تأثير منظمات النمو النباتية في تحفيز إنتاج مضادات الأكسدة النباتية من كالس نبات الحنطة السوداء

عادل يوسف نصرالله* حسام سعد الدين محمد خيرالله* شامل إسماعيل نعمة**

* كلية الزراعة–جامعة بغداد

** مركز دراسات الصحراء–جامعة الأنبار

shamil7899@yahoo.com

المستخلص

نُفذت التجربة في مختبر وحدة أبحاث النخيل والتمور في كلية الزراعة–جامعة بغداد خلال العامين 2012 و2013، بهدف دراسة تأثير منظمات النمو النباتية في تحفيز إنتاج مضادات الأكسدة النباتية من كالس نبات الحنطة السوداء *Fagopyrum esculentum* M. بينت النتائج أن أفضل تركيز من NaOCl لتعقيم بذور الحنطة السوداء هو 4.5% ولمدة 20 دقيقة بلغ 90% وأفضل توليفة من 2,4-D و Kin. لإستحثاث الكالس من السويقة تحت الفلقية لبادرات نبات الحنطة السوداء هو وسط MS مجهز بالتركيزين 3.0 و 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ لمنظمي النمو آنفي الذكر بالتتابع، إذ بلغ الوزن الطري والجاف للكالس (433.2 و 34.61 ملغم) لكلا الوزنين وبالتتابع، وحقق منظم النمو حامض السالسيليك عند التركيز 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى وزن طري وجاف للكالس المستحث من السويقة تحت الفلقية بلغ 349.4 و 27.7 ملغم لكلا الوزنين وبالتتابع. أظهرت نتائج تحليل الكالس تفوق منظم النمو البراسينولايد بالتركيز 0.050 ملغم.لتر$^{-1}$ بتحقيقهِ لأعلى إنتاج لمركبات Caffeic acid و Vanillic acid في حين كانت معاملة البراسينولايد بالتركيز 0.10 ملغم.لتر$^{-1}$ هي من أظهرت أعلى القيم في إنتاج مركبات Chlorogenic acid و Orientin و Vitexin و Rutin، أما منظم النمو حامض السالسيليك فقد أظهرت المعاملة بالتركيز 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى قيم إنتاج مركبات Gentisic acid و Isovitexin و Quercetin و Coumaric acid.

الكلمات المفتاحية: الحنطة السوداء، زراعة الأنسجة النباتية، مضادات الأكسدة النباتية، منظمات النمو النباتية.

* البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثالث.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 46(6): 922-933, 2015 NASRALLA & et.al

THE EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS ON PLANT ANTI-OXIDANT PRODUCTION FROM CALLUS OF BUCKWHEAT

ADEL Y.NASRALLA* HUSSAM S. M. KHIERALLAH* SHAMIL I. NEAMAH**

*** College of Agriculture- Uinversity of Baghdad**

**** Center of Desert Studies- University of Anbar**

ABSTRACT

This experiment was conducted during 2012 and 2013 at the tissue culture Laboratory, Date Palm Research Unite, College of Agriculture, University of Baghdad. The objectives of this study effect of plant growth regulators in the production of anti-oxidants in callus of buckwheat *Fagopyrum esculentum* M. It was found that the best concentration of NaOCl was %4.5 for seeds sterilization for 20 minutes (%90). The best plant growth regulater combination for callus induction from hypocotyl of Buckwheat seedling was 2,4-D and Kinetin at 3.0 and 1.0 mg.L^{-1} respectively, was 433.2 and 34.61 mg. respectively. The highest values of fresh and dry weights of callus was achieved at 1.0 mg.L^{-1} of salicylic acid was 349.4 and 27.7 mg respectively. Results indicated the concentration of Brassinolide 0.050 mg.L^{-1} increased Caffeic acid and Vanillic acid. While 0.10 mg.L^{-1} of Brassinolide increased Chlorogenic acid, Orientin, Vitexin and Rutin. Also 2.0 mg.L^{-1} of salicylic acid increased Gentisic acid, Isovitexin, Quercetin and Coumaric acid.

Key words: Buckwheat, plant tissue culture, plant anti-oxidants, plant growth regulators

Part of Ph.D thesis of third author.

المقدمـة

تعد الحنطة السوداء *Fagopyrum esculentum* M. أحدى أهم النباتات الطبية، فهي غير معروفة في العراق وحديثة العهد في عالمنا العربي، وتزرع بشكل واسع في انحاء العالم كافة ولكن بشكل اساسي في النصف الشمالي من الكرة الأرضية، ولأهميتها البالغة بدأت السياسات الزراعية لكثير من الدول إدخالها، من خلال زراعتها والإستفادة منها في مجالي التغذية والصناعة الدوائية على حدُ سواء، ومن تلك الدول سويسرا وبريطانيا وايطاليا وفرنسا. للحنطة السوداء قيمة غذائية عالية من خلال نسبة البروتين الحاوية عليها ونوعيته إذ تتراوح نسبته من 11–15%، أما عن نوعيته فتمتاز بإحتوائها على الأحماض الأمينية الثمانية الأساسية التي يحتاجها الجسم البشري لاسيما الأحماض الأمينية الثلاثة Lysine و Arginine و Aspartic acid وهذا مايميز بروتين الحنطة السوداء من ماسواه من بروتينات الحبوب. كما تتميز بذور الحنطة السوداء بمحتواها من الحوامض الدهنية غير المشبعة مثل Oleinic acid و Linolenic acid، فضلاً عن محتواها العالي من الفيتامينات مثل:B_1 و B_2 و B_6 و P (7). فضلاً عن احتوائها على كثير من المركبات الطبيعية التي تمتاز بفعاليتها العلاجية المهمة منها: flavones و flavonoids و phytosterols و Inositol و myo-inositol. والتي يعزى لها الأثر الكبير في علاج كثير من الأمراض المزمنة (25). أكتسبت زراعة الأنسجة النباتية وعلوم التقانات الإحيائية المرتبطة بها أبعاداً كبيرة، وظفت في كثير من المجالات الحيوية ومنها إنتاج المركبات الثانوية، وذلك بالنظر لعدم قدرة الزراعة التقليدية في مواجهة الطلب المتزايد على تلك المركبات، فضلاً عن الصعوبات التي تواجهها عملية إنتاج الكثير من المواد الطبيعية بالطرق التقليدية، نتيجة لإختلاف العوامل البيئية أو لوجود محددات آخرى تتعلق بالنبات نفسه، كما أن قسما من هذه المركبات لايمكن تحضيره مختبريا، لذا لابد من إستخلاصه من مصادره النباتية. وهنا تبرز أهميه زراعة الانسجة النباتية لإدامة إنتاج تلك المركبات مع إمكانية إجراء كثير من التحولات البايولوجية في مسارات تصنيع تلك المركبات بإتجاه زيادتها (20). تساعد تلك التقانة في الإنتاج السريع لهذه المركبات على مدار السنه دون التقيد بموسم الزراعة، فضلا عن تقليل المساحات اللازمة للزراعة، علاوة على النقاوة العالية للمواد المتكونة إذا ما قورنت بتلك المستخلصة من النبات الأم (16). لذا تهدف هذهِ الدراسة إلى إمكانية إنتاج الكالس من نباتات الحنطة السوداء فضلاً عن تحديد إمكانية إنتاج مضادات الاكسدة النباتية ذات الفعالية الطبية من كالس نبات الحنطة السوداء بإستخدام تقانة زراعة الأنسجة النباتية وإختبار تأثير ثلاثة أنواع مختلفة من منظمات النمو النباتية لتحديد مدى فعاليتها في زيادة إنتاج وتراكم تلك المركبات في نسيج كالس نبات الحنطة السوداء.

