

تأثير البنزل ادنين وحامض السالسليك في النمو و انتاج القلويدات الكلية لنبات الودنية

Withania somnifera L.) خارج الجسم الحي

بيان حمزة مجيد

علي خلف حمود

أستاذ مساعد

باحث

كلية الزراعة- جامعة بغداد - قسم البستنة وهندسة الحدائق

alikhalf568@yahoo.com

المستخلص

نفذت التجربة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لكلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة ديالى في العام 2014-2015 لدراسة تأثير البنزل ادنين وحامض السالسليك في النمو و انتاج القلويدات الكلية لنبات الودنية (*Withania somnifera* L.) خارج الجسم الحي. استعملت تراكيز مختلفة من البنزل ادنين (BA) Benzyl Adenine (0, 1, 2, 3 ملغم.لتر⁻¹) ويرمز لهما (A0, A1, A2, A3) على التوالي، وحامض السالسليك (SA) Salicylic acid (0, 10, 20, 30 ملغم.لتر⁻¹) ويرمز لها (B0, B1, B2, B3) على التوالي، والتداخل بينهما، اضيفت هذه التراكيز الى وسط MS في مرحلة التضاعف. عوملت البذور بالجبرلين بتركيز 500 ملغم.لتر⁻¹ لمدة 18 ساعة عند درجة حرارة الغرفة الاعتيادية. ادت اضافة ال BA بالتركيز 1 ملغم. لتر⁻¹ الى زيادة معنوية في عدد الأفرع 4.22 فرع والمحتوى النسبي من الكلوروفيل SPAD Unit 34.07، ولم يختلف معنويا عن التركيز 2 ملغم. لتر⁻¹ في عدد الاوراق 12.05 و 11.32 ورقة والوزن الطري 1.42 و 1.40 غم والوزن الجاف للمجموع الخضري 0.134 و 0.128 غم على التوالي، ايضا ادى اضافة SA بالتركيز 10 ملغم.لتر⁻¹ الى زيادة عدد الأفرع الى 3.45 فرع وعدد الاوراق الى 14.05 ورقة والوزن الجاف للمجموع الخضري الى 0.140 غم والوزن الطري للمجموع الجذري الى 0.76 غم والوزن الجاف للمجموع الجذري 0.06 غم، ولم يختلف معنويا عن التركيز 20 ملغم.لتر⁻¹ في المحتوى النسبي من الكلوروفيل 33.77 و 35.47 SPAD Unit والوزن الطري للمجموع الخضري 1.47 و 1.40 غم وعدد الجذور 8.00 و 20.10 جذر والنسبة المئوية للتجزير 7.89%، 8.51%. وظهر التداخل بين BA و SA تفوق معنوي لمعاملة A1B1 في جميع الصفات الخضرية المدروسة التي لم تختلف معنويا عن المعاملة A2B1 في صفات عدد الاوراق 15.30، 14.80 ورقة والوزن الطري للمجموع الخضري 1.61 و 1.59 غم والوزن الجاف للمجموع الخضري 0.160 و 0.160 غم. واعطت المعاملة A0B1 التي جذرت وتم اقلمتها محتوى كمي من القلويدات الكلية 0.105 ملغم.غم⁻¹. وادت اضافة BA بالتركيز 2 ملغم.لتر⁻¹ الى زيادة في المحتوى الكمي للقلويدات الكلية بلغت 0.091 ملغم.غم⁻¹، وادى اضافة SA بالتركيز 10 ملغم.لتر⁻¹ الى زيادة في المحتوى الكمي للقلويدات الكلية بلغت 0.091 ملغم.غم⁻¹، كما تفوقت معنويا معاملة التداخل A2B1 و A1B1 في الحصول على اعلى زيادة من القلويدات الكلية بلغت 0.101 و 0.100 ملغم.غم⁻¹ مقارنة بمعاملة المقارنة A0B0 التي اعطت اقل محتوى 0.029 ملغم.غم⁻¹.

الكلمات المفتاحية: الجبرلين، مرحلة التضاعف، الاقلمة
*البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 48(1): 256-265,2017

Hamood & Majeed

EFFECT OF BENZYL ADENINE AND SALICYLIC ACID ON GROWTH AND TOTAL ALKALOIDS PRODUCTION OF WETHINIA (*Withania somnifera* L.) In Vitro

A.K.Hamood

B.H.Majeed

Researcher

Ass. Prof.

Dep. Horticulture - College of Agriculture –Baghdad University

alikhalf568@yahoo.com

ABSTRACT

An experiment was conducted in the tissue culture laboratory, College of Education For Pure Science, Diyala University in 2014-2015, to investigate the influences of Benzyl adenine and Salicylic acid on growth and total alkaloids production for Wethinia plant (*Withania somnifera* L.) in vitro. Four concentrations of Benzyl Adenine (BA) 0.0, 1, 2 and 3 mg.l⁻¹, which were represented with A0, A1, A2 and A3 were used respectively, and also four concentrations of Salicylic acid (SA) 0, 10, 20, and 30 mg.l⁻¹ which were represented with B0, B1, B2 and B3 respectively, with the interaction between of Benzyl adenine and Salicylic acid, these are concentrations added to culture media (MS) in multiplication stages. Seeds were soaked with gibberellic acid 500 mg.l⁻¹ for 18 h at room temperature. Benzyl adenine at 1 mg.l⁻¹ significantly increased shoots number 4.22, and Chlorophyll content 34.07 SPAD Unit, there was no significant differences at 2 mg.l⁻¹ in leaves number 12.05, 11.32, fresh and dry weight of vegetative parts 1.42, 1.40 g, and 0.134, 0.128 g, also the addition of SA at 10 mg.l⁻¹ led to increased in number of shoots 3.45, number of leaves 14.05, dry weight of vegetative parts 0.140 g, and fresh weight of root system 0.06 g, there was no significant differences at 20 mg.l⁻¹ in Chlorophyll content 33.77, 35.47 SPAD Unit, fresh weight of vegetative parts, 1.47, 1.40 g, number of roots 18.00, 20.10, and percentage of rooting 7.89%, 8.51%. Interaction between of Benzyl adenine and Salicylic acid (A1B1) showed a significant superiority in all studied vegetative characters, there was no significant differences with (A2B1) in leaves number 15.30, 14.80 leaf, fresh weight of vegetative parts 1.61, 1.59 g, dry weight of vegetative parts 0.160, 0.160 g, A0B1 treatment which rooted and acclimated gave 0.105 mg.g⁻¹ total alkaloids. Benzyl adenine at 2 mg.l⁻¹ increased total alkaloids 0.091 mg.g⁻¹, Salicylic acid at 10 mg.l⁻¹ increased total alkaloids 0.091 mg.g⁻¹, also interaction of treatments A2B1 and A1B1 show a significant superiority of total alkaloids 0.101, 0.100 mg.g⁻¹ as compared with A0B0 which gave lowest content 0.029 mg.g⁻¹.

