, 131, 108478.

الملاحق

Nucleotide

Nucleotide

Advanced

Search

Help

GenBank

Send to:

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Related information

Protein

Taxonomy

Recent activity

Turn Off Clear

Physalis peruviana isolate AH-ZE1 tRNA-His (trnH-GUG) gene, Nucleotide

Physalis angulata isolate AH-ZE1 internal transcribed spacer, Nucleotide

Physalis peruviana isolate AH-ZE1 internal transcribed spacer, Nucleotide

See more...

Physalis peruviana isolate AH-ZE1 tRNA-His (trnH-GUG) gene, partial sequence; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and photosystem II protein D1 (psbA) gene, partial cds; plastid

GenBank: OQ625502.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS OQ625502 497 bp DNA linear PLN 24-JUL-2023

DEFINITION Physalis peruviana isolate AH-ZE1 tRNA-His (trnH-GUG) gene, partial sequence; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and photosystem II protein D1 (psbA) gene, partial cds; plastid.

ACCESSION OQ625502

VERSION OQ625502.1

KEYWORDS

SOURCE

ORGANISM plastid Physalis peruviana

[Physalis peruviana](#)

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; asterids; lamiids; Solanales; Solanaceae; Solanoideae; Physaleae; Physalis.

REFERENCE 1 (bases 1 to 497)

AUTHORS AL-Rahimi, A.Z. and AL-Rufaye, Z.T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (13-MAR-2023) Biological Science Department, Science College, University of Kerbala, Kerbala, Kerbala 00561, Iraq

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES

source Location/Qualifiers
1..497
/organism="Physalis peruviana"
/organelle="plastid"
/mol_type="genomic DNA"
/cultivar="Iraq"
/isolate="AH-ZE1"
/db_xref="taxon:126903"
/collection_date="2022"
complement(<1..17)
/gene="trnH-GUG"
trnA complement(<1..17)
/gene="trnH-GUG"
/product="tRNA-His"
misc_feature complement(18..461)
/note="psbA-trnH intergenic spacer"
gene complement(462..>497)
/gene="psbA"
CDS complement(462..>497)
/gene="psbA"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="photosystem II protein D1"
/protein_id="WGF18985.1"
/translation="LAAIEAPSTNG"

ORIGIN

```
1 acttggtctac atccgcccc tcgcctactt acattccatt tttacattat ttaaattaga
61 aaacaaaaga ttcaagttcg aatatttctc ttctttctta tttcaattca atttatattat
121 caattatatt attatttcaa agaaatgact acaaaattaa caatgctcaa tcttaactaa
181 atgaaagaag aaacaactt ctatttcgac gaaagcgact tctctcttta tatatata
241 tatatagctt ctccctcttt ttatatagtt tatattcctt cgtttgatat acctttttta
301 atggtatggt aatgtaaac aaagagtcta tgtaagttaa atactagtaa atcaataaat
361 aaaaagaaaa aaagaaagga gcaatagcac cctcttggtt aaacaagaaa atgattattg
421 ctctttcttt ttcaaacctt cctatagact agaccgggat cttatccatt tgtagatgga
481 gcttcatag cagctag
```

//

FOLLOW NCBI



Connect with NLM



National Library of Medicine
8600 Rockville Pike
Bethesda, MD 20894

Web Policies
FOIA
HHS Vulnerability Disclosure

Help
Accessibility
Careers

Nucleotide

Nucleotide

Advanced

Search

Help

GenBank

Send to:

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Related information

Taxonomy

Recent activity

Turn Off Clear

Physalis peruviana isolate AH-ZE1 internal transcribed spacer Nucleotide

Physalis peruviana isolate AH-ZE1 tRNA-His (trnH-GUG) gene Nucleotide

Physalis angulata isolate AH-ZE1 internal transcribed spacer Nucleotide

See more...

Physalis peruviana isolate AH-ZE1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: OQ616506.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS OQ616506 548 bp DNA linear PLN 24-JUL-2023

DEFINITION Physalis peruviana isolate AH-ZE1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

ACCESSION VERSION OQ616506 OQ616506.1

KEYWORDS

SOURCE

ORGANISM

Physalis peruviana

[Physalis peruviana](#)

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; asterids; lamiids; Solanales; Solanaceae; Solanoideae; Physaleae; Physalis.