المواد وطرائق

نُفذت هذهِ التجربة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية في وحدة أبحاث النخيل والتمور العائدة لكلية الزراعة–جامعة بغداد للمدة من 5–12–2012 ولغاية 15– 9–2013، أستعمل الوسط الغذائي MS المقدم من قبل Murashige و Skoog (18) أستخدمت الخلطة الجاهزة واضيف السكروز بمقدار 30 غم.لتر$^{-1}$، أستخدم الوسط MS الخالي من منظمات النمو في إنبات البذور فيما أضيف 2,4-D بالتركيز 0، 1 ، 2 ، 3 أو 4 ملغم. لتر$^{-1}$، بالتداخل مع الكاينتين بالتركيز 0، 0.5 ، 1.0 أو 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ ، لإيجاد التركيز المناسب لاستحثاث الكالس من الجزء النباتي (السويقة تحت الفلقية) لبادرات الحنطة السوداء. غسلت البذور المعدة للزراعة جيداً بالماء والصابون السائل وتركت البذور تحت الماء الجاري لمدة 30 دقيقة بعدها نُقلت إلى كابينة الزراعة لتجري هناك عملية التعقيم السطحي للبذور بإستخدام الكحول الاثيلي تركيز 70% ولمدة دقيقة واحدة، ثم نقلت إلى محلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl وبأربعة تراكيز 1.5 ، 3.0 ، 4.5 أو 6.0% ولمدد زمنية مختلفة هي: 10 ، 20 أو 30 دقيقة مع التحريك المستمر، وأخيراً تم غسل البذورالمعاملة بالماء المقطرالمعقم لثلاث مرات لإزلة آثار مادة التعقيم. وتمت عملية الزراعة بوضع بذرة واحدة في كل قنينة أبعادها 2.5×5 سم وبواقع عشرة مكررات لكل معاملة في تجربة الأنبات، وضعت تحت الإضاءة بشدة 1000 لوكس بتعاقب يومي 16ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام وعلى درجة حرارة 25ْم ±2، بدأ الإنبات بعد 5 أيام من الزراعة وتم تسجيل البيانات على اوقات متعاقبة ولغاية 14 يوماً من الزراعة ليتم في النهاية الحصول على بادرات حاوية على 1–2 ورقة

فلقية. وضعت البادرات السليمة في طبق زجاجي معقم وقُسمت السويقة تحت الفلقية إلى قطع صغيرة بطول 0.5 سم وزرعت أفقياً على الوسط الغذائي الخاص بإستحثاث الكالس وبواقع 10 مكررات لكل تركيز من 2,4-D والكاينتين وحضنت في الظلام بدرجة حرارة 25°م ±2 لمدة 5 اسابيع. تم قياس الوزنين الطري والجاف للكالس بإستخدام ميزان حساس، جُففت قطع الكالس في الفرن الكهربائي Oven على درجة حرارة 40°م لحين ثبوت الوزن. وقد اعتمد الوزن الطري الناتج من افضل توليفه لمنظمات النمو في اختيار الوسط الغذائي الملائم لإستحثاث أنسجة الكالس من الجزء النباتي. بعد تحديد أفضل توليفة من منظمي النمو 2,4-D و الكاينتين نُقل الكالس المستحث من السويقة تحت الفلقية إلى وسط غذائي مجهز بمكونات وسط MS نفسها المجهز في مرحلة الاستحثاث مضافاً إليه أفضل توليفة من منظمي النمو أنفي الذكر وهما 3.0 ملغم. لتر$^{-1}$ و1.0ملغم. لتر$^{-1}$ لمنظمي النمو آنفي الذكر وبالتتابع. والتي أعطت أعلى معدل وزن طري للكالس، وكررت عملية إعادة الزراعة كل خمسة أسابيع لحين الوصول إلى الكمية المطلوبة لأجراء التجارب اللاحقة بعد الحصول على كمية كافية من الكالس تم تحضير وسط غذائي ممثل بوسط الإدامة وأضيف اليه منظمات النمو لإختبار تأثيرها على إنتاج المركبات الفينولية في نسيج الكالس المستحث من السويقة تحت الفلقية لنبات الحنطة السوداء. فبعد إعداد وسط الإدامة تم تضمينه بمنظم النمو حامض السالسيلك بالتراكيز (1.0 و 2.0 و 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$) ومنظم النمو البراسينولايد بالتراكيز (0.025 و 0.050 و 0.10 ملغم.لتر$^{-1}$) وذلك لإمكانية إجراء التعقيم الحار بالمؤصدة دون حدوث أي ضرر لهما، في حين تم تعقيم وسط الإدامة فقط لمعاملات جاسمونات المثيل والتي أشتملت على التراكيز (0.025 و 0.050 و 0.075 ملغم.لتر$^{-1}$) واجريت بعدها عملية التعقيم البارد لها داخل كابينة تعقيم الهواء الطبقي قبل توزيع الاوساط في انابيب الزراعة المعقمة وبمقدار 10مل.أنبوبة$^{-1}$، فضلاً عن وجود معاملة المقارنة (دون إضافة أي تركيز من منظمات النمو الداخلة في الدراسة) تمت عملية الزراعة بنقل 150 ملغم من نسيج الكالس وبعشرة مكررات لكل معاملة من المعاملات الداخلة في الدراسة، ثم حُضنت الزروعات على درجة حرارة 25°م ±2 لمدة أربعة أسابيع. تم بعدها قياس الوزن الطري لنسيج الكالس الناتج من المعاملات بعدها جرت عملية تجفيف الكالس لقياس الوزن الجاف بإستعمال الفرن الكهربائي على درجة حرارة 40°م ولحين ثبات الوزن.

إستخلاص مضادات الأكسدة النباتية من نسيج الكالس لنبات الحنطة السوداء

أجري هذا الجزء من التجربة في مختبرات شركة الحقول البيضاء للإستشارات البيئية والهندسية، إذ تم إستخلاص مضادات الأكسدة بحسب طريقة Hohmann وآخرين (11) في استخلاص المركبات الفينولية، فبعد الحصول على كالس نبات الحنطة السوداء المنماة نسيجياً على وسط غذائي MS حاوي على المواد نفسها المذكورة انفاً. أخذت عينة مجففة وزنها 100ملغم وأضيف اليها 10 مل ماء مقطر معقم ومحمض بحامض الهيدروكلوريك 1.0 N HCl بحيث يكون pH = 2.5 وضعت العينة في حمام مائي هزاز ذو الموجات فوق الصوتية Ultrasonic Shaker Water Bath على درجة حرارة 25°م رُشح المحلول من خلال أوراق الترشيح Whatman No.1 بقطر 9 سم. رُكز الراشح في جهاز المبخر التفريغي الدوار(Rotavapor)، إلى حين وصول حجم الراشح النهائي إلى 1 مل وأصبح جاهزاً للتحليل.

التشخيص النوعي والكمي لمضادات الأكسدة النباتية بإستخدام جهاز كروموتوكرافيا السائل ذي الأداء العالي HPLC

تم قياس العينة بإستخدام جهاز كروموتوكرافيا السائل ذي الأداء العالي HPLC نوع Shimadzu LC-10 ATVP، نظراً لقابلية هذه المنظومة على فصل المكونات الكيميائية لمستخلص خلايا الكالس ومقارنتها بالعينات القياسية. حقنت العينات في العمودColumn نوع C18 بوجود مكونات الطور المتحرك (جدول 1) مزج المحلول بإستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية للحصول على محلول كامل التجانس وكان معدل الجريان 1.4 مليلتر/دقيقة. قدرت العينات على الطول الموجي 330 نانوميتراً، إذ تم قياس زمن الإحتجاز ومساحة الحزمة للمركب الناتج من حقن العينة مع زمن الإحتجاز ومساحة الحزمة للمحلول القياسي. وكانت عدد مرات التخفيف لمرة واحدة فقط. تحت الظروف نفسها وحساب

تركيز مضاد الأكسدة النباتي المعني في كالس نبات الحنطة السوداء على وفق المعادلة الأتية:

التصميم التجريبي والتحليل الإحصائي

وزعت المعاملات بإستخدام التصميم العشوائي الكامل (C.R.D) وبعشرة مكررات، وإسُتعمل إختبار اقل فرق معنوي (LSD) للمقارنة بين المتوسطات الحسابية عند مستوى احتمال 0.05 من خلال استخدام برنامج GenState Discovery Edition 4.