Keywords: gibberelline, multiplication stage, acclimatization.

* Part of a Ph. D. Dissertation for the first author

المقدمة

يعد نبات الوندنية (*Withania somnifera* L.) من النباتات الطبية والأقتصادية، يتبع العائلة الباذنجانية Solanaceae، ينمو برياً وموطنه الأصلي الهند ويزرع في مناطق عديدة من العالم، ينمو النبات في العراق برياً بشكل محدود في المناطق الوسطى والجنوبية ويسمى بعدة تسميات منها الوندنية في اللغة الهندية، ويسمى أيضاً الأشواجندا في اللغة السنسكريتية وكرز الشتاء winter cherry، سم الفراخ (22)، يحدث للبذور أحياناً تباين وراثي عند اكثارها جنسياً، ويمكن أن تعامل البذور قبل البذار ببعض المعاملات الكيميائية مثل حامض الجبرلين لزيادة نسبة الانبات (15). استخدم النبات منذ ما يزيد عن 3000 سنة في نظام الطب الأيورفيدا الهندي Ayurvedic practitioners لامتلاكه مركباته قدرات علاجية منها القلويدات التي تعد موسعة للشرايين، وتقلل الكوليسترول في الدم، وتعالج مرض نقص المناعة المكتسب (الإيدز) وكمضادات للأكسدة إضافة إلى تثبيطها الأورام (8). يحدث إنتاج لهذه المركبات القلويدية الستيرويدية (steroidal alkaloids) والقلويدات الأخرى طبيعياً في نبات الوندنية (17). تلعب منظمات النمو دوراً في إنتاج الأحماض الأمينية التي تعد كبادئات أو كمواد أولية لإنتاج تلك القلويدات (28) تزايد الاهتمام بتقانة زراعة الأنسجة النباتية Plant tissue culture واعتمادها كبديل عن الزراعة التقليدية في إنتاج المركبات الطبية وتعد عملية تنمية الأجزاء الخضرية كالأفرع إحدى تقانات زراعة الأنسجة النباتية وأحد الطرائق الرئيسية في إنتاج المركبات الثانوية (18). تؤثر منظمات النمو النباتية في أيضاً النبات ومستويات نواتج الأيض الثانوية وتراكمها في النبات، وقد لا يقتصر تأثيرها على مركب معين (20) تعمل السابيتوكاينينات على زيادة انقسام الخلايا وبناء الكلوروفيل والبروتينات وتنشيط الأنزيمات الخلية (13) ولها دور في التمايز على مستوى الخلية وتكوين الأعضاء وسير العمليات الأيضية، كذلك تشترك المسارات الحيوية لبناء للسابيتوكاينينات مع بعض المسارات الحيوية الأخرى لإنتاج المركبات الثانوية (28) إذ لها دوراً إيجابياً أيضاً في زيادة إنتاج القلويدات وعبر مركب البنزل أدينين (20)، وتؤدي السابيتوكاينينات التي تضاف إلى الوسط الغذائي إلى تشجيع

تضاعف الأفرع والتمايز المورفولوجي اللذان يرتبطان بإنتاج بعض المركبات الثانوية التي تشكل أهمية دوائية كبيرة في نبات الوندنية (24). كذلك تؤثر المحفزات Elicitors في النمو والأيض الثانوي والتي يعد بعضها من منظمات النمو مثل حامض السالسليك (20). يعمل على قدح وتنشيط تراكم المركبات الثانوية حيث يعطي إشارة للبدء بعملية التراكم وكجزء من استجابة دفاعية خارجية. (30). ويؤدي حامض السالسليك أيضاً دوراً مهماً في تنظيم العمليات الفسيولوجية مثل النمو، والتمثيل الكربوني وإيض الفيتوجين، مما يعكس على زيادة المجموع الخضري وبالتالي إنتاج المركبات الثانوية (10)، أشار Shakirova وآخرون (23) إلى أن حامض السالسليك يزيد من محتوى الأوكسينات والسابيتوكاينينات في النبات. كما يعمل على تحسين النمو الجذري وزيادة كفاءة امتصاص الجذور والوزن الجاف للجذور (26). لقد بدأت دراسات مبكرة حول إنتاج المركبات الثانوية خارج الجسم الحي من نبات الوندنية، وأشار Sharada وآخرون (24) إلى أن زراعات الأجزاء الخضرية للأفرع تعد أكثر إنتاجاً للمركبات الثانوية في نبات الوندنية من الزراعات التي تعتمد على الكالس أو زراعات الخلايا المعلقة، فقد أمكن استعمال هذه التقانة بإنبات بذور النبات وزراعة أطراف الأفرع (25). وجد Supe وآخرون (27) أن البنزل أمينو بيورين BAP أفضل السابيتوكاينينات في زيادة عدد الأفرع، وإن إضافة حامض السالسليك خارج الجسم الحي يؤثر في إنتاج مركبات الثانوية في نبات الوندنية، إذ يعمل أيضاً على زيادة الوزن الجاف لأوراق النبات، إذ كلما زاد زادت كمية المركبات الفعالة في الأوراق المعاملة بحامض السالسليك (8). ويعد من أكثر الطرائق الفعالة في إنتاج القلويدات في مجال النباتات الطبية (14). وبناءً على ما تقدم فإن هذا البحث هدف إلى دراسة تأثير البنزل أدينين وحامض السالسليك في النمو وإنتاج القلويدات الكلية لنبات الوندنية (*Withania somnifera* L.) خارج الجسم الحي.

