تاثير الاجهاد في انتاج المركبات الثانويه من كالس نبات المورنغا *Moringa oleifera* خارج الجسم الحي

انتصار رزاق ابراهيم[1]* سامي كريم محمد امين[2]
مدرس مساعد استاذ
1 قسم علوم الحياه– كليه العلوم– جامعه رابرين
2 قسم البستنه وهندسه الحدائق– كليه الزراعه– جامعه بغداد
nurseranya@yahoo.com

المستخلص:

اجري البحث لدراسة تأثير كل من السكروز والكلايكول متعدد الاثلين (PEG) في تحفيز الكالس المستحث من السويقه الجنينيه السفلى لنبات المورنغا *Moringa oleifera* في مختبر زراعة الانسجة النباتية– كلية الزراعة– جامعة بغداد للمده من شباط 2015 إلى مايس 2016. اذ اضيف السكروز بالتراكيز 30، 60، 90، 120غم. لتر$^{-1}$ وPEG بالتراكيز 0، 25، 50، 100 غم. لتر$^{-1}$ الى الوسط المجهز بـ 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ من 2,4-D و0.1 ملغم.لتر$^{-1}$ من NAA كلا" على حدا، اعطى الوسط MS المجهز بـ 120 غم. لتر$^{-1}$ سكروز أعلى تركيز لمركب Zeatin وQuercetin وKaempferol، اذ بلغت 103.4، 1324.6، 966.5 مايكروغرام.غرام وزن جاف $^{-1}$ بالترتيب، في حين زاد انتاج المركبات الثانويه بزياده تراكيز PEG إذ تفوقت المعاملة 100 غم. لتر$^{-1}$ في إعطاء أعلى تركيز لمركب الـ Zeatin وQuercetin وKaempferol، إذ بلغت 92.01 و 3528.0 و931.0 مايكروغرام.غرام وزن جاف $^{-1}$ بالترتيب. يتضح من نتائج التجربه امكانية زيادة كمية المركبات الفعالة التي تنتجها انسجة الكالس المستحثة من الجزء النباتي المفصول والمزروع خارج الجسم الحي عند تعريضه لبعض الاجهادات اذ يمكن فصل هذه المواد الفعاله وتنقيتها واستعمالها بصورتها النقيه حيث تعد مصدرا طبيعيا تدخل في تحضير الدواء.

الكلمات المفتاحية: اجهاد، المورنغا، المركبات الفعاله، بولي اثلين كلايكول، السويقه الجنينيه السفلى

*البحث مستل من اطروحه دكتوراه للباحث الاول.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences –1099-1107: (4) 48/ 2017 Ibrahim & Ameen

INFLUENCE OF STRESS ON SECONDARY METABOLITES PRODUCTION FROM CALLUS OF *MORINGA OLEIFERA IN VITRO*

I. R. Ibrahim[1*] S. K. M. Ameen[2]
1 Dept. of Biology- College of Science - University of Raparin
2 Dept. of Hort. - College of Agriculture- University of Baghdad
nurseranya@yahoo.com

ABSTRACT

An experiment was conducted to study the effect of sucrose, poly ethylene glycol (PEG) on hypocotyl induced callus of *Moringa oleifera* at the plant tissue culture lab.- College of Agriculture– University of Baghdad from February 2015 to May 2016. Sucrose concentrations were 30, 60, and 90, 120 g .L $^{-1}$ and PEG 0, 25, 50 and 100 g .L $^{-1}$ added to MS medium supplemented with 2.0 mg .L $^{-1}$ of 2, 4-D and 0.1 mg .L $^{-1}$ of NAA. MS medium supplemented with120 g .L $^{-1}$ of sucrose gave the best amount of Zeatin, Quercetin and Kaempferol reached to 103.4, 1324.6 and 966.5 µg. g dry weight of callus^{-1} respectively. The concentrations of active compound increasing with adding PEG, MS medium supplemented with 100 g .L $^{-1}$ PEG gave the highest value of Zeatin, Quercetin and Kaempferol which recorded 92.01, 3528.0 and 931.0 µg. g dry weight of callus^{-1} respectively. We found that we could increase the production of active material from callus that induced from explant by exposure the callus to several stress and then could separate the pure active material and used it as a drug in medicine.