النتائج والمناقشة

تعقيم بذور الحنطة السوداء

أظهرت نتائج الجدول 2 وجود فروق معنوية بين التراكيز المختلفة بمحلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl في النسبة المئوية للبقاء والحصول على بادرات سليمة غير ملوثة من بذور نباتات الحنطة السوداء، فقد حقق التركيز 4.5% أعلى معدل للصفة بلغ 76.70% مختلفاً بذلك معنوياً عن التركيزين 1.5 و 6.0% اللذين حققا معدلاً أقل للصفة بلغ 46.70 و 43.30% بالتتابع. فيما لم يختلف ذلك التركيز معنوياً قياساً بالمعاملة بالتركيز 3.0% الذي حقق معدلاً للصفة بلغ 60%.ويشير الجدول نفسه إلى عدم وجود فرق في تأثير مدة المعاملة بمحلول هايبوكلورات الصوديوم في نسبة البقاء والحصول على بادرات سليمة من نباتات الحنطة السوداء. كما أدى التداخل بين تراكيز محلول هايبوكلورات الصوديوم والمدة الزمنية للمعاملة إلى زيادة نسبة الحصول

تركيز المركب في العينة = (مساحة حزمة المركب / مساحة حزمة النموذج القياسي) × تركيز النموذج القياسي (مايكروغرام. مل$^{-1}$).

جدول 1. بعض مواصفات جهاز كروموتوكرافيا السائل ذي الأداء العالي (HPLC) المُستعمل في عملية التشخيص الكمي والنوعي للمركبات الفينولية.

نوع العمود	HPLC
الشركة و الموديل	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
أبعاد العمود	(50× 4.6 mm I.D) C-18 column
الطور المتحرك	Solvent A:0.1% phosphoric acid in deionized water, Solvent B: 50:50 V/v, 0.1% phosphoric acid in deionized water: acetonitrile HPLC grade, linear gradients 0%b-100%B
حجم الجزيئات	Particle size 3µm
سرعة الجريان	1.4 ml./min.
نوع وعدد المضخات	Binary delivery pump model LC-10ATVP shimadzu

جدول 2. تأثير تراكيز مختلفة من هايبوكلورات الصوديوم (NaOCl) ومدة التعقيم والتداخل بينهما في النسبة المئوية لبقاء بذور الحنطة السوداء بعد 14 يوم من الزراعة على وسط MS.

مدة التعقيم (دقيقة)	تركيز هايبوكلورات الصوديوم NaOCl (%)				المتوسط
	1.5	3.0	4.5	6.0	
10	30.00	30.00	80.00	60.00	50.00
20	40.00	70.00	90.00	40.00	60.00
30	70.00	80.00	60.00	30.00	60.00
المتوسط	46.70	60.00	76.70	43.30	
L.S.D 0.05	المدة= n.s التراكيز=24.23** التداخل=41.96*				

على بادرات سليمة غير ملوثة من نباتات الحنطة السوداء فقد تفوقت المعاملة بالتركيز 4.5% لمدة 20 دقيقة معنوياً وأعطت أعلى معدل للصفة بلغ 90%، في حين أعطت المدة 10 دقائق عند التركيزين 1.5 و 3.0% أقل معدل لصفة الحصول على بادرات سليمة وغير ملوثة من بذور نباتات الحنطة السوداء بلغت 30% لكل من المعاملتين بالتتابع (جدول 2). هذهِ النتيجة تؤكد مدى الفعالية التي يتميز بها محلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl في القضاء على أغلب الأحياء المجهرية التي يمكن أن تؤثر على نمو الجزء النباتي المزروع وبالتالي منع تلك الكائنات من منافسة ذلك الجزء المزروع على المواد الغذائية أو إفراز المواد السامة التي من الممكن ان تؤثر في الجزء النباتي

وتسبب فشل عملية الزراعة النسيجية (11). أن معنوية التداخل للصفة أنفة الذكر تشير إلى تباين تأثير التراكيز المختلفة من محلول هايبوكلورات الصوديوم بإختلاف مدة المعاملة، وبذلك يمكن الإعتماد على نتيجة التولفية التي تم بموجبهاالحصول على أعلى معدل معنوي للصفة انفة الذكر لغرض إستنبات البذور للحصول على السويقة تحت الفلقية بوصفها الجزء النباتي المستخدم في الدراسة للحصول على نسيج الكالس من نباتات الحنطة السوداء. جاءت هذهِ النتيجة متفقة مع ما أشارت اليه كثير من الدراسات حول فعالية مادة هايبوكلورات الصوديوم في إنتاج بادرات سليمة خالية من التلوث (1 و 2 و 6).

تأثير تراكيز مختلفة من منظمي النمو 2,4-D و Kinetin والتداخل بينهما في الوزن الطري للكالس: أشارت نتائج الجدول 3 إلى وجود تأثير معنوي لإضافة منظم النمو 2,4-D وبتراكيز مختلفة في زيادة الوزن الطري للكالس المستحث من السويقة تحت الفلقية لنبات الحنطة السوداء، إذ حققت الإضافة بالتركيز2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى معدل للصفة (306.1 ملغم)، ومع أن ذلك التفوق لم يصل حدود المعنوية مقارنةً بالتركيز 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ والذي حقق معدلاً للصفة بلغ 282.9 ملغم، إلا أن ذلك التفوق قد تجاوز حدود المعنوية قياساً بباقي التراكيز: 0 و 1.0 أو 4.0 ملغم.لتر$^{-1}$ وبنسبة زيادة معنوية عنها بلغت 955.5 و 21.5 أو 21.7% بالتتابع. وقد يعزى السبب إلى دور الأكسينات ومنها منظم النمو 2,4-D في تحفيز إستطالة الخلايا النباتية من خلال دورهِ الفعال في تحفيز ليونة الجدار الخلوي، إذ يتسبب في كسر روابط ذلك الجدار وإعادتها إلى مواقع جديدة تحت تأثير الضغط الإنتفاخي مما يساهم في زيادة حجم الخلية وإتساعها، هذا بالإضافة إلى تاثيرها في الإنزيمات المسؤولة عن بناء مكونات الجدار الخلوي وتحللها وبالتالي التاثير في الخصائص الميكانيكية لذلك الجدار وفي مقدمتها زيادة نفاذيته (21). بشان تأثير تراكيز إضافة منظم النمو الكاينتين لإستحثاث نسيج الكالس من السويقة تحت الفلقية لنبات الحنطة السوداء فقد لوحظ وجود فروقات معنوية في معدل الوزن الطري لنسيج الكالس عند التركيز 1.0 ملغم. لتر$^{-1}$ قياساً بباقي التراكيز وهي: 0 و 0.5 أو 1.5 ملغم.لتر$^{-1}$ ، والتي حققت معدلاً أقل للصفة بلغ 113.8 و 218.6 أو 257.1 ملغم بالتتابع. وهذه النتيجة تؤكد جدوى زيادة تركيز السايتوكينينات لما لهُ من دور كبير في زيادة إنقسام الخلايا البرنكيمية التي فقدت تخصصها وتحولت إلى خلايا مرستيمية مما تؤدي إلى زيادة حجم الأنسجة المختلفة بعد عدة أيام من الزراعة (2 و 4). بينت النتائج في الجدول 3 أن لتداخل كل عاملي الدراسة كليهما تأثيراً معنوياً في زيادة الوزن الطري لنسيج الكالس المستحث من السويقة تحت الفلقية لنبات الحنطة السوداء، إذ حققت التوليفة 3.0 ملغم2,4-D.لتر$^{-1}$ مع 1.0 ملغم كاينتين.لتر$^{-1}$ أعلى معدل للصفة بلغ 433.2 ملغم، متفوقة بذلك معنوياً على معظم التداخلات الثنائية بين تراكيز إضافة منظمي النمو 2,4-D والكاينتين، إذ لم تطرأ أي استجابة لتكوين الكالس من الجزء النباتي المستخدم في الدراسة عند غياب منظمي النمو 2,4-D و الكاينتين عن الوسط الغذائي المُعد لتنمية لإستحثاث الكالس فيه. أن من المهم خلق حالة من التوازن الدقيق بين تركيزي الأوكسينات والسايتوكاينينات في الوسط الغذائي لأن الزيادة الحاصلة في السايتوكانينات نسبة إلى الاوكسين تحفز تكوين الافرع الخضرية (12) في حين أن النسب العالية من الأوكسين إلى السايتوكاينين تشجع تكوين الجذور العرضية والمستويات المتوازنة منهما تؤدي إلى إستمرار الكالس بالنمو (23).