المواد وطرائق العمل

نفذ البحث في مختبر زراعة الأنسجة النباتية في كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى للفترة من 1/10/2014 إلى 1/11/2015. تم الحصول على بذور نبات الوندنية من مشروع زراعة النباتات الطبية والعطرية التابع للشركة العامة

المحتوى النسبي للكوروفيل في المجموع الخضري (SPAD Unit): استخدام جهاز Chlorophyll meter نوع SPAD-502 والمصنع من قبل شركة Minolta للحصول على قيم الكوروفيل لتحديد شدة الصبغة، سجل معدل 10 قراءات لكل معاملة.

الوزن الطري للمجموع الخضري (غم. نبات⁻¹): تم تقدير الوزن الطري للمجموع الخضري للمكررات العشرة، ووزنت الاجزاء الخضرية لكل مكرر باستعمال الميزان الحساس ثم حسب معدل الاوزان الطرية للمجموع الخضري للمكررات العشرة.

الوزن الجاف للمجموع الخضري (غم. نبات⁻¹): جفف المجموع الخضري للمكررات العشرة من كل معاملة في فرن كهربائي في درجة حرارة 70°C لحين ثبات الوزن (6)، ثم وزن المجموع الخضري باستعمال الميزان الحساس.

الوزن الطري للمجموع للجذري (غم. نبات⁻¹): قدر الوزن الطري للمجموع الجذري للمكررات العشرة، ووزنت الاجزاء الجذرية لكل مكرر باستعمال الميزان الحساس ثم حسب معدل الاوزان الطرية للمجموع الجذري للمكررات العشرة.

الوزن الجاف للمجموع الجذري (غم. نبات⁻¹): جفف المجموع الجذري لجميع المكررات العشرة، جففت العينات في فرن كهربائي في درجة حرارة 70°C لحين ثبات الوزن (6) حسب معدل الاوزان الجافة للمجموع الجذري للمكررات العشرة.

عدد الجذور: سجلت اعداد الجذور لكل نبتة من الوردية من النبيتات العشرة، ثم حسب معدلها.

طول الجذور (سم): تم قياس طول الجذور لكل مكرر بقياسها بواسطة شريط القياس واستخرج المعدل لكل المعاملات. تم انتخاب افضل النبيتات المجذرة من المعاملة التي اعطت افضل نمو خضري وجذري وهي معاملة A0B1 بعد 30 يوما من الزراعة لاغراض الاقلمة، زرعت في وسط مكون من بتموس فقط وغطيت باكياس بلاستيكية لمدة عشرة ايام ثم نقلت الى الحقل المكشوف بعد ازالة الاكياس، اخذت العينات الورقية لاغراض التحليل الكيميائي بعد 30 يوما من نقلها من المختبر الى الحقل المكشوف.

التقدير الكمي للقلويدات الكلية في المجموع الخضري: تم اجراء كشف وتقدير الكمي للقلويدات الكلية (Alkaloids Total) في المختبر المركزي لكلية الزراعة. جامعة بغداد، اذ

للبستنة والغابات في وزارة الزراعة، وتم تصديق عينات النباتات المزروعة من قبل دائرة المعشب الوطني النباتي. اشتملت التجربة النسيجية على عاملين هما البنزل ادنين Benzyl Adenine (BA) ويرمز له A، والعامل الثاني حامض الساليسيك Salicylic acid (SA) ويرمز له B، وبثلاث تراكيز لكل منهما (1، 2، 3 للعامل الاول و 10، 20، 30 للعامل الثاني ملغم. لتر⁻¹) ويرمز لهما A1، A2، A3، B1، B2، B3 على التوالي، بالاضافة الى معاملة المقارنة التي يرمز لها A0 و B0 والتداخل بينهما عند مرحلة التضاعف (8 و 11 و 25)، استخدم التصميم العشوائي الكامل (Completely Randomized Design) (7).

إنشاء مزارع الأنسجة لنبات الوردية

عوملت البذور بالجبرلين بتركيز 500 ملغم. لتر⁻¹ لمدة 18 ساعة عند درجة حرارة الغرفة لغرض زيادة نسبة الانبات (21). أجريت عمليات التعقيم لوسط MS، وأدوات العمل من خلال وضعها في حاويات معدنية (Canisters) باستخدام الموصدة Autoclave على درجة حرارة 121°C وتحت ضغط 1.04 كغم/سم² لمدة 30 دقيقة. عومت البذور بهايوكولات الصوديوم بتركيز 3% لمدة 15 دقيقة بناءً على إختبارات سابقة، وزرعت على وسط كامل القوة من MS (19) للحصول على بادرات فصلت منها القمة النامية والجزء الفلقي بعمر البادرة 15 يوماً، زرعت تلك الاجزاء النباتية التي حصل عليها على وسط MS كامل القوة مجهز بالبنزل ادنين (BA) تركيزه 1 ملغم. لتر⁻¹، سجلت اعداد الافرع اطوالها بعد 15 أو 30 أو 45 يوماً واخذت معدلاتها. زرعت الافرع التي تم الحصول عليها من انشاء مزرعة التضاعف على وسط MS شبه الصلب لدراسة تاثير عوامل التجربة BA و SA والتداخل بينهما في زيادة القلويدات، وعومل الوسط بتلك المنظمات وفقاً للتركيز المشار اليهما سابقاً، تضمنت كل معاملة 10 تكرارات، سجلت القراءات لجميع المعاملات بعمر 30 يوماً.

مؤشرات البحث

عدد الأفرع (فرع. نبات⁻¹): سجلت اعداد الافرع لكل مكرر من المكررات العشرة اذ تم حسابها لكل جزء نباتي.

عدد الاوراق (ورقة. نبات⁻¹): حسب عدد الاوراق لكل مكرر من المكررات العشرة لكل معاملة.