Keywords: stress, moringa, active compound, poly ethylene glycol, hypocotyle.
***Part of PhD. dissertation of the first author.**

Received:23/12/2016
Accepted:29/1/2017

المقدمة

تحتل النباتات الطبيه مكانه كبيرة في الانتاج الزراعي والصناعي وتلقى عنايه بالغة في كثير من الدول المنتجه لها اذ تعد مصدرا" طبيعيا" للمواد الفعاله التي تدخل في تحضير الدواء. تنتج النباتات مركبات عضوية معقدة ليس لها وظيفة مباشرة في النمو تسمى بمركبات الايض الثانوي أو المركبات الكيميائية النباتية Phytochemical Compound (22). ومن هذه النباتات شجرة المورنغا، أو الشجرة المعجزة، أو شجرة البان *Moringa oleifera* تنتمي الى العائلة Moringaceae، تزرع كاشجار زينه لجمال ازهارها وظلها الوفير، أو لعمل سياج نباتي او كمصدات رياح (9، 19,10) فضلا عن ان كافة اجزاء الشجرة تقريبا ذات أهمية غذائية وطبية، فالنبات يشكل غذاء متكاملا" في بعض مناطق افريقيا واسيا، إذ تستعمل الأوراق كمكمل غذائي للمصابين بنقص المناعة لما تحتويه من كميات كبيرة من الفيتامينات، والكربوهيدرات، والحوامض الامينية، والبيتا كاروتين، والحديد، والبوتاسيوم، والفسفور، والكالسيوم وعنصري الزنك والسلينيوم ومضادات الاكسدة (11، 26). كما ان النبات غني ببعض المركبات مثل: الزياتين Zeatin وهو هرمون نباتي يعود الى مجموعه السايتوكاينينات ويعد مركب مضاد للشيخوخة (Anti – Aging Compound) يساعد في انقسام الخلايا، كما يحتوي على عدد من المركبات الاخرى ذات الاهمية الطبية كال sitosterol –β و الـ caffeoylquinic acid ومركبي الـ quercetin و الـ kaempferolوالمركبين الاخريين يعودان الى مجموعه الفينولات ذات الاهميه للنبات والانسان على حد سواء، اذ تعمل على تقليل مخاطر الاصابه بالسرطان وبعض امراض القلب وجهاز الدوران فضلا عن فعاليتها كمضادات اكسدة ومضادات حيوية ضد الفطريات والبكتريا الممرضة (1، 15). تمكن الباحثون من استعمال تقانة زراعة الانسجة في زيادة انتاج النباتات الطبية من المركبات الفعالة ذات الاستعمالات الطبيه قياسا بالكمية التي تنتجها النباتات الام، وأتاحت هذه التقنية فرصا عديدة لإنتاج مركبات الايض الثانوي وبشكل مستمر وعلى مدار السنة (18). وذلك لامكانية السيطرة على الظروف البيئية ومكونات الوسط الغذائي الذي يحتاجه الجزء النباتي المزروع ، وتشير الدراسات الى امكانية زيادة كمية المركبات الفعالة التي تنتجها انسجة الكالس المستحثة من الاجزاء النباتية المفصولة والمزروعة خارج الجسم الحي عند تعريضها لبعض الاجهادات اذ يمكن فصل هذه المواد الفعاله وتنقيتها واستعمالها بصورتها النقيه (8، 6). ولذلك تهدف الدراسة الى امكانية تحفيز انتاج مركبات الايض الثانوي من خلال اضافة بعض المواد مثل الكلايكول متعدد الاثلين (PEG) والسكروز إلى الوسط الغذائي.

المواد وطرائق العمل

نفذت الدراسة في مختبر زراعة الانسجة النباتية – كلية الزراعة – جامعة بغداد للمدة من شباط 2015 إلى مايس 2016. واجريت التحليلات المختبرية والمتضمنة تقدير المواد الفعالة في مختبرات دائرة بحوث المواد/ وزارة العلوم والتكنلوجيا. عقمت البذور بعد نقعها بتركيز % 4 من القاصر التجاري (فاس) الذي يحتوي على 6% من هايبوكلورات الصوديوم NaOCl لمدة (15) دقيقه. ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لازالة اي اثر للمادة المعقمة ، ومن ثم ازيلت اغلفه البذور وغسلت البذور بالماء المقطر المعقم، لضمان ازالة بقايا المادة المعقمة والاغلفه من البذور. زرعت البذور المعقمة في انابيب الزراعه داخل كابينة انسياب الهواء الطبقي على وسط MS الصلب بقوة أملاح كاملة والخالي من منظمات النمو وحضنت على درجة حرارة 25 ±2 م° في الظلام لحين الانبات، وبعد اسبوع من انبات البذور فصلت السويقه الجنينيه السفلى وزرعت في انابيب الزراعة زجاجية Screw glass vials بأبعاد 85 x 28 ملم ، تحتوي على 10 مل من الوسط الغذائي MS والمجهز بـ 2.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4–D و 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ NAA (21) لاستحثاث الكالس في ظلام تام تحت درجة الحرارة 25 م°± 2. وسجلت النتائج بعد خمسة اسابيع من الزراعة.