جدول 3. تأثير تراكيز مختلفة من منظمي النمو 2,4-D و Kinetin والتداخل بينهما في متوسط الوزن الطري (ملغم) للكالس المستحث من زراعة السويقة تحت الفلقية بعد خمسة أسابيع من الزراعة على وسط MS.

2,4-D (ملغم.لتر$^{-1}$)	Kintin (ملغم.لتر$^{-1}$)				المتوسط
	0	0.5	1.0	1.5	
0	000.0	16.6	41.3	58.1	29.0
1.0	94.5	249.1	325.1	339.2	252.0
2.0	182.6	312.9	376.9	352.2	306.1
3.0	176.0	254.3	433.2	268.0	282.9
4.0	115.8	260.3	362.2	268.0	251.6
المتوسط	113.8	218.6	307.7	257.1	
L.S.D 0.05	2,4-D= 38.71**			Kin.= 34.62**	
	2,4-D×Kin.=77.42**				

تأثير تراكيز مختلفة من منظمي النمو 2,4-D و Kinetin والتداخل بينهما في الوزن الجاف للكالس

يتضح من الجدول 4 وجود تأثير معنوي لإضافة التراكيز المختلفة من منظم النمو 2,4-D في الوزن الجاف لنسيج الكالس المستحث من السويقة تحت الفلقية لنبات الحنطة السوداء فقد حقق التركيز 2.0 ملغم. لتر$^{-1}$ أعلى معدل بلغ 24.35 ملغم تفوق من خلالها معنوياً على اغلب معاملات إضافة منظم النمو 2,4-D وهي 0 ، 1.0 أو 4.0 ملغم.لتر$^{-1}$ والتي حققت معدلاً للصفة بلغ 3.18 ، 20.10 أو 20.08 ملغم بالتتابع في حين لم يصل ذلك التفوق حدود المعنوية قياساً بمعاملة إضافة منظم النمو 2,4-D بالتركيز 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ والتي أعطت وزناً جافاً بلغ 22.33 ملغم. تجدر الإشارة هنا إلى أن المعاملة ذاتها هي من حققت اعلى معدل للوزن الطري لنسيج الكالس المستحث من السويقة تحت الفلقية لنبات الحنطة السوداء وتفوقها هنا ربما يكون إمتداداً لذلك التفوق (جدول 4). حققت الزيادة في إضافة تركيز منظم النمو الكاينتين تأثيراً معنوياً في هذه الصفة، فقد حقق التركيز 1.0 ملغم. لتر$^{-1}$ اعلى معدل للوزن الجاف لكالس نبات الحنطة السوداء بلغ 25.28 ملغم تفوق من خلاله معنوياً على باقي تراكيز الكاينتين المضافة. أما بالنسبة للتداخل بين تراكيز كل من منظمي النمو 2,4-D و الكاينتين المضافة إلى الوسط الغذائي المُعد لتنمية نسيج الكالس المستحث من نباتات الحنطة السوداء ، فقد أظهرت النتائج في الجدول 4 وجود تأثير معنوي في هذا التداخل، إذ حققت التوليفة 3.0 و 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ لكل من منظمي النمو 2,4-D والكاينتين بالتتابع معدلاً للوزن الجاف لنسيج الكالس بلغ 34.61 ملغم متفوقاً بذلك على جميع التوليفات الداخلة في الدراسة بغض النظر عن معنويتها من عدمه وبينما لم نلاحظ بأن هذا التفوق قد وصل لحدود المعنوية مقارنةً ببعض توليفات كلاً من منظمي النمو 2,4-D والكاينتين لكننا نجد بأن هذهِ التوليفة قد تجاوزت حدود المعنوية قياساً بأغلب التوليفات لمنظمي النمو 2,4-D والكاينتين قيد الدراسة، كما نجد عدم حدوث أي نشوء للكالس من الجزء النباتي المستعمل في الدراسة والمنمى في وسط MS خالٍ من منظمي النمو انفي الذكر. وهذا ما أشارت اليهِ الكثير من الدراسات من خلال تأكيدها ضرورة التوازن بين السايتوكاينين والأوكسين للمحافظة على ديمومة نمو وتطور الجزء النباتي، إذ يعمل السايتوكاينين من خلال إحتوائهِ على الأدنين كمفتاح للبدء بعملية الإنقسام الخلوي (9). في حين يؤثر منظم النمو 2,4 –D على أيض النبات عن طريق تصنيع البروتينات بالتالي التأثيرفي فعالية الإنزيمات و التنفس وانقسام الخلية (2).

جدول 4. تأثير تراكيز مختلفة من منظمي النمو 2,4-D و Kinetin والتداخل بينهما في متوسط الوزن الجاف (ملغم) للكالس المستحث من زراعة السويقة تحت الفلقية بعد خمسة أسابيع من الزراعة على وسط MS.

2,4-D (ملغم.لتر$^{-1}$)	Kinetin(ملغم.لتر$^{-1}$)				المتوسط
	0	0.5	1.0	1.5	
0	0.00	1.36	6.74	4.60	3.18
1.0	7.66	19.76	25.99	27.01	20.10
2.0	14.49	24.57	30.23	28.11	24.35
3.0	13.97	19.84	34.61	20.90	22.33
4.0	9.17	20.73	28.81	21.63	20.08
المتوسط	9.06	17.25	25.28	20.45	
L.S.D 0.05	2,4-D=3.289**			Kin.= 2.942**	
	2,4-D×Kin.=6.578**				

تاثير حامض السالسيليك والبراسينولايد وجاسمونات المثيل في الوزن الطري والجاف (ملغم) للكالس المستحث من السويقة تحت الفلقية لنباتات الحنطة السوداء:

أظهرت النتائج في الجدول (5) وجود فروقات معنوية في التأثير على كل من منظمات النمو حامض السالسيليك والبراسينولايد وجاسمونات المثيل في الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من زراعة السويقة تحت الفلقية لنبات الحنطة السوداء عند إضافتها بتراكيز مختلفة إلى الوسط الغذائي MS. كما يلاحظ من الجدول 5 أن منظم النمو حامض السالسيليك قد حقق أعلى معدل للوزن الطري للكالس عند المعاملة بالتركيز 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ بلغ 349.4 ملغم تفوق من خلاله على كافة التراكيز الداخلة في الدراسة، ومع

انهُ لم يختلف معنوياً عن معاملة المقارنة والتي أعطت معدلاً للوزن الطري للكالس بلغ 317.7 ملغم، إلا ان كلاهما قد إختلفا معنوياً عن باقي تركيزي السالسيليك 2.0و3.0 ملغم. لتر$^{-1}$ اللذان سببا إنخفاضاً معنوياً للوزن الطري للكالس 289.1 و 292.9 ملغم بالتتابع.

جدول 5. تأثير تراكيز مختلفة من بعض منظمات النمو النباتية في الوزن الطري والجاف (ملغم) للكالس المستحث من الحنطة السوداء في وسط غذائي MS حاوي على 3.0ملغم.لتر$^{-1}$ من 2,4-D و1.0ملغم.لتر$^{-1}$ من الكاينتين بعد أربعة أسابيع من النمو على وسط MS.