قد تعزى الزيادة في عدد الافرع واطوالها الى الزيادة بالفترة الزمنية كذلك تأثير عملية (Reculture) يبدو انها ادت الى زيادة سرعة انقسام الخلايا وتمايها الى افرع، تعد هذه العملية اساس لانشاء مزرعة تسيجية لنبات الودنية ، تتفق النتائج مع ماوجده Zeinab (29) من ان عملية Reculture تؤدي الى زيادة عدد الافرع عند ادخال تنمية الاجزاء الخضرية في مجال الزراعة النسيجية لاحداث التضاعف وانتاج المركبات الثانوية. كذلك دور البنزل ادنين واهميته في عملية التضاعف للافرع واطوالها، تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Sharma و Sen (25) و Irshad و اخرون (11) الذين أشاروا الى امكانية استخدام السايبتوكاينين مثل BAP لوحده من اجل تضاعف الافرع عند زراعة اجزاء نباتية لنبات الودنية على وسط MS.

تأثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في عدد الافرع لنبات الودنية خارج الجسم الحي : تبين النتائج في الجدول 2 ان BA اعطى اعلى معدل عند المعاملة A1 بلغ 4.22 فرع التي تفوقت معنويا على بقية المعاملات وكان اقل معدل في معاملة المقارنة A0 بلغ 2.27 فرع، واثر SA معنويا في اعطاء اعلى عدد من الافرع عند المعاملة B1 بلغ 3.45 فرع، وكان اقل معدل المعاملة B3 بلغ 2.80 فرع. اما تأثير التداخل بين BA و SA فقد اثر معنويا في اعطاء اعلى معدل عند معاملة A1B1 بلغ 4.80 فرع مقارنة مع المعاملة A0B1 التي كانت اقل معدل بلغ 2.00 فرع.

تم الكشف عن القلويدات Alkaloids باستعمال كاشف دراجندورف (9). ان الاساس في عملية استخلاصها كونها اما ان تكون بشكل قواعد حرة غير قابلة للذوبان للماء او بهيئة أملاح ذائبة في الماء ثم تم التقدير الكمي للقلويدات الكلية وفق ما ذكره Al-Muktar (5).

النتائج والمناقشة

تأثير المدة الزمنية في زيادة اعداد الافرع واطوالها في مرحلة النشوء لنبات الودنية خارج الجسم الحي: توضح النتائج في الجدول 1 تأثير المدة الزمنية في زيادة اعداد الافرع واطوالها في مرحلة نشوء الزروع، اذ ان زيادة المدة الزمنية ادت الى زيادة عدد الافرع واطوالها ، ان زراعة القمة النامية مع الجزء الفلقي على وسط MS الذي يحوي البنزل ادنين بتركيز 1 ملغم. لتر⁻¹ اعطى اعلى معدل من عدد الافرع بلغ 8.10 ، و 6.20 فرع بعد 45 و 30 يوما من الزراعة بالتتابع .مقارنة مع اقل معدل من عدد الأفرع عند 15 يوما من الزراعة بلغ 3.00 فرع، توافقت ايضا زيادة اطوال الافرع مع زيادة الفترة الزمنية للزراعة اذ كان اعلى معدل لاطوال الافرع بعد 45 يوما بلغ 4.40 سم مقارنة مع اقل فترة زمنية 15 يوما اذ اعطى اقل معدل لطول الأفرع بلغ 2.10 سم.

جدول 1. تأثير المدة الزمنية في زيادة اعداد الافرع واطوالها في

مرحلة النشوء لنبات الودنية خارج الجسم الحي

عدد الايام	عدد الافرع	طول الافرع(سم)
15	3.00	2.10
30	6.20	3.20
45	8.10	4.40
المعدل	5.76	3.23
L.S.D	1.17	0.88
(0.05)		

جدول 2. تأثير البنزل ادنين (BA) وحامض السالسليك (SA) والتداخل بينهما في عدد الافرع خارج الجسم الحي

لنبات الودنية

المعدل	A3	A2	A1	A0	BA SA
2.95	2.70	2.60	4.40	2.10	B0
3.45	2.40	4.60	4.80	2.00	B1
3.35	2.50	3.80	4.20	2.90	B2
2.80	2.30	3.30	3.50	2.10	B3
	2.47	3.57	4.22	2.27	المعدل
					L.S.D
	0.91	0.45	0.45		(0.05)

واعطى اعلى معدل عند المعاملة A1 و A2 بلغ 12.05 و 11.32 ورقة، وأقل معدل عند المعاملة A3 و A0 وبلغ 9.35 و 10.00 ورقة على التوالي، واثر SA أيضا معنويا

تأثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في عدد الاوراق خارج الجسم الحي لنبات الودنية :تشير النتائج في الجدول 3 ان BA قد اثر معنويا في زيادة عدد الأوراق

معدل عند معاملة A1B1 بلغ 15.30 ورقة التي لم تختلف معنويًا عن المعاملات A2B1، A0B1، A1B2 التي بلغت معدلاتها 14.80، 14.60، 13.70 ورقة، مقارنة بمعاملة A0B0 التي كانت أقل معدل بلغ فيها 6.40 ورقة.

جدول 3. تأثير البنزل ادنين (BA) وحامض السالسليك (SA) والتداخل بينهما في عدد الاوراق

لنبات الودنية خارج الجسم الحي

المعدل	A3	A2	A1	A0	BA SA
8.45	8.40	9.30	9.70	6.40	B0
14.05	11.50	14.80	15.30	14.60	B1
11.70	10.00	12.30	13.70	10.80	B2
8.52	7.50	8.90	9.50	8.20	B3
	9.35	11.32	12.05	10.00	المعدل
					L.S.D
	2.25	1.12	1.12		(0.05)

أعلى معدل في المعاملة B1 و B2 وبلغ 35.47، 33.77 SPAD Unit على التوالي، بينما أعطت معاملة المقارنة B0 أقل معدل بلغ 29.60 SPAD Unit. أما تأثير التداخل بين BA و SA فقد أثر معنويًا في إعطاء أعلى معدل عند معاملة A1B1 بلغ 38.00 SPAD Unit مقارنة بمعاملة A0B0 التي كانت أقل معدل بلغ 27.40 SPAD Unit.