زراعه الكالس في وسط MS المجهز بالسكروز أو البولي اثلين كلايكول (PEG)

تم اخذ وزن ثابت من الكالس (150 ملغم) المستحث من السويقه الجنينيه وزرع على الوسط الغذائي MS والمجهز بتركيز 2.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4–D و 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ NAA مع اضافة مستويات مختلفة من السكروز (30، 60،

90، 120) غم. لتر$^{-1}$، و البولي اثلين كلايكول بالتراكيز (0، 25، 50،100) غم. لتر$^{-1}$ كلا على حده وبواقع عشر تكررات لكل تركيز حضنت الزروعات في الظلام، وعلى درجة حرارة 25 ±2 م° وبعد خمسة اسابيع قدرت المادة الفعالة.

تقدير المركبات الثانويه باستعمال جهاز كروموتوكرافي السائل ذي الأداء العالي (HPLC)

تم كشف المركبات الفعاله باستعمال جهاز HPLC، بإيجاد الظروف المثلى لفصل المركبات القياسية بتركيز 25 مايكروغم.مل$^{-1}$ للفينولات و5 مايكروغم.مل$^{-1}$ للزياتين إذ فصلت على عمود الطور المعكوس ذي الفصل السريع، وحددت تراكيز المواد الفعالة كمياً باستعمال المقارنة بين القياسي والانموذج تحت الظروف نفسها باستعمال المعادلة الاتية:

تركيز الانموذج=(مساحة النموذج/مساحة المحلول القياسي)× تركيز المحلول القياسي × عدد مرات التخفيف

حقن كل من المحلول القياسي والعينة في جهاز HPLC نوع LC–10A شركة Shimadzu لتحديد زمن الاحتجاز Retention time وارتفاع حزمة العينة Area لكل من المحلول القياسي والعينه (27) اذ حقن المستخلص في عمود (Column) من نوع FLC بالأبعاد (50×4.6mm I.D) حجم الجزيئات كان 3µm على درجه حراره 40 م° بمضخه من نوع Binary delivery pump LC-10A قادرة على دفع الطور المتحرك خلال عمود الفصل بمعدل جريان يتراوح بين 1– 1.5 مل. دقيقة$^{-1}$ وبعد خروج المادة من العمود تم تعيينها كمياً بجهاز UV ضمن طول موجي محدد.

تقدير المركبات الفينوليه

تمت اذابة 100 ملغم من مسحوق العينه في 30 مل acetonitrile ثم رج بوساطة جهاز الترددات فوق الصوتية (ultra –sonic) لمده 30 دقيقه ثم رشح المستخلص باستخدام ورق ترشيح whatman قطر0.5 مايكرومتر لازاله الالياف والمواد غير الذائبه ثم اخذ 20 مايكرولتر من الراشح الرائق وحقن في الجهاز وكان الطور المتحرك يتمثل بـ acetonitrile :methanol :distilled water بالنسب 50: 40: 10 V/V/V بالتتابع وتم الكشف عنها ضمن طول موجي 360 نانومتر (5، 17، 23).

تقدير الزياتين

جرى استخلاص منظمات النمو النباتيه على وفق طريقه Unyayar (25) المعدله ، اذ وزن 10 ملغم من العينه وسحقت بالهاون مع اضافه 60 مل من ميثانول: امونيا: كلوروفورم وبالنسب 12: 5: 3 V/V/V بالتتابع، رشح المستخلص ثم وضع في جهاز الطرد المركزي لمده 15 دقيقه على سرعه 6000 دوره. دقيقه$^{-1}$ ثم اضيف للراشح 25 مل ماء مقطر، اهملت طبقه الكلوروفورم اما الماء مع الميثانول جفف بالتبخير في المبخر الدوار (rotary evaporator) عند درجه حراره 30 م، اخذ 20 مايكرولتر من الطور المائي وحقن في جهاز HPLC تمثل الطور المتحرك بـ acetonitrile : 1% acetic acid methanol في 1 مايكرومولMmtetrabutyle ammonium phosphate + 400 مايكرولتر triethyl amine (pH3.0) وتم الكشف بطول موجي 280 نانومتر.