منظمات النمو النباتية		الوزن الطري	الوزن الجاف
المنظم	التركيز (ملغم.لتر$^{-1}$)		
Salicylic acid	**0**	317.7	26.4
	1.0	349.4	27.7
	2.0	289.1	22.2
	3.0	292.9	23.5
Brassinolide	**0.025**	300.4	23.1
	0.050	285.3	22.9
	0.10	296.7	23.0
Methyl Jasmonate	**0.025**	149.9	8.7
	0.050	114.9	7.4
	0.075	96.3	6.9
L.S.D 0.05		**32.02***	**2.68****

كما حققت معاملة البراسينولايد للكالس المستحث من السويقة تحت الفلقية لنبات الحنطة السوداء بالتركيز 0.050 ملغم.لتر$^{-1}$ إنخفاضاً معنوياً في الوزن الطري للكالس وبنسبة بلغت 11.36% قياساً بمعاملة المقارنة، فيما لم يصل الإنخفاض في الوزن الطري للكالس حدود المعنوية عند باقي تركيزي البراسينولايد. أما المعاملة بمثبط النمو جاسمونات المثيل فقد سببت تراكيزهُ الثلاث إنخفاضاً معنوياً في الوزن الطري للكالس قياساً بمعاملة المقارنة وباقي المعاملات قيد الدراسة، إذ حققت معدلاً للصفة بلغ 149.9 و 114.9 و 96.3 ملغم بالتتابع. أما بخصوص الوزن الجاف للكالس المستحث من السويقة تحت الفلقية لنبات الحنطة السوداء فقد استمر تفوق المعاملة بالسالسيليك أسيد وبالتركيز 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ بتحقيقه أعلى معدل للوزن الجاف بلغ 27.7 ملغم متفوقاً بذلك معنوياً عن الكالس المعامل بالتركيزين 2.0 و3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ اللذان اعطيا معدلاً للوزن الجاف للكالس بلغ 22.2 و 23.5 ملغم بالتتابع. كما سببت معاملة الكالس بمنشط النمو البراسينولايد بالتركيز 0.025 ، 0.050 أو 0.10 ملغم.لتر$^{-1}$ إنخفاضاً معنوياً للوزن الجاف للكالس قياساً بمعاملة المقارنة وبنسبة إنخفاض عنها بلغت 14.29 و 15.28 و 14.78% بالتتابع. أيضاً أختلفت الأوزان الجافة للكالس المنمى بالتراكيز المختلفة من جاسمونات المثيل، إذ أعطت تلك التراكيز أدنى معدلات الوزن الجاف للكالس واختلفت بذلك معنوياً عن معاملة المقارنة وباقي المعاملات الداخلة في الدراسة.

تأثير حامض السالسيليك والبراسينولايد وجاسمونات المثيل في إنتاج مضادات الأكسدة من كالس نبات الحنطة السوداء.

أظهرت النتائج في الجدول 6 وجود تاثير لمعاملات إضافة منظم النمو حامض السالسيليك في رفع إنتاج مركب Caffeic acid فقد حقق التركيز 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى إنتاج لهُ بلغ 21.534 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ في حين أعطت المعاملة بالتراكيز 1.0 و 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ قيمة أدنى لهذا المركب بلغ 14.727 و 14.620 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ بالتتابع، وكلاهما كان قد أظهر تفوقاً ملحوظاً قياساً بمعاملة المقارنة التي أعطت قيمة أقل لهذا المركب بلغ 9.214 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$.أما بالنسبة لمنظم النمو البراسينولايد فقد حققت المعاملة بالتراكيز 0.10 و 0.050 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى قيم إنتاج هذا المركب بلغت 28.189 و 28.519 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ بالتتابع تفوقت بذلك على كافة التراكيز الداخلة بالدراسة في ذات الوقت التي تفوقت بهِ على إضافة منظم النمو البراسينولايد بالتركيز 0.025 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي اعطى قيمة لإنتاج المركب بلغ 15.785 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$. كما أظهرت النتائج وجود تأثير إيجابي لمنظم النمو جاسمونات المثيل في رفع إنتاج مركب Caffeic acid من خلال تضمينهُ للوسط الغذائي المُعد للزراعة بالتركيز 0.075 ملغم.لتر$^{-1}$ والذي حقق إنتاجاً للمركب بلغ 26.817 مايكروغرام.100 ملغم$^{-1}$ بينما حققت التراكيز 0.025 و 0.050 ملغم.لتر$^{-1}$ قيماً أدنى لإنتاجهِ بلغ 14.319 و 9.122 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ بالتتابع. ربما يعزى سبب التباين في إنتاج هذا المركب إلى إختلاف آلية عمل منظمات النمو النباتية الداخلة في الدراسة فضلاً إلى إختلاف قيم الإنتاج لهذا المركب بإختلاف التركيز المستخدم. يُظهرالجدول 6 عدم وجود أي تاثير واضح

لحامض السالسيليك في تحسين إنتاج مركب Vanillic acid قياساً بمعاملة المقارنة والتي اعطت قيمة لإنتاجهِ مقاربة لتلك القيم التي حققها حامض السالسيليك على مدى تراكيزهِ الثلاث الداخلة في الدراسة. بينما نجد بان منظم النمو البراسينولايد هو من اعطى اعلى قيم الإنتاج لهذا المركب على الإطلاق والمتمثلة بالتراكيز 0.050 و 0.10 ملغم.لتر$^{-1}$ اللذان حققا إنتاجاً للمركب بلغ 19.774 و 19.491 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ بالتتابع ومع إنهما لم يختلفا فيما بينهما بشكل كبير إلا ان كلاهما قد تفوق على التركيز 0.025 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي أعطى قيمة لإنتاج المركب بلغت 14.718 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$. بينما سببت معاملة الكالس بجاسمونات المثيل في خفض تركيز مركب Vanillic acid بزيادة تركيز الإضافة، إذ أعطت التراكيز الثلاثة لجاسمونات المثيل 0.025 و 0.050 و 0.075 ملغم.لتر$^{-1}$ قيماً لإنتاج المركب بلغ 14.839 و 4.025 و 3.580 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ بالتتابع. ان تفوق أغلب معاملات تقنية زراعة الانسجة النباتية في زيادة إنتاج هذا المركب هو أمر طبيعي لما لهذهِ التقنية من دور كبير في توفير الظروف المثالية لنمو الخلايا النباتية المكونه لنسيج الكالس فضلاً عن دورها في توفير كمية كبيرة من الطاقة يمكن ان تُستغل من قبل الخلايا النباتية في زيادة بناء وتراكم كثير من المركبات المهمة (22). اما تفوق معاملة البراسينولايد في إنتاج مركب Vanillic acid فقد يعزى إلى الدور الكبير الذي يؤديه منشط النمو البراسينولايد في زيادة تمثيل الأحماض النووية والبروتينات وتنظيم التعبير الجيني للخلية النباتية من خلال رفع القدرة الإمتصاصية للماء من قبل الخلية النباتية وتحسين معظم العمليات الفسيولوجية داخلها مما يؤدي بالتالي إلى إحداث عمليتي الإنقسام والإستطالة للخلية النباتية (2). بينت النتائج إمكانية زيادة إنتاج مركب Gentisic acid عند إستخدام بعض منظمات النمو النباتية وبتراكيز معينة (جدول 6) فقد حققت معاملة نسيج الكالس بحامض السالسيليك بالتركيز 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى قيم إنتاج المركب بصورة عامة بلغ 24.808 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ في حين أعطى التركيز 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ قيمة أقل لإنتاج المركب بلغت 23.182 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ وكلاهما قد تفوق على معاملتي المقارنة والتركيز 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ اللذان حققا قيمة لإنتاج المركب بلغ 16.690 و 16.001 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ بالتتابع. أما البراسينولايد فقد حققت التراكيز 0.050 و 0.10 ملغم.لتر$^{-1}$ قيماً لإنتاج المركب بلغ 24.025 و 23.797 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ بالتتابع وكلاهما قد إختلف عن التركيز 0.025 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي اعطى قيمة لإنتاج المركب بلغ 16.552 مايكروغرام. 100 ملغم$^{-1}$. وبنفس الطريقة كان لجاسمونات المثيل دوراً بالغ الأهمية في تحسين إنتاج نسيج الكالس لهذا المركب وحققت تراكيزهُ الثلاث 0.025 و 0.050 و0.075 ملغم.لتر$^{-1}$ قيماً لإنتاج المركب بلغ 23.905 و 19.390 و 23.671 مايكروغرام. 100 ملغم$^{-1}$ بالتتابع. أن تفوق معاملة حامض السالسيليك ربما يعود لقدرتهِ على الحفاظ على ثباتية الأغشية الخلوية وزيادة تمثيل CO_2 وتراكم المادة الجافة وزيادة إمتصاص الماء والعناصر الغذائية والمعدنية تحت ظروف الإجهاد(19 و 24) وذلك من خلال إمتلاكه لألية المقاومة المكتسبة الجهازية للنبات (SAR) التي تعمل على صيانة الكيمياء العضوية للخلية النباتية من اثر الأفرازات السمية (10 و14). يوضح الجدول 6 إمكانية تحفيز إنتاج مركب Chlorogenic acid عند إستخدام بعض منظمات النمو النباتية وبتراكيز مختلفة، إذ حقق منظم النمو حامض السالسيليك زيادة في إنتاج المركب عند إضافتهِ للوسط الغذائي المُعد لتحفيز الكالس ومع أن تراكيز الإضافة الثلاث 1.0 و 2.0 و 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ لم تختلف كثيراً فيما بينها في كمية المنتج لهذا المركب وحققت قيمة لإنتاجهِ بلغ 14.978 و 14.230 و 14.62 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ بالتتابع، إلا أن التراكيز الثلاثة قد إختلفت وبشكل واضح عن معاملة المقارنة التي أعطت قيمة لإنتاج المركب بلغ 12.642 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$. ومع هذا نجد بأن البراسينولايد هو من حقق أعلى قيم الإنتاج لهذا المركب على الإطلاق إذ أظهرت النتائج زيادة في الإنتاج بزيادة تركيز إضافة البراسينولايد لتصل عند التركيز 0.10 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى قيمة للمركب بلغ 23.749 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ في حين حقق التركيز0.050 ملغم.لتر$^{-1}$ قيمة للإنتاج بلغت 15.919 مايكروغرام. 100 ملغم$^{-1}$ واختلفت بدورها عن المعاملة بالتركيز 0.025 ملغم. لتر$^{-1}$ وما حققتهُ لإنتاج هذا المركب بلغ 12.850

مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$. أما جاسمونات المثيل فقد حقق التركيز 0.025 ملغم. لتر$^{-1}$ قيمة لإنتاج هذا المركب بلغ 15.701 مايكروغرام .100ملغم$^{-1}$ تفوق من خلالها على باقي تراكيز المعاملة بهِ: 0.050 و 0.075 ملغم.لتر$^{-1}$ اللذان حققا قيمة لإنتاج المركب بلغ 10.676 و 14.367 مايكروغرام .100ملغم$^{-1}$ بالتتابع. أن تفوق البراسينولايد لهُ دليل على القدرة العالية التي يتمتع بها هذا المركب من خلال صيانة الأجزاء الخلوية وإدامة فعالياتها الحيوية إذ يؤدي إلى إزالة التاثيرات السمية التي تسببها بعض المركبات المنتجة داخل الخلية ومنها بيروكسيد الهيدروجين وبالتالي زيادة نفاذية غشاء الخلية وزيادة القدرة على القيام بعملية التمثيل الضوئي والتخفيف من ضرر الإجهاد التأكسدي (17). بينت النتائج في الجدول 6 وجود تباين في مدى إنتاج مركب Orientin بإختلاف منظمات النمو النباتية وتراكيزها، إذ سببت إضافة حامض السالسيليك تحفيزاً لنسيج الكالس في إنتاج هذا المركب وحقق التركيز 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ قيمة لإنتاجهِ بلغ 10.995 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ تفوق من خلالها على باقي تراكيز الإضافة 1.0 و 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ اللذان أعطى قيمة لإنتاج المركب بلغت 11.744 و11.477 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ بالتتابع ومع هذا فقد تفوقت جميع تراكيز حامض السالسيليك في إنتاج المركب قياساً بمعاملة المقارنة التي أعطت أدنى قيم الإنتاج لهذا المركب بلغ 7.412 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$. وبنفس الأسلوب زادت تراكيز إضافة منظم النمو البراسينولايد من قيم إنتاج المركب وحقق التركيز العالي 0.10 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى قيمة لإنتاج هذا المركب على الأطلاق بلغ 19.651 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ تفوق من خلالها على التركيز 0.050 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي أعطى قيمة لإنتاج المركب بلغت 15.517 مايكروغرام.100 ملغم$^{-1}$ واختلف بدورهِ عن التركيز 0.025 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي أظهرت النتائج أعطائهِ قيمة لإنتاج المركب بلغت 7.550 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ أيضاً ساهمت تراكيز جاسمونات المثيل في رفع وتحسين إنتاج هذا المركب وحقق التركيز 0.025 ملغم.لتر$^{-1}$ قيمة لإنتاج المركب بلغ 12.018 مايكروغرام .100ملغم$^{-1}$ تفوق من خلالها على باقي تراكيز المعاملة بمنظم النمو جاسمونات المثيل (0.050 و 0.075 ملغم.لتر$^{-1}$) اللذان أعطى قيمة لإنتاج ذات المركب بلغ 11.112 و 6.717 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ بالتتابع. وأن هذا الإختلاف في إنتاج مركب Orientin بإختلاف منظمات النمو النباتية ربما يعود إلى الأختلاف في آلية الإنتقال والإستجابة لتلك المنظمات من قبل الخلية النباتية بإختلاف تراكيزها. يُلاحظ في الجدول 6 تحقيق التراكيز المختلفة لمنظمات النمو النباتية تأثيراً واضحاً في مدى تحسن إنتاج مركب Vitexin من كالس نبات الحنطة السوداء، إذ أظهرت النتائج وجود تأثير لإضافة حامض السالسيليك بالتركيز 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ زيادة في قدرة نسيج الكالس على تحفيز بناء هذا المركب وأعطى قيمة لإنتاجهِ بلغت 9.825 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ تفوق من خلالها على باقي تراكيز المعاملة بهذا المنظم (2.0 و 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$) اللذان أعطى قيمة لإنتاج المركب بلغت 6.669 و 4.584 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ بالتتابع في حين أعطت معاملة المقارنة قيمة لإنتاج المركب بلغت 4.742 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$. كما حققت تراكيز منظم النمو البراسينولايد زيادة في كمية المنتج من هذا المركب وأظهرت النتائج تحقيق التركيز العالي لهذا المنظم (0.10 ملغم.لتر$^{-1}$) أعلى القيم في إنتاجهِ وبصوره عامة بلغ 10.639 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ تفوق بها على التركيز (0.050 ملغم.لتر$^{-1}$) الذي أعطى قيمة بلغت 5.903 مايكروغرام.100 ملغم$^{-1}$ ولم يختلف بشكل كبير عن ما حققهُ التركيز (0.025 ملغم.لتر$^{-1}$) بإعطائهِ قيمة لإنتاج هذا المركب بلغ 5.272 مايكروغرام.100 ملغم$^{-1}$. كما أظهرت تراكيز المعاملة بمنظم النمو جاسمونات المثيل زيادة كمية إنتاج المركب بزيادة تلك التراكيز وحقق التركيز 0.075 ملغم.لتر$^{-1}$ قيمة عالية لإنتاج المركب بلغ 9.458 مايكروغرام .100ملغم$^{-1}$ إختلف بذلك وبشكل كبير عن ما أنتجتهُ التراكيز (0.025 و 0.075 ملغم.لتر$^{-1}$) والذي بلغ 5.828 و 4.405 مايكروغرام.100 ملغم$^{-1}$ بالتتابع. نجد هنا بأن التراكيز العالية من منظمي النمو البراسينولايد وجاسمونات المثيل قد تفوقت على التراكيز الأدنى في إنتاج هذا المركب. ربما يعزى السبب إلى تحقيق تلك التراكيز اعلى مستوى من الإجهاد للخلايا النباتية أثر سلباً في مسالك إنتاج المركبات الأولية بإتجاه تراكم المركبات الثانوية ومنه مركب Vitexin. أثبتت منظمات النمو النباتية بأنها طريقة فعالة