جدول 4. تأثير البنزل ادنين (BA) وحامض السالسليك (SA) والتداخل بينهما في المحتوى النسبي من الكلوروفيل

لنبات الودنية خارج الجسم الحي (SPAD Unit)

المعدل	A3	A2	A1	A0	BA SA
29.60	29.40	30.60	31.00	27.40	B0
33.77	35.20	27.80	38.00	34.10	B1
35.47	35.60	36.40	36.30	33.60	B2
30.75	30.50	31.70	31.00	29.80	B3
	32.67	31.62	34.07	31.22	المعدل
					L.S.D
	4.65	2.32	2.32		(0.05)

بلغ 1.47، 1.40 غم. نبات¹⁻ على التوالي، مقارنة بأقل معدل عند معاملة المقارنة B0 بلغ 1.10 غم. نبات¹⁻. أما تأثير التداخل بين BA و SA فقد أثر معنويًا في إعطاء أعلى معدل عند المعاملة A1B1 بلغ 1.61 غم. نبات¹⁻ مقارنة بمعاملة المقارنة A0B0 التي كانت أقل معدل بلغ 0.82 غم. نبات¹⁻، ولم تختلف معنويًا عن المعاملات A2B1، A1B2، A2B2 التي بلغت معدلاتها 1.59، 1.54، 1.53 غم. نبات¹⁻ على التوالي.

تأثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في الوزن الطري للمجموع الخضري (غم. نبات¹⁻) لنبات الودنية خارج الجسم الحي:

يتضح من النتائج في الجدول 5 أن BA قد أعطى أعلى معدل عند المعاملة A1 بلغ 1.42 غم. نبات¹⁻ التي لم تختلف معنويًا عن المعاملة A2 التي بلغت 1.40 غم. نبات¹⁻، بينما كان أقل معدل المعاملة A3 ومعاملة المقارنة أذ بلغتا 1.14 و 1.15 غم. نبات¹⁻ على التوالي، كما واثر SA أيضًا معنويًا في إعطاء أعلى معدل عند معاملة B1 و B2

جدول 5. تأثير البنزل ادنين (BA) وحامض السالسليك (SA) والتداخل بينهما في الوزن الطري (غم. نبات⁻¹) للمجموع

الخضري لنبات الودنية خارج الجسم الحي

المعدل	A3	A2	A1	A0	BA SA
1.10	0.86	1.37	1.35	0.82	B0
1.47	1.29	1.59	1.61	1.41	B1
1.40	1.19	1.54	1.53	1.34	B2
1.15	1.25	1.11	1.21	1.03	B3
	1.14	1.40	1.42	1.15	المعدل
	0.14	0.07	0.07		L.S.D (0.05)

التي تفوقت معنويا على بقية المعاملات، فيما اعطت معاملة المقارنة B0 اقل معدل بلغ 0.095 غم. نبات⁻¹. اما تأثير التداخل بين BA و SA فقد اثر معنويا في اعطاء اعلى معدل عند معاملة A1B1 بلغ 0.160 غم. نبات⁻¹ مقارنة بمعاملة المقارنة A0B0 التي كانت اقل معدل بلغ 0.063 غم. نبات⁻¹، ولم تختلف معنويا عن المعاملات A2B1، A1B2، A2B2 التي بلغت معدلاتها 0.160، 0.150، 0.140 غم. نبات⁻¹ على التوالي.

تأثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل في الوزن الجاف (غم. نبات⁻¹) للمجموع الخضري لنبات الودنية خارج الجسم الحي: يتضح من نتائج الجدول (6) أن BA قد اثر معنويا في زيادة الوزن الجاف للنمو الخضري واعطى اعلى معدل عند المعاملة A1 بلغ 0.134 غم. نبات⁻¹ التي لم تختلف معنويا عن المعاملة A2 التي بلغ فيها 0.128 غم. نبات⁻¹، بينما كانت اقل معدل المعاملة A3 بلغ 0.096 غم. نبات⁻¹ التي لم تختلف معنويا عن المعاملة A0 التي بلغت 0.100 غم. نبات⁻¹، واثر SA ايضا معنويا في اعطاء اعلى معدل عند معاملة B1 بلغ 0.140 غم. نبات⁻¹

جدول 6. تأثير البنزل ادنين (BA) وحامض السالسليك (SA) والتداخل بينهما في الوزن الجاف (غم. نبات⁻¹) للمجموع

الخضري لنبات الودنية خارج الجسم الحي

المعدل	A3	A2	A1	A0	BA SA
0.095	0.078	0.120	0.120	0.063	B0
0.140	0.110	0.160	0.160	0.130	B1
0.127	0.100	0.140	0.150	0.120	B2
0.096	0.098	0.093	0.107	0.089	B3
	0.096	0.128	0.134	0.100	المعدل
	0.020	0.010	0.010		L.S.D (0.05)

بالتداخل مع الاوكسينات عند الاضافة نسيجيا (11)، ويتبين من تلك النتائج ان زيادة عدد الأفرع أدى الى زيادة عدد الأوراق والمحتوى النسبي من الكلوروفيل والوزن الطري والوزن الجاف للمجموع الخضري عند نفس المستوى من BA (الجدول 3-6) تتفق هذه النتائج مع ما حصل عليها على نبات الودنية (24) و(25). كما أن تأثير SA معنويا في اعطاء اعلى معدل من عدد الأفرع والأوراق وزيادة في المحتوى النسبي من الكلوروفيل والوزن الطري والوزن الجاف قد يعود الى تأثيره في زيادة مستويات السايبتوكاينينات التي تعمل بدورها على تشجيع التمايز المورفولوجي وتكوين أكبر عدد من الأفرع نسيجيا في نبات الودنية (24) مما يؤدي الى انعكاس ذلك على تحقيق اعلى زيادة في عدد الاوراق. وله دورا في تصنيع البورفيرينات التي تدخل في بناء