التصميم التجريبي والتحليل الإحصائي:نفذت جميع التجارب التي تضمنها البحث باستعمال التصميم التام التعشيه Complete Randomized Design بعشرة تكررات ، وتمثل كل انبوبة اختبار مكرر، وحللت النتائج باستخدام البرنامج الإحصائيSAS (20) وقورنت المتوسطات باستعمال اقل فرق معنوي L.S.D لبيان الفروقات الإحصائية بين المعاملات وعلى مستوى احتمال 5% (4).

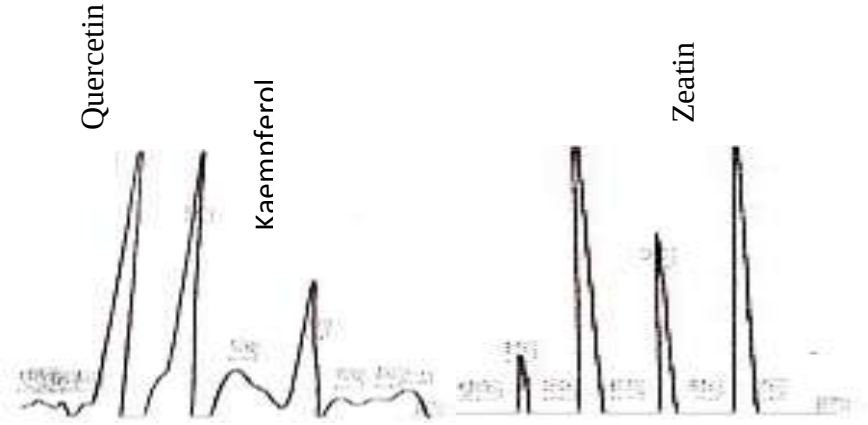
النتائج والمناقشه

تاثير السكروز في انتاج المركبات الثانويه من كالس نبات المورنغا:

جدول 1. تاثير السكروز في انتاج المركبات الثانويه من كالس نبات المورنغا المزروع في الوسط MS بعد خمسة أسابيع من الزراعة.

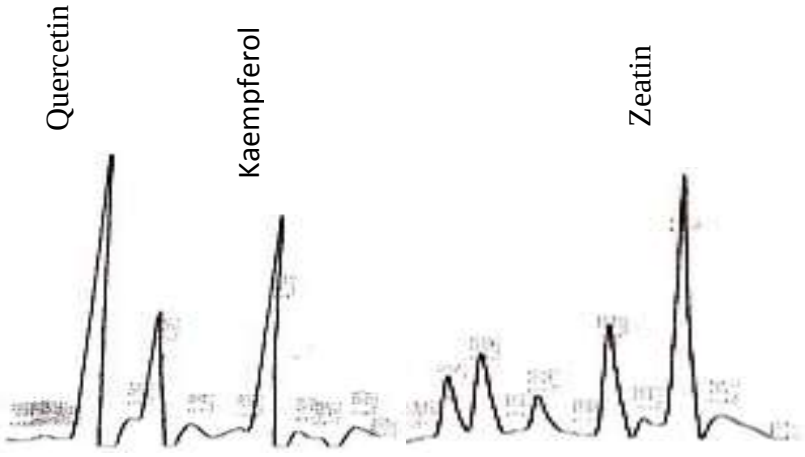
تراكيز السكروز غرام. لتر$^{-1}$	Kaempferol مايكروغرام . غم$^{-1}$	Quercetin مايكروغرام. غم$^{-1}$	Zeatin مايكروغرام . غم$^{-1}$
30	363.6	607.8	55.9
60	432.1	708.5	51.5
90	864.3	928.8	78.4
120	966.5	1324.6	103.4
L.S.D. 5%	24.4	37.2	11.9

يلاحظ من نتائج الجدول 1 حصول زياده معنويه في انتاج المركبات الثانويه بزياده تراكيز السكروز اذ تفوقت المعاملة 120 غرام.لتر$^{-1}$ في إعطاء أعلى تركيز لمركب الـ Zeatin و Quercetin و Kaempferol اذ بلغت 103.4، 1324.6، 966.5 مايكروغرام.غرام وزن جاف$^{-1}$ على بالتتابع ، في حين اعطت معاملة المحايد اقل تركيز لمركبي Quercetin و Kaempferol بلغ 607.8 و 363.6 مايكروغرام.غرام وزن جاف$^{-1}$ بالترتيب. اما الـ Zeatin فكانت اقل كميه عند التركيز 60 غرام.لتر$^{-1}$ بلغت 51.5 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$. الاشكال (A–1), (B–1), (C– –1), (D–1) .