في رفع إنتاج مركب Isovitexin خارج الجسم الحي لنباتات الحنطة السوداء، كما أظهرت التراكيز المختلفة من منظمات النمو النباتية إختلافاً في إنتاج هذا المركب (جدول 6). مع هذا تفوقت معاملة إضافة منظم النمو السالسيليك أسيد بالتركيز 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ في تحفيز نسيج الكالس لإنتاج المركب عن باقي المعاملات الداخلة في الدراسة وحقق أعلى قيم الإنتاج على الإطلاق بلغ 21.888 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ تفوق من خلالها على معاملة المقارنة ومعاملة الكالس بالتركيز(1.0 و 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$) والتي اعطت قيماً لإنتاج المركب بلغ 16.600 و 15.421 و 16.155 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ بالتتابع. أما منظم النمو البراسينولايد فلم تُظهر النتائج وجود تحسن واضح لهُ في إنتاج هذا المركب بل بالعكس ساهمت بعض تراكيزه في خفض إنتاج هذا المركب. في حين ساهمت تراكيز جاسمونات المثيل في رفع إنتاج هذا المكرب وكان التركيز 0.025 ملغم.لتر$^{-1}$ هو من تفوق عن باقي تراكيز جاسمونات المثيل في قيمة ما انتجهُ من هذا المركب إذ بلغ 20.121 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ تفوق من خلالها على التركيز 0.050 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي أعطى قيمة لإنتاج المركب بلغ 18.175 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وكلاهما قد تفوق على التركيز 0.075 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي أعطى قيمة لإنتاج المركب بلغ 17.152 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$. وهذهِ النتيجة جاءت منطقية قياساً مع مايتمتع بهِ السالسيليك أسيد من دور بارز في تحفيز جينات الأنزيمات المضادة للأكسدة ليساهم بذلك في إزالة سمية الجذور الحرة ليحمي النبات من ضرر الإجهاد التأكسدي وبالطبع مركب Isovitexin هو واحد من أهم مضادات الأكسدة النباتية (5 و 13 و 15) . كما نلاحظ من الجدول 6 بأن كلا منظمات النمو النباتية تراكيزها المختلفة قد أثرت في مدى إنتاج هذا مركب Quercetin الحيوي، إذ أثر منظم النمو حامض السالسيليك وبشكل كبير في رفع القدرة البنائية لهذا المركب من نسيج الكالس لنباتات الحنطة السوداء وحقق التركيز 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ إنتاجاً للمركب بلغ 17.112 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ تفوق من خلالهِ على كافة المعاملات قيد الدراسة ومنها المعاملة بحامض السالسيليك بالتركيز 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ والتي اعطت إنتاجاً للمركب بلغ 11.00 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وكلا التراكيز آنفة الذكر قد تفوقت على معاملة المقارنة والتركيز 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ اللذان حققا قيمة منخفضة لإنتاج هذا المركب بلغ 9.024 و 8.841 مايكروغرام.100 ملغم$^{-1}$ بالتتابع. أيضاً ساهمت تراكيز البراسينولايد في رفع إنتاج هذا المركب وحقق التركيز 0.025 ملغم.لتر$^{-1}$ إنتاجاً للمركب بلغ 13.433 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ تفوق من خلالهِ على باقي التراكيز المعاملة بهذا المنظم (0.050 و 0.10 ملغم.لتر$^{-1}$) التي خَفضت من كمية المنتج لهذا المركب قياساً بالتركيز آنف الذكر إذ أعطت قيمة بلغ 12.772 و 9.387 مايكروغرام .100ملغم$^{-1}$ بالتتابع. كما حسنت تراكيز منظم النمو جاسمونات المثيل وبشكل ملحوظ من إنتاج هذا المركب الحيوي بزيادة تركيز المعاملة، إذ حقق التركيز 0.075 ملغم.لتر$^{-1}$ قيمة بلغ 14.562 مايكروغرام. 100 ملغم$^{-1}$ تفوق من خلالها على التركيز 0.050 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي اعطى إنتاجاً لهذا المركب بلغ 11.743 وتفوق بدورهِ عن التركيز 0.025 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي أعطى أدنى قيم الإنتاج لهذا المركب على الإطلاق بلغ 8.804 مايكروغرام.100 ملغم$^{-1}$. يتضح من الجدول 6 الدور الكبير والفعال الذي ساهمت بهِ منظمات النمو النباتية في رفع إنتاج مركب Rutin من كالس نباتات الحنطة السوداء، إذ أظهر الشكل آنف الذكر الفرق الكبير بين إنتاج هذا المركب بإستخدام التراكيز المختلفة لتلك المنظمات. فقد حقق حامض السالسيليك تحسناً واضحاً في قدرة إنتاج نسيج الكالس لهذا المركب وكانت التراكيز(2.0 و3.0ملغم.لتر$^{-1}$) قد حققت إنتاجاً لهذا المركب بلغ 52.902 و 53.336 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ بالتتابع تفوقت من خلالهِ على ما أنتجتهُ معاملتي المقارنة والتركيز1.0ملغم.لتر$^{-1}$ اللذان اعطى أدنى قيمة أقل لإنتاج هذا المركب بلغ 39.081 و 39.604 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ بالتتابع. أما البراسينولايد فتحسينهُ لإنتاج هذا المركب واضح وفعال من خلال ماحققهُ التركيز 0.10 ملغم.لتر$^{-1}$ من قيمة لإنتاج هذا المركب بلغ 87.584 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ تفوق من خلالهِ على التركيز 0.050 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي أعطى قيمة أقل للمركب بلغ 61.510 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ ومع هذا نجد بانهُ قد تفوق على التركيز 0.025 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي أظهرت النتائج تحقيقهُ لإنتاج بلغ 56.544 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$. كذلك حسنت

تراكيز منظم النمو جاسمونات المثيل في قيمة ماتم إنتاجهُ لهذا المركب من نسيج الكالس لنباتات الحنطة السوداء وأظهرت المعاملة بالتركيز 0.050 ملغم.لتر$^{-1}$ قيمة لإنتاج هذا المركب بلغ 77.414 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ تفوقت على المعاملة بالتركيز 0.075 ملغم.لتر$^{-1}$ التي أعطت قيمة لإنتاج المركب بلغ 53.581 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ في حين سببت المعاملة بالتركيز 0.025 ملغم.لتر$^{-1}$ في الحصول على أدنى قيم الإنتاج على الإطلاق بلغ 37.696 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$. كما يتضح من الجدول 6 الدور الفعال لمنظمات النمو النباتية في رفع إنتاج مركب Coumaric acid كما يتضح لنا جلياً مدى التباين في كمية إنتاج هذا المركب عند كل تركيز من تراكيز منظمات النمو النباتية الداخلة في الدراسة. على العموم فقد حقق منظم النمو حامض السالسيليك عند إضافتهِ بالتركيز 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ إلى الوسط الغذائي المنمى عليهِ نسيج الكالس المستحث من السويقة تحت الفلقية لنبات الحنطة السوداء أعلى إنتاج لمركب Coumaric acid بلغ 29.551 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وتفوق على باقي معاملات حامض السالسيليك (1.0 و 3.0ملغم.لتر$^{-1}$) اللذان أعطى قيماً لإنتاج هذا المركب بلغ 18.651 و 22.741 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ بالتتابع وكلاهما قد تفوق على معاملة المقارنة التي اعطت إنتاجاً للمركب بلغ 17.299 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$. وساهم منظم النمو البراسينولايد في رفع إنتاج المركب وحقق التركيز 0.10 ملغم.لتر$^{-1}$ قيمة لإنتاج المركب بلغ 28.666 مايكروغرام.100 ملغم$^{-1}$ تفوق من خلالها على ماحققهُ التركيز 0.050 ملغم.لتر$^{-1}$ من قيمة لإنتاج المركب بلغ 22.339 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ فيما أعطى التركيز 0.025 ملغم.لتر$^{-1}$ أدنى قيم الإنتاج لهذا المركب على الإطلاق بلغ 6.968 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$. كم حسنت تراكيز جاسمونات المثيل في قيمة المنتج من هذا المركب وحققت تراكيزها الثلاث (0.025 و 0.050 و 0.075 ملغم. لتر$^{-1}$.