تعد تنمية الأجزاء الخضرية (الأفرع) نسيجيا (In vitro shoot culture) في نبات الودنية احد طرق اكلارواتناج المركبات الطبية، وعلى ضوء النتائج التي تم عرضها سابقا فان الزيادة في معدل عدد الأفرع وعدد الأوراق ومحتواها من الكلوروفيل والوزن الطري والوزن الجاف للمجموع الخضري قد تعزى الى تأثير BA كأحد السايبتوكاينينات التي لها القابلية على تحفيز عملية التضاعف الخضري وذلك من خلال القضاء على ظاهرة السيادة القمية للبراعم الطرفية ومن ثم تحفيز البراعم الأبضية للأجزاء النباتية المزروعة على النمو والتطور ومن ثم اعطاء الأفرع الجانبية (29) ويعد افضل السايبتوكاينينات في زيادة عدد الافرع نسيجيا عند زراعة اجزاء نباتية مرستيمية مثل القمم النامية (shoot tip explants) لنبات الودنية على وسط MS (27)، وقد يعمل لوحده او

تبين النتائج في الجدول (7) أن SA قد اثار معنويا في زيادة عدد الجذور باعطاءه اعلى معدل عند المعاملة B2 و B1 بلغ 20.10، 18.00 جذر بالتتابع. مقارنة بمعاملة المقارنة B0 التي أعطت أقل معدل من الجذور 14.70 جذر، وادت اضافته أيضا الى زيادة اطوال الجذور بلغ اعلى معدل لها عند المعاملة B2 8.64 سم ومقارنة بمعاملة المقارنة B0 التي أعطت أقل أطوال من الجذور 6.79 سم واثار معنويا في زيادة وزن الطري للمجموع الجذري باعطاءه اعلى معدل عند المعاملة B1 بلغت 0.76 غم والتي تفوقت معنويا على بقية المعاملات، وأعطت معاملة المقارنة أقل وزن طري للمجموع الجذري بلغ 0.24 غم، واثار معنويا في زيادة الوزن الجاف للمجموع الجذري باعطاءه اعلى معدل عند المعاملة B1 بلغ 0.06 غم والتي تفوقت معنويا على بقية المعاملات، ومقارنة بمعاملة المقارنة B0 التي أعطت أقل وزن جاف من الجذور 0.01، فيما تفوقت المعاملة B2 في زيادة النسبة المئوية للمادة الجافة في الجذور واعطت اعلى معدل بلغ 8.51 % والتي لم تختلف معنويا عن المعاملات B1 و B3 ومقارنة بمعاملة المقارنة B0 التي اعطت اقل معدل بلغ 4.16 %.

الكلوروفيل مما يزيد من تراكمها في المجموع الخضري (10)، كما أن دوره المهم في تنظيم العمليات الفسيولوجية مثل النمو، وأيض النترات ودوره في زيادة مستويات السايوتوكاينينات التي تشجع من بناء البروتينات ونقل المغذيات الى الأنسجة الفعالة وتنشيط الأنزيمات اللازمة للتفاعلات الحيوية في الخلية ينعكس على زيادة المادة الجافة في الأوراق، إضافة الى التفوق في أغلب مؤشرات النمو الخضري وعند مستوى معين أنعكس أيضا على تحقيق أعلى زيادة للمادة الجافة في الأوراق عند نفس المستوى، تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Banu (8) و Kadim و اخرين (13). وادت التأثيرات المشجعة للنمو الخضري لكلا الهرمونين معا الى التفوق في أغلب مؤشرات النمو الخضري. تأثير حامض السالسليك في مؤشرات المجموع الجذري لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي: لوحظ ان بعض الأفرع الخضرية المزروعة على وسط MS شبه الصلب الخالي من اية إضافة لمنظمات النمو لمعاملة المقارنة B0 قد كونت جذور، إضافة الى تجذير بعض الافرع المزروعة لمعاملات إضافة حامض السالسليك لوحده بتركيزه المختلفة للمعاملات (B1، B2، B3) لذا سجلت القراءات للأفرع التي جذرت. اذ

جدول 7. تأثير حامض السالسليك (SA) في مؤشرات المجموع الجذري لنبات الودنية خارج الجسم الحي

تركيز SA (ملغم/لتر)	عدد الجذور (جذر)	طول الجذور (سم)	وزن الطري للمجموع الجذري (غم)	وزن الجاف للمجموع الجذري (غم)	النسبة المئوية للمادة الجافة في الجذور (%)
B0	14.70	6.79	0.24	0.01	4.16
B1	18.00	7.88	0.76	0.06	7.89
B2	20.10	8.64	0.47	0.04	8.51
B3	17.30	6.93	0.38	0.03	7.89
المعدل	17.52	7.56	0.46	0.03	7.11
L.S.D (0.05)	2.44	1.43	0.15	0.01	2.05

الجذور بتنشيعه امتصاص العناصر الغذائية ومنه النتروجين والفسفور والبوتاسيوم (1). وربما أدى التفوق في مؤشرات النمو الخضري بتأثير هذا العامل الى زيادة كفاءة النبات مما أدى الى انعكاس ذلك على الزيادة في مؤشرات المجموع الجذري، تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Banu (8)، كما أن تجذير الأفرع المستأصلة نسيجيا والمزروعة على وسط MS خالي من اية إضافة من منظمات النمو النباتية يتفق مع النتائج التي حصل عليها Sen و Sharma (25) على نبات الودنية.