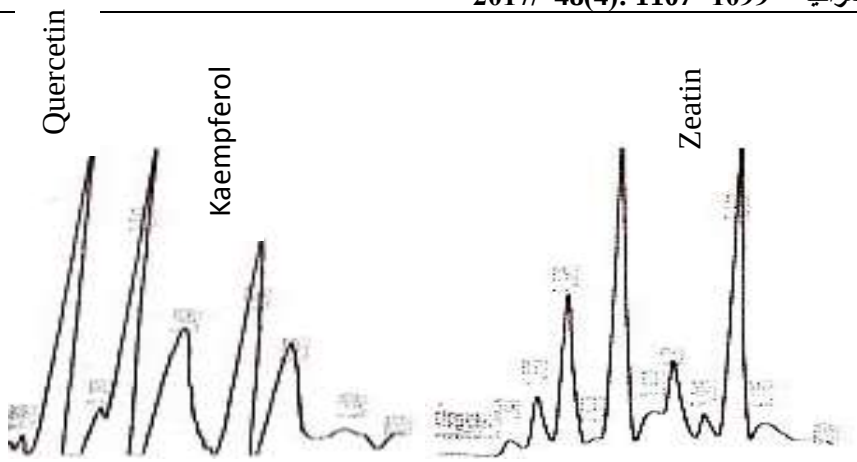
الشكل (A–1) تأثير معامله المحايد (بدون اجهاد) لإنتاج المركبات الثانويه من نسيج الكالس لنبات المورنغا بعد خمسة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي

المركب	زمن الاحتجاز	المساحة
Kaempferol	**4.533**	**49653**
Quercetin	**1.357**	**54667**
Zeatin	**5.49**	**78383**



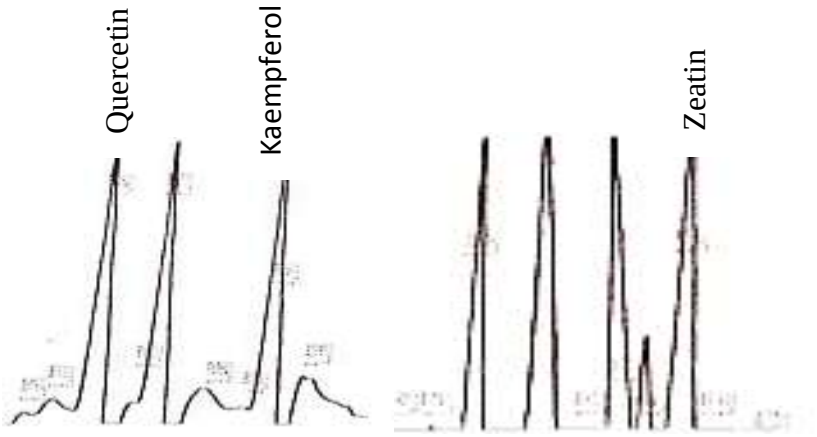
الشكل (B–1) تأثيرالسكروز بالتركيز 60 غرام لإنتاج المركبات الثانويه من نسيج الكالس لنبات المورنغا بعد خمسة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي

المركب	زمن الاحتجاز	المساحة
Kaempferol	**4.52**	**54305**
Quercetin	**1.35**	**57095**
Zeatin	**5.50**	**64973**



الشكل (C–1) تأثيرالسكروز بالتركيز90 غرام لإنتاج المركبات الثانويه من نسيج الكالس لنبات المورنغا بعد خمسة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي

المركب	زمن الاحتجاز	المساحة
Kaempferol	**4.56**	**68511**
Quercetin	**1.42**	**62848**
Zeatin	**5.49**	**83091**