REFERENCE 1 (bases 1 to 548)

AUTHORS AL-Rahimi,A.Z. and AL-Rufaye,Z.T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (13-MAR-2023) Biological Science Department, Science College, University of Kerbala, Kerbala, Kerbala 00561, Iraq

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES

source

Location/Qualifiers

1..548

/organism="Physalis peruviana"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="AH-ZE1"

/db_xref="taxon:126903"

/country="Iraq"

/collection_date="2022"

misc_RNA

<1..>548

/note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2"

ORIGIN

```

1 tcccccttt tgtcgcggc ggtcgcgct cgcggtcgc cggtcgacta acgaacccg
61 gcgcggaacg cgccaaggaa tacttaaccg acggcccgc cctcgcgcc cgttcgcggc
121 gcgcgcgggg gagctgcgcc tcgcttgaaa cacgaacgac tctcggcaaa ggatatctcg
181 gctctcgcat cgatgaagaa cgtagcgaat tgcgatactt ggtgtgaatt gcagaatccc
241 gtgaaccatc gagtctttga acgcaagttg cgcccgaagc cattaggccg agggcacgtc
301 tgctctggcg tcacgcatcg cgtcgcctcc ctcgcccgc gacgcggggc ttggcgggac
361 ggatactggc ctcccgtgcg ctcgcagcgc gcggctggcc taattgcgag cccgcgtcga
421 cggacgtcac ggcaagtggt ggttgaatct caactctcgt ggtgcccgtg ccgaaccggt
481 cgcccgtgct ggctgacaga cctcggcgc cttagcgct ccgaccgcg acccccagtt
541 ccggcggg
//

```

FOLLOW NCBI



Connect with NLM



National Library of Medicine
8600 Rockville Pike
Bethesda, MD 20894

Web Policies
FOIA
HHS Vulnerability Disclosure

Help
Accessibility
Careers

NLM | NIH | HHS | USA.gov



Nucleotide

Nucleotide

Advanced

Search

Help

GenBank

Send to:

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Related information

Taxonomy

Recent activity

Turn Off Clear

Physalis angulata isolate AH-ZE1 internal transcribed spacer Nucleotide

Physalis peruviana isolate AH-ZE1 internal transcribed spacer Nucleotide

Physalis peruviana isolate AH-ZE1 tRNA-His (trnH-GUG) gene Nucleotide

See more...

Physalis angulata isolate AH-ZE1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OQ616509.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS OQ616509 658 bp DNA linear PLN 24-JUL-2023

DEFINITION Physalis angulata isolate AH-ZE1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION OQ616509

VERSION OQ616509.1

KEYWORDS .

SOURCE Physalis angulata

ORGANISM [Physalis angulata](#)

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; asterids; lamiids; Solanales; Solanaceae; Solanoideae; Physaleae; Physalis.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS AL-Rahimi,A.Z. and AL-Rufaye,Z.T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (13-MAR-2023) Biological Science Department, Science College, University of Kerbala, Kerbala, Kerbala 00561, Iraq

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..658
/organism="Physalis angulata"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="AH-ZE1"
/db_xref="taxon:113208"
/country="Iraq"
/collection_date="2022"

[misc_RNA](#)