جدول 6. تأثير المعاملة بالتراكيز المختلفة من حامض السالسيليك والبراسينولايد وجاسمونات المثيل في إنتاج بعض مضادات الأكسدة من كالس نبات الحنطة السوداء.

Methyl Jasmonate (ملغم. لتر$^{-1}$)			Brassinolide (ملغم. لتر$^{-1}$)			Salicylic acid (ملغم . لتر$^{-1}$)				المركب(مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$)
0.075	0.050	0.025	0.10	0.050	0.025	3.0	2.0	1.0	C_0	
26.817	9.122	14.319	28.189	28.519	15.785	21.534	14.620	14.727	9.214	Caffeic acid
3.580	4.025	14.839	19.491	19.774	14.718	12.968	13.388	12.478	13.022	Vanllic acid
23.671	19.390	23.905	23.797	24.025	16.552	16.001	24.808	23.182	16.690	Gentistic acid
14.367	10.676	15.701	23.749	15.919	12.850	14.620	14.230	14.978	12.642	Chlorogenic acid
6.717	11.112	12.018	19.651	15.517	7.550	10.995	11.477	11.744	7.412	Orientin total
9.458	4.405	5.828	10.639	5.903	5.272	4.584	6.669	9.825	4.742	Vitexin
17.152	18.175	20.121	15.706	16.747	13.677	16.155	21.888	15.421	16.600	Isovitexin
14.562	11.743	8.804	9.387	12.772	13.433	8.841	17.112	11.000	9.024	Quercetin
53.581	77.414	37.696	87.584	61.510	56.544	53.336	52.902	39.604	39.081	Rutin
24.442	16.691	18.974	28.666	22.339	6.968	22.741	29.551	18.651	17.299	Coumaric acid

REFERENCES

1. Abdala, B. A. 2013. *in vitro* and *in vivo* Production of Thymol and Its Derivatives in Black Seed *Nigella sativa* L. Ph.D Dissertation, Department of Field Crops, College of Agriculture, University of Baghdad pp: 135.

2. Abu Zaid, A. N. 2003. Plant Hormones and Agricultural Applications. Third Edition.Arab House of Publishing and Distribution. Arab Republic of Egypt. In Arabic. pp: 351.

3. Al-Aubaidi, G. S. 2009. Employment of Plant Tissue Culture to Increase Secondary Product (rosmarinic acid RA) in *Coleus blumei* Benth. Department. of Biology, College of Science for women, University of Baghdad.

4. Delloloio, R. 2007. Cytokininus determine *Arabidopsis* root meristem size by control - ling cell differentiation. Current Biology. 17:678.

5.Ervin, E. H. ; X. Zhang and R. E. Schm - idt.2005. Exogenous salicylic acid enhances post-transplant success of heated Kentucky bluegrass and tallfescue. Crop Science. 45:240-244.

6. Gaber, A. M. M.; S. Oksana; R. A. Ahmed and I. Smetanska. 2012. Production of phenolic acid and antioxidant activity in transformation hairy root cultures of common

buckwheat(*Fagopyrum esculentum* M.). Aust - ralian Journal of Basic and Applied Sciences. 6(7):577-586.

7. Gang, Zhao; T. Yu; W. Anhu and H. Zhu.2004. China s Buckwheat Resources and Their Medicinal Values. Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat. pp:630- 632

8. George, E. F.; M. A. Hall and G. D. Klerk. 2008 . Plant propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Published by Springer. pp:479.

9. Goodwin, M. 1985. Introduction to Plant Biochemistry. 2nd (ed.), pergamon press. NewYork.

10. Hayat, S.; A. Masood; M. Yusuf; Q. Fariduddin and A. Ahmed. 2009. Growth of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) in response to salicylic acid under high-temperature stress. Brazilian Journal of Plant Physiology.21(3):187-195.

11. Hohmann, J.; I. Zupko. ; D. Redi. ; M. Csanyi.; G. Falkay.; I. Mathe and G. Janicsak. 1999. Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme–dependent and enzyme–independent lipid peroxidation. Planta Medica. 65:576-578.

12.Huan, L.V.T.; T. Takamura and M. Tanaka.2004.Callus formation and Plant regenereation from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium orchid*, Plant Science.166 (6):1443-1449.

13. Iqbal, M. and M. Ashraf. 2006. Wheat seed priming in relation to salt tolerance : growth yild and levels of free salicylic acid and polyamines. Annales Botanici Fennici. 43:250-259 .

14. Kolupaev, Y. Y.;T. O. Yastrep; Y. V. Kar - pets and N. N. Mirochenko.2011. Influence of salicylic acid and succinic acid on antioxidant enzymes activity, heat resist -ance and productivity of *Panicum miliaceum* L. Journal of Stress Physiology and Bioche -mistry. 7(2):154-163.

15. Lee, S. C. and B. K. Hwang. 2003. Iden - tification of the papper SAR 8.2 gene as molecular marker for pathogen infction, abiotic elicitors and environmental stresses in *Caspicm annum*. Planta. 216:387-396.

16.Lila, M. 2005. Valuable secondary products from *In vitro* culture. Chapter 24. Secondary products *in vitro*, CRC press, LLC.

17.Lu, Xiaomin and W. Yang. 2013. Allev - iation effects of brassinolide on cucumber seedlings under NaCl stress. Yingyong Shengtai Xuebao. 24(5): 1409-1414.

18. Murashige, T. and F. Skoog.1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

19. Najafian, S.; M. Khoshkui; V. Tavallali and M. J. Shaharkhiz.2009. Effect of salicylic acid and salinity in Thyme *(Thymus vulgaris* L.*)* investigation on changes in gas Exchange, water relations and membrane stabilization and biomass accumulation. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 3(3):2620-2626 .

20. Sarfaraj, Md.; S. H. F. Sheeba; A. Saba; A. M. A. Rahman; I. Z. Ahmeed and M. Saeed. 2012. Current approaches toward secondary plant metabolites. Journal of pharmacy and Bio Allied sciences. 4(1):10-20.

21.Taiz, L. and E. Zeiger.2002. Plant phys - iology, 3rd Edition.Sinauer Associates, Inc. pp: 690**.**

22.Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. Plant physiology, 5rd Edition.Sinauer Associates, Inc . pp: 782.

23. Xie, D. and Y. Hong. 2001. *In vitro* regen - eration of Acacia Mangium Via organog - enesis. Plant CellTissue and Organ Culture. 66: 167-173.

24. Yordanova, R. and L. Popova. 2007. Effect of exogenoustre -atment with salicylic acid on photosynthetic activity and antioxidantca - pacity of chilled wheat plant. General and Applied Plant pysiology. 33(3-4):155-170 .

25. Zhang, Z.; M. Zhou; Y. Tang; F. Li; Yi-X. Tang; J. Shao; W. Xue and Y. Wu. 2012. Bioactive compounds in functional buckwheat food . Food Research international. 49: 389-395.

.