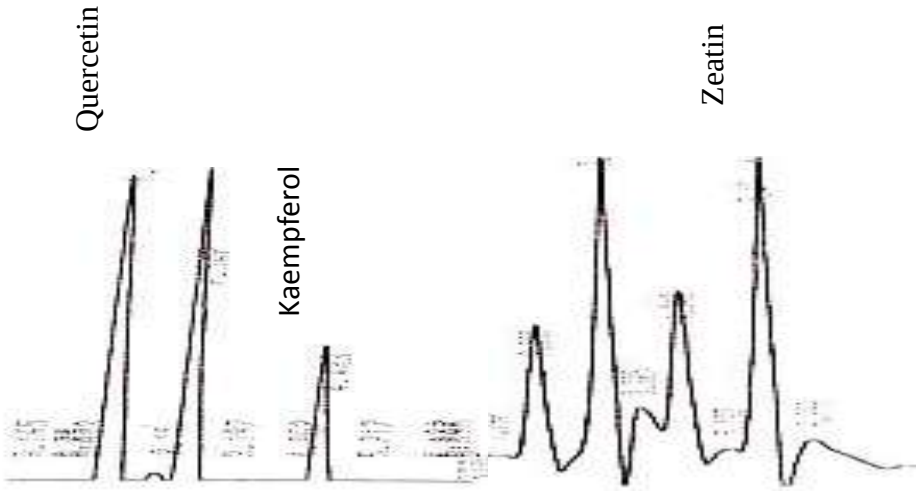
الشكل (D–1) تأثيرالسكروز بالتركيز120غرام لإنتاج المركبات الثانويه من نسيج الكالس لنبات المورنغا بعد خمسة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي

المركب	زمن الاحتجاز	المساحة
Kaempferol	**4.62**	**82152**
Quercetin	**1.405**	**80480**
Zeatin	**5.477**	**114584**

تاثير بولي اثلين كلايكول في انتاج المركبات الثانويه من كالس نبات المورنغا يلاحظ من نتائج الجدول 2 حصول زياده معنويه في انتاج المركبات الثانويه بزياده تراكيز PEG اذ تفوقت المعاملة 100 غم. لتر$^{-1}$ في إعطاء أعلى تركيز لمركب الـ Zeatin و Quercetin و Kaempferol اذ بلغت 92.01 و 3528.0 و931.0 مايكروغرام.غرام وزن جاف$^{-1}$ بالتتابع ، في حين اعطت معاملة المحايد اقل تركيز لمركبي الـ Zeatin وQuercetin بلغت 55.9 607.8 مايكروغرام.غرام وزن جاف$^{-1}$ بالتتابع. اما الـ Kaempferol فاقل كميه كان عند التركيز غم. لتر$^{-1}$ اذ بلغ 361.1 مايكروغرام.غرام وزن جاف$^{-1}$. الاشكال (A–1), (B–1), (C–1), (D–1)

جدول 2. تاثير بولي اثلين كلايكول في انتاج المركبات الثانويه من كالس نبات المورنغا المزروع في الوسط MS بعد خمسة أسابيع من الزراعة

تراكيز PEG غم.لتر$^{-1}$	Kaempferol مايكروغرام. غم$^{-1}$	Quercetin مايكروغرام. غم$^{-1}$	Zeatin مايكروغرام. غم$^{-1}$
0	**363.6**	**607.8**	**55.9**
25	**361.1**	**667.0**	**62.8**
50	**451.6**	**1534.0**	**83.3**
100	**931.0**	**3528.0**	**92.01**
L.S.D. 5%	**17.5**	**37.8**	**4.3**

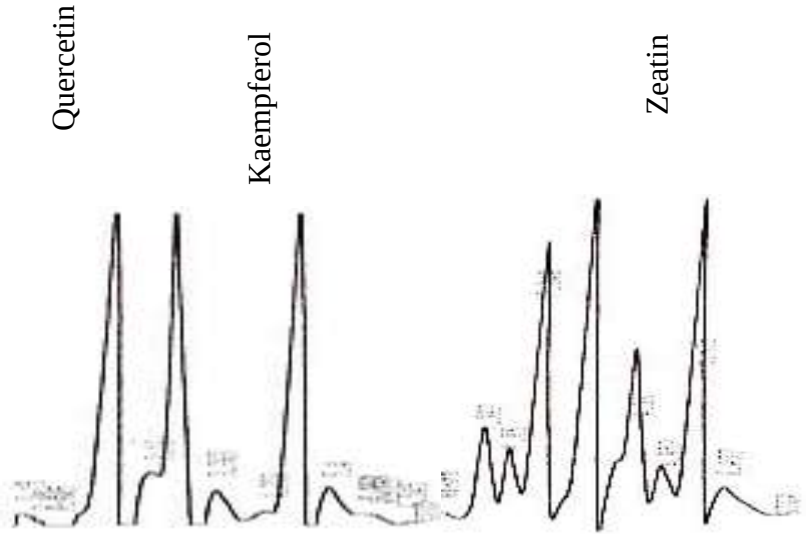


الشكل (2–B) تأثير PEG بالتركيز 25 غرام لإنتاج المركبات الثانويه من نسيج الكالس لنبات المورنغا بعد خمسة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي

المركب	زمن الاحتجاز	المساحة
Kaempferol	**4.49**	**42148**
Quercetin	**1.39**	**55065**
Zeatin	**5.49**	**84419**

الشكل (2–C) تأثير PEG بالتركيز 50 غرام لإنتاج المركبات الثانويه من نسيج الكالس لنبات المورنغا بعد خمسة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي

المركب	زمن الاحتجاز	المساحة
Kaempferol	**4.48**	**53660**
Quercetin	**1.35**	**77098**
Zeatin	**5.50**	**109301**



الشكل (2–D) تأثير PEG بالتركيز 100 غرام لإنتاج المركبات الثانويه من نسيج الكالس لنبات المورنغا بعد خمسة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي

المركب	زمن الاحتجاز	المساحة
Kaempferol	**4.52**	**86935**
Quercetin	**1.35**	**153334**
Zeatin	**5.49**	**164231**

تشير نتائج الجداول السابقة (1 و2) إلى ارتفاع محتوى المركبات الثانويه المنتجة في نسيج الكالس عند إضافة المحفزات كالسكروز والبولي اثلين كلايكول. نلاحظ إن إنتاج المركبات الثانوية من الكالس قد تباينت باختلاف تراكيز السكروز المضافة، إذ إن زيادة تراكيز السكروز أدت إلى زيادة تدريجية في كمية Quercetin، Kaempferol والـ Zeatin اذ تفوق الوسط المجهز بـ 120غم. لتر$^{-1}$ سكروز معنويا على بقية التراكيز الاخرى وقد يعزى السبب إلى إن الكاربوهيدرات من المكونات المهمة لأي وسط غذائي ويتحدد تأثيرها في الجزء النباتي المزروع في كونها مصدر الكاربون والطاقة اللازمه لاتمام العمليات الحيوية المختلفة فضلا عن دورها في تنظيم ازموزية الوسط والمحافظه على الضغط التنافذي (12). وان زيادة كمية السكروز تؤدي إلى التعرض التدريجي للإجهاد والذي يؤثر في الأنزيمات وذلك بسبب عملية سحب الماء Dehydration من البروتوبلازم، مما يحفز الخلايا على أنتاج مركبات الأيض الثانوي (16). وهذا يتفق مع ما توصل إليه (14) بان زيادة تركيز السكروز ادى الى زيادة تراكم المركبات الفلافونية الـ Quercetin و Isoquercetin في المزارع الخلوية لنبات *Astragalus missouriensis* و نتائج (2) عند زراعة كالس نبات المريمية وكذلك نتائج كل من (13) في كالس نبات البلادونا و(3). كذلك يلاحظ ان هناك زيادة معنوية في كمية المواد الفعاله تحت تأثير البولي اثلين كلايكول والذي يرجع الى ان الخلايا النامية تحت ظروف الاجهاد الملحي ممكن ان يصنع polyamines التي تُعد مفتاحاً لبناء كثير من مركبات الايض الثانوي (24) اذ ان الـ PEG يزيد من سالبية الجهد الازوموزي للخلية ومن ثم يزيد تبادل الذائبات في الخلية ومن تصنيع مواد الايض الثانوي(7).

REFERENCES

1.Abdulkarim, S.M., K.L., Long, O.M. Lai, S.K. Muhammad, and H.M Ghazali. 2005. Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods, Food Chemistry 93: 253–263.

2.Al-marsoomi, H. I. M. 2010. Influence of medium components and explants on callus initiation and secondary metabolites production from *Salvia officinalis* plants. M.Sc. Thesis, Horticulture and Landscape Gardening Dep. College of Agriculture. University of Baghdad. (in Arabic) pp:75 -80

3.Al- mukhtar, S.A.M. 2015. Effect of Abiotic stress in Stimulation of Cardiac Glycoside Production from *Digitalis lanata in vitro*. Ph.D. Dissertation. Horticulture and Landscape Gardening Dep. Coll. of Agriculture. University of Baghdad . (in Arabic) pp:123

4.Al-sahooki, M.M. and K.M. Wahab. 1990. Application on Design and Analysis of Experiments. University of Baghdad. (in Arabic) pp: 488.