<1..>658
/note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large subunit ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 ctgctggagac attgtcgaac ctgctaagca gagcgaccgc cgaacctgtt tgaacaccgg
61 ggagggcgcgc cttggctcgc ctccccctcg tcgtccggcg gtcgcgcgcg cgcggttcgcc
121 ggtcgaccaca cgaaccccg cgcggaacgc gccaaagaaat actgaaccga tggcctggcc
181 ctgcgcccc gtccgcggcg cgcgggggg acctgcgctt cgcataaac acgaacgact
241 ctgcgcaacg gatactcgg ctctcgcac gatgaagaac gtagcgaat cgcatacttg
301 ggtgtaattg cagaatcccg tgaaccatcg agtctttgaa cgcaagtgc gcccgaaacc
361 attaggccga gggcacgctc gcctggcgct caagcgcgc gtcgcccccc ctgcgccccg
421 taagcgccgg cgtggcggg acggaggctg gcctcccgct cgtcgcgagc gcgcgctgg
481 cctaaatgct agcccgcgtc gaccgacgct acggcgagtg gttggtgaat ctcaactctt
541 taggtgcccg tggcaaaacc cgtcgcgcgc ctcggctgct agacccttcc cgcgcttagg
601 cgtcgcgacc ggcaccccg gtcaggcggg attaccgct tagtttaagc atataata
//

```

FOLLOW NCBI



Connect with NLM



National Library of Medicine
8600 Rockville Pike
Bethesda, MD 20894

Web Policies
FOIA
HHS Vulnerability Disclosure

Help
Accessibility
Careers

bioMérieux Customer:

مختبر ميديكا التخصصي
Microbiology Chart Report

Printed February 2, 2023 3:35:46 AM CDT

Patient Name: فضل الله شاكر
Location:
Lab ID: 1346

Patient ID: 1346
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Staphylococcus aureus

Source: swab

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time: 4.83 hours	Status: Final
Selected Organism	99% Probability Staphylococcus aureus	
ID Analysis Messages	Bionumber: 050402023663231	

Biochemical Details																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	(-)	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	-
38	dRIB	+	39	ILATk	+	42	LAC	-	44	NAG	-	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

مختبر
ميديكا التخصصي

Summary

It included the molecular diagnosis of two species of *Physalis* spp collected in Iraq on conservative regions, such as the sequence of chloroplast DNA (cpDNA) and the sequence of ribosomal nuclear (nrDNA) region of nuclear ribosomal DNA, obtained from one of the regions belonging to the private sector / Holy Karbala Governorate And the second residence spread naturally in some orchards, they were collected and classified according to the phenotypic form, and they belonged to the Solanaceae family, and vice versa, and from the genus *Physalisen*, by the operation of their self-propagation.

The results showed the isolation of the two species from each other, if the nucleotide sequences indicated the confirming identity of the amplified aggregates via the NCBI blast gene bank site. 1 with a percentage of 98.59%, which belongs to a Chinese strain of the same genus. The results also showed the presence of three mutations when comparing the sequence of nitrogenous bases. The species was registered by the researcher as *Physalis peruviana* isolate AH-ZE1, with serial number OQ625502.1g.

But when using nrDNA sequences, it was noted that there were high similarities of the first sample with the type of *Physalis peruviana* 217 deposited in the Genome Bank with the serial number DQ314161.1, with a rate of 96.91%, which belongs to a strain located in the United States of America. The results also showed that there were 8 mutations when comparing the sequence of bases. nitrogenous, and the species was recorded in the Genie Bank as *Physalis peruviana* isolate AH-ZE1, with serial number OQ616506.1. As for the second sample, it was noted that there were high similarities with the type *Physalis angulata* isolate LHR28I deposited in the Genome Bank with serial number

MK412130.1, with a rate of 98.02%, which belongs to a strain found in Spain. The results also showed the presence of 10 mutations when comparing the sequence of nitrogenous bases. The type of The researcher accepted it as *Physalis angulata* isolate AH-ZE1 inducer, sequence number OQ616509.1.

The results of the GC-mass analysis showed that the sample *Physalis angulata* isolate AH-ZE1 contained twenty-four effective compounds that have a lot of medicinal efficacy. Oxidation 94% at a concentration of 140 of the extract and the lowest percentage of antioxidants 42% at a concentration of 20 is due to the presence of a high percentage of phenolic compounds in the plant extract, which are directly proportional to the percentage of antioxidants.

The results showed that the alcoholic extract of *Physalis angulata* AH-ZE1 was effective against bacteria the areola diameter for inhibiting *Staphylococcus* colonies showed that a concentration of 25% of the extract was more efficient in inhibiting *Staphylococcus* non-producing clotting enzyme. Inhibition of enzyme-positive *Staphylococcus* colonies (18.34 ± 1.24) at a significant level ($P < 0.05$), on the other hand, the best lowest inhibitory concentration when using the antibiotic doxycycline was 1.88 ± 42.47 mm and 1.76 ± 42.6 for both enzyme-positive and negative staphylococci colonies. Coagulation with no significant differences between antibiotics.

The results of the coa gene expression study showed that there were clear significant differences in the gene expression levels of the isolate between the treatments of the alcoholic extract of *Physalis angulata* and the control group, as the level of gene expression decreased in the treatment T2 with a concentration of 50%, the third T3 with a concentration of 75% and the fourth T4 with a concentration of 100%. % when compared with the first treatment with a concentration of 25%.

And their comparison to the control group, that is, the concentration of 50%, 75%, and 100% negatively affects the level of gene expression, and thus affects the formation of the biofilm of *Staphylococcus aureus*, which leads to a reduction in bacterial growth, While the concentration of 25% of the extract showed a clear effect on the high level of gene expression of the Coa gene (an increase in the concentration of RNA), it indicates the activity and effectiveness of this gene in activating and maintaining the biofilm, which leads to an increase in the growth of pathogenic bacteria, that is, the higher the concentration of the extract, the lower it is. Gene expression of the Coa gene of *Staphylococcus aureus*, which indicates the efficiency of the alcoholic extract of *Physalis angulata* with a concentration of (50, 75 and 100)% as anti-biofilm formation.



UNIVERSITY OF KERBALA

College of Science

Department of Biology

**Molecular Identification of *Physalis angulata*,
Chemical composition and evaluation the
inhibitory activity of its leaves extract against
Staphylococcus aureus isolated from clinical
sources**

A thesis

**Submitted to the council of the College of Science \ University of
Karbala In partial of fulfillment of requirements for degree of
Master of Science in Biology**

Written By

Ahmed Zughair Jalab

Supervised by

Prof. Dr. Zeina Thamer Abdel-Hussein

1445 A.H

2023 A.D