على ضوء ما ذكر سابقا من نتائج فإن اتجاه بعض الافرع الخضرية الى تكوين الجذور قد يعود الى تأثير حامض السالسليك في زيادة مستوى الأوكسينات الداخلي في الانسجة النباتية (23) وبذا فانه قد يسمح لتركيز الاوكسين الداخلي للأجزاء النباتية النامية من أن يظهر تأثيره في تحفيز عملية التجذير، إذ تعد الأوكسينات من الهرمونات النباتية المشجعة للتجذير عند زراعة الأفرع الخضرية على أوساط غذائية نسيجيا، وتؤثر أيضا في زيادة أنقسام الخلايا واستطالتها (3) وهذا ينعكس ايجابا على الزيادة الحاصلة في عدد الجذور وأطوالها وأوزانها الطرية والجافة والنسبة المئوية للمادة الجافة في الجذور، كما قد يعزى تأثير الحامض أيضا في زيادة نمو

عند معاملة B1 بلغ 0.091 ملغم.غم⁻¹، فيما اعطت اقل معدل معاملة المقارنة B0 بلغ 0.054 ملغم.غم⁻¹. اما تأثير التداخل بين BA و SA فقد اثر معنويا في اعطاء اعلى معدل عند المعاملة A2B1 بلغ 0.101 ملغم.غم⁻¹ في حين كان اقل معدل في المعاملة A0B0 بلغ 0.029 ملغم.غم⁻¹، لم تختلف معنويا عن المعاملات A1B1، A0B1، A2B2، التي اعطت المعدلات 0.099، 0.100، 0.098 ملغم.غم⁻¹ على التوالي.

جدول 8. تأثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في المحتوى الكمي للقلويدات الكلية

في المجموع الخضري (ملغم.غم⁻¹) لنبات الودنية خارج الجسم الحي

المعدل	A3	A2	A1	A0	BA SA
0.054	0.074	0.071	0.045	0.029	B0
0.091	0.064	0.101	0.100	0.099	B1
0.083	0.056	0.098	0.096	0.084	B2
0.074	0.036	0.095	0.082	0.086	B3
	0.057	0.091	0.080	0.074	المعدل
					L.S.D
	0.003	0.001	0.001		(0.05)

النتروجين وزيادة فعالية انزيم Nitrate Reductase بوجود NO₃ وبالتالي زيادة تمثيل النترات تتفق هذه النتائج مع ما وجده Al-Amery و Khierallah (2) كما أن له دور في تنظيم العمليات الفسيولوجية مثل النمو، والتمثيل الكربوني، وأيض النترات مما ينعكس على زيادة المجموع الخضري وهي العمليات التي يعد النتروجين الأساس فيها والتي تنعكس على بناء وزيادة القلويدات الكلية (10) و (12). وقد يعزى ذلك الى تأثير SA في عدد الافرع وعدد الاوراق ومحتوى الكلوروفيل النسبي والوزن الجاف للمجموع الخضري (الجدول 2، 3، 4، 6) ، اذ أنها تمثل زيادة في تمثيل النتروجين، كما يؤثر الحامض في زيادة نمو الجذور التي تعد مواقع بناء القلويدات، أن تفوقه في اعطاء اعلى معدل في الوزن الجاف للمجموع الجذري والنسبة المئوية للمادة الجافة في الجذور (7) يمثل أنعكاس للزيادة في بناء القلويدات، كما وله دور في زيادة مستوى الساييتوكاينينات والاكسينات اللتان تعملان على زيادة انقسام الخلايا واستطالته وبالتالي زيادة الكتلة الحيوية (23). كما أن التأثيرات المشجعة للنمو الخضري لكلا العاملين BA و SA معا ومنها تأثيراتها الايجابية وتفقهما في زيادة الوزن الجاف للمجموع الخضري جدول (6) أنعكست على تحقيق أعلى زيادة في المحتوى الكمي للقلويدات الكلية كما مبين في الجدول نفسه.

تأثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في المحتوى الكمي للقلويدات الكلية في المجموع الخضري (ملغم.غم⁻¹) لنبات الودنية خارج الجسم الحي : تشير النتائج في الجدول 8 ان BA قد اثر معنويا في زيادة المحتوى الكمي للقلويدات الكلية مقارنة مع بقية المعاملات واعطى اعلى معدل عند المعاملة A2 بلغ 0.091 ملغم.غم⁻¹ مقارنة مع اقل معدل عند المعاملة A3 بلغ 0.057 ملغم.غم⁻¹، واثر SA ايضا معنويا في اعطاء اعلى معدل

أن الزيادة في المحتوى الكمي للقلويدات الكلية في المجموع الخضري كما يتضح من نتائج الجدول 8 عند إضافة BA الى الوسط الغذائي MS قد تعزى الى الزيادة في عدد الاوراق والوزن الطري والوزن الجاف للمجموع الخضري (الجدول 3 ، 5 ، 6) اذ تؤدي تلك الزيادة الى زيادة في النتروجين المكون الاساسي لبناء الأحماض الامينية، مما يتبعها أيضا زيادة في تلك الأحماض، أذ يتم انتاج المركبات القلويدية عبر سلسلة عمليات البناء الحيوي للأحماض الأمينية الأساسية التي تعد كبادئات أو مواد أولية لأنتاجها وتلعب منظمات النمو دورا في النشاط الأنزيمي للخلايا وانتاج تلك الأحماض (28)، وبذا فان كلاهما تنعكس على زيادة النتروجين اللازم لبناء القلويدات إضافة الى العمليات الحيوية الأخرى، تتفق هذه النتائج مع توصل اليه Al-Qaisy (4). اما تأثير إضافة SA إلى وسط زراعة الأنسجة في زيادة القلويدات الكلية كما مبين في نتائج الجدول نفسه فقد يعزى الى تأثيره في التحفيز على التعبير الجيني لمركبات الايض الثانوي ويعد من أكثر الطرق الفعالة في إنتاج القلويدات في مجال النباتات الطبية، أذ أن هناك مدى واسع من تراكيز SA عند المعاملة خارج الجسم الحي، تعمل هذه التراكيز على زيادة انتاج القلويدات (16) وقد يرجع الى تأثيره في زيادة النتروجين في الانسجة النباتية من خلال زيادة قابلية الجذور في امتصاص العناصر الغذائية واهمها