5.AL-zubaidy, A. M., K. I. Hassan, B. S. Jabbari. 2016. Analysis of naturally occurring phenolic compound of the genera *Clinopdium* L., *Hymenocrater fish* and C. A. Mey. And *Melissa* L. The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 44(1): 343-384

6.Bisset, N.G. 2007. Herbal Drug and Phytopharmaceuticals. Boca Raton, EL, CRC Prees, 118-125.

7.Choesin, D.N. and R.E .Boerner. 1991. In plant ecophysiology (Louis, P.V.,J.M.Ferallo and C.Willemot). Am.J. Bot., 78:80-84.

8.Collin, H. A. 2001 .Secondary production formation in plant tissue cultures. Plant growth Regu. 34: 119-134.

9.Duke, J. A. 1983. Assorted crop information sheets from Handbook of Energy Crops. Available at http://www. hort. purdue. edu/ newcrop/ duke_energy/Genus_species.html.

10.Fahey, J. W. 2005. *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. Trees for Life Journal, 1: 5. 198-208.

11.Farooq, F., M. Rai, A. Tiwari1 and Sh. Farooq. 2012. Medicinal properties of *Moringa oleifera*: An overview of promising healer. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(27), pp. 4368-4374

12.George, E. F., M. A. Hall and G. D. Klerk. 2008. Plant propagation by Tissue Culture 3rd edition. Published by spring. 1: 479.

13.Hamad, M.S. and N.G. Jassem. 2011. Effect of medium components and explant on Belladonna callus induction *in vitro.* The Iraqi Journal of Agricultural Sciences. (in Arabic) 42 (3): 95-07.

14.Lonkova, L. 2009. Optimization of flavonoid production in cell cultures of *Astragalus missouriensis* Nutt. (Fabaceae). Research Article. 5 (18): 92-97.

15.Makonnen, E.; A. Hunde,. and G. Damecha. 1997. Hypoglycaemic effect of *Moringa stenopetala* aqueous extract in rabbits. Phytotherapy ResearchVolume 11(2): 147–148.

16.Mohammed, A., K. 1985. Plant Physiology Science. P.1, Ibn- Alather Pre. Uni. Of Mousel, Iraq.pp:55

17.Pacomel, O.A., D.N, .Bernard; D., Sekou; A., Joseph; G.J, David; K. Mongomake and K.T, Hilaire. 2014. Phytochemical and Antioxidant Activity of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa*L.) Petal Extracts. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 5(2): 1453 – 1465.

18.Park, S. U., M. R. Uddian; H. Xu; Y. K. kim and S. Y. Lee. 2008 Biotwechnological applications for rosmarinic acid production in plant. Afr. J. of biot., 7(25): 4954-4965.

19.Poteet, M.D. 2006. Biodiesel Crop Implementation in Hawaii, Department of Agriculture, Hawaii Agriculture Research Center. The State of Hawaii. pp:57

20.SAS, 2004. SAS Users Guide for Personal Computers. SAS Inst. Inc. Cary, NC. USA. PP:11

21.Shahzad, U., M. J., Jaskani, S., Ahmad and F. S., Awan. 2014. Optimization of the micro-cloning system of threatened *Moringa oleifera* LAM. Pak. J. Agri. Sci. 51(2): 449-457

22.Shoji, T., R. Winz, T. Lwase, K. Nakajima; Y. Yamada and T. Hashimoto. 2004. Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco. Plant Mol. Biol., 50:1427-1440.

23.Suarez, B., N., Palacios, N., Fraga, and R., Rodriguez. 2005. Liquid chromatographic method for quantifying polyphenols in ciders by direct injection. Journal of Chromatography, 1066: 105 – 110.

24.Tun, N.N., C. Santa - Catarina, T.Begum, V.Slveira, W.H. Enylochevet, S. Floh and G.F.E. Scherer.2006. Polyamines induce rapid biosynthesis of Nitric Oxide (NO) in *Arabodopsis thaliana* seedlings. Plant Cell Physiol. 47:346-354.

25.Unyayar, S. 1996. A modified method extraction and identification of IAA, GA, ABA and Zeatin produced by Chryoprium, J Plant Physiol, 22, (3-4), 4105 – 110.

26.Yadav, S. and J., Srivastava. 2016. *Moringa Oleifera*: A health promising plant with pharmacological characters. Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences, 6(1): 24-33.

27.Zhang A.; L. Wan; C. Wu; Y. Fang; G. Han; H. Li and H. Wang . 2013. Simultaneous determination of 14 phenolic compounds in grape canes by HPLC-DAD-UV Using Wavelength Switching Detection Journal Molecules, 18: 14241-14