REFERENCES

1. Alam, M. M. M. Naeem, M. Idrees, M. Masroor A. Khan, .2012. Augmentation of photosynthesis, crop productivity, enzyme activities and alkaloids production in sadabahar (*Catharanthus roseus* L.) through application of diverse plant growth regulators. J. Crop Sci. Biotech.15 (2); 117-129.
2. Al-Amery, L.K.J. and H. S. M. Khierallah. 2013. Response of in vitro potato plantlet to salicylic acid and the physical status of the growing media in production of microtubers for two potato cultivars. Al-Kufa Journal of Agricultural Sciences:5(2) 100-122.
3. AL-Khafaji, M, A .2014. Plant Growth Regulators, Applications and Utilization in Horticultural. University of Baghdad. Ministry of Higher Education and Scientific Research. Iraq.P:1-225.
4. Al-Qaisy, S.A. 2010. Effect of Nitrogen Fertilizer the Growth and Some Quantity and Quality Characters and Accumulation of Total Steroidal Alkaloids in Some Potata Cultivars. M.Sc. Thesis. College of Agriculture. University of Baghdad.
5. Al-Mukhtar, S.A. 2008. Study on Production of some Morphinan Alkaloid from "Poppy" *Papaver somniferum* L. In vitro. M. Sc. Thesis. Dep. of Hort. College of Agriculture. University of Baghdad.
6. Al-Sahaf, F. H. 1989 a. Plant Nutrition Application. Ministry of Higher Education and Scientific Research. Book House Press. University of Musul. Iraq. pp. 198.
7. Al-Sahoky, M. and K. M. Wahayib. 1990. Applications In Experimental Design and Analysis. Ministry of Higher Education and scientific research. Iraq. pp.109.
8. Banu, U. 2013. The Influence of Salicylic Acid on Withanolide Accumulation in Invitro Roots and Leaves of *Withania somnifera*. M.Sc Thesis, avinashilingam instiute for home science and higher education for woman coinbatore.
9. Desai. S. D. Hadimani, G. A. Bagoji, I. B. Biradar, P. S. Hugar. 2015. Evaluation of phytoconstituents of methanolic root extract of *Withania somnifera*. Journal of Advanced Scientific Research, 6(1): 27-30.
10. Hayat, S. and A. Ahmad. 2010. Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormones. Springer Dordrecht Heidelberg, London, New York. pp.401.
11. Irshad A. B. , A. A. Alia , R.C. Saxena , I. S . Kumar , and M . Ahmad .2013. In Vitro Propagation of *Withania Somnifera* L. Dunal (Ashwagandha) an Endangered Medicinal Plant *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*.
12. Jaddo, Z. I. and K. M. Rabee. 2016. Effect of Salicylic and Humic Acid on Vincristine and N, P, K Content in Madagascar Periwinkle Leaves. The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 47(2): 543-551.
13. Kadim I.A., E. H. Hameed A., Alsamed and A. Al-Ramadan. 2012. Effect of Chelated Iron and Benzyl Adenine on Physiochemical Characteristics and Yield of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) C.V. "Hellawi". Journal of King Abdulaziz University, (23), (1): 133-156.
14. Kamal, R., R. P. Moreno, and R. Verpoorte .1995. "Effect of elicitor on production of alkaloid and enzymes activates of *Catheranthus roseus* suspension cultured Cells". J. Biol. Chem., 234-244.
15. Kattimani, K.N., Y.N. Reddy, and R. B. Rao. 1999. Effect of presoaking seed treatment on germination, seedling emergence, seedling vigour and root yield of Ashwagandha (*Withania somnifera* Dunal). Seed Science and Technology, 27: 483-488.
16. Klessig .D.F. and Malamy, J. 1994. The salicylic acid signal in plants. Plant Mol. Biol., vol. 26 : 1439–1458.
17. Mirjalili, M. H. E. Moyano, M. Bonfill, R. M. Cusido and J. Palazon. 2009. Steroidal lactones from *Withania somnifera*, and Ancient plant for novel medicine. Molecules, 14:2373-2393.
18. Mohammed, A.M. and M. Omar. 1990. Fundamental Aspects of plant Cell, Tissue and Organ Culture. (In Arabic). Mosul univ., Ministry of Higher Education. Iraq.
19. Murashige ,T. and F. Skoog. 1962. Arevised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture .Physiol. Planta 15:4473- 497.

20. Ramawat, K. G. 2004. Plant Biotechnology. India. P.1-265.
21. Salman, M.A. 2014. Personal Communication, College of Agriculture. University of Baghdad.
22. Saour, K. Y. 1980. Phytochemical Investigation of *Withania somnifera* Dun. Grown in Iraq. M. Sc. Thesis. College of Pharmacy. University of Baghdad.
23. Shakirova F. M. A.R. Sakhabutdinova; M.V. Bezrukova; R.A. Fatkhutdinova and D.R. Fatkhutdinova .2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. Plant Science, 164(3) : 317-322.
24. Sharada M., Ahuja, A, Suri, K. A. Vij, S. P. Khajuria, R.K. Verma, V. and Kumar, A. 2007. Withanolide production by in vitro cultures of *Withania somnifera* and its association with differentiation. Biol. Plant. 51: 161–164.
25. Sharma, A. K. and J. Sen. 1991. Micropropagation of *Withania somnifera* from germinating seeds and shoot tips. Plant Cell Tissue and Organ Culture 26(2): 71-74.
26. Sivanandhan G, A. M, Mayavan S, Rajesh M, Jeyaraj M,. 2012b. Optimization of elicitation conditions with methyl jasmonate and salicylic acid to improve the productivity of withanolides in the adventitious root culture of *Withania somnifera* L. Dunal. Appl Biochem Biotechnol 168: 681–696.
27. Supe U.,F. Dhote and M. G. Roymon .2006. In vitro plant regeneration of *Withania somnifera* Plant Tiss. Cult. Biotech. 16, 111-115.
28. Verpoort, R. and A.W. Alfermann. 2000. In Metabolism, Engineering of Plant Secondary Metabolism, Kluwer, Academic Publishers, pp. 3-8.
29. Zeinab, J.A. 2002. The Production of Cardiac Glycosides from the Plant of Zahrat Al kishtiban (*Digitalis purpurea* L.) by Using Tissue Culture Technique. Ph.D Dissertation Agric. College. Baghdad University. Iraq.
30. Zhao, I.C. Davis, and R. Veerporte. 2005. "Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. "Biotechnology advances. 23, 283 -333.