تأثير بعض منظمات النمو النباتية في انتاج القلويدات الكلية لنبات الاشواجندا (*Withania somnifera* L.) خارج الجسم الحي

علي خلف حمود بيان حمزة مجيد

باحث أستاذ مساعد

كلية الزارعة– 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 بعض منظمات النمو النباتية في انتاح القلويدات الكلية لنبات الاشواجندا (*Withania somnifera* L.) خارج الجسم الحي. استعملت تراكيز مختلفة من البنزل ادنين Benzyl Adenine (BA) ورمز لها A (0, 1 ،2، 3 ملغم.لتر$^{-1}$) ويرمز لهما(A0، A1 ، A2 ، A3) على التوالي، وحامض السالسليك Salicylic acid (SA) ورمز له B،(0 ،10 ،20، 30 ملغم.لتر$^{-1}$) ورمز لها(B0 وB1، B2، B3) على التوالي، والتداخل بينهما، اضيفت هذه التراكيز الى وسط MS في مرحلة التضاعف. عوملت البذور بالجبرلين بتركيز500 ملغم/ لتر لمدة 18 ساعة عند درجة حرارة الغرفة الاعتيادية في جميع مراحل العمل النسيجية المتعلقة بزراعة البذور.ادت اضافة ال BA بالتركيز 1 ملغم .لتر$^{-1}$ الى زيادة معنوية في عدد الأفرع 4.22 فرع والمحتوى النسبي من الكلوروفيل 34.07(SPAD Unit)، ولم يختلف معنويا عن التركيز2 ملغم .لتر$^{-1}$ في عدد الاوراق 12.05 و11.32 ورقة والوزن الطري 1.42 و1.40 غم والوزن الجاف للمجموع الخضري 0.134 و 0.128 غم على التوالي ، ايضا ادى اضافة ال SA بالتركيز 10 ملغم.لتر$^{-1}$ الى زيادة عدد الأفرع 3.45 فرع وعدد الاوراق 14.05 ورقة والوزن الجاف للمجموع الخضري0.140 غم والوزن الطري للمجموع الجذري 0.76 غم والوزن الجاف للمجموع الجذري 0.06 غم، ولم يختلف معنويا عن التركيز20 ملغم.لتر$^{-1}$ في المحتوى النسبي من الكلوروفيل 33.77 و 35.47 (SPAD Unit) والوزن الطري للمجموع الخضري 1.47 و1.40غم وعدد الجذور 18.00و20.10 جذر والنسبة المئوية للتجذير 7.89%، 8.51%. واظهر التداخل بين BA وSA تفوق معنوي لمعاملة A1B1 في جميع الصفات الخضرية المدروسة التي لم تختلف معنويا عن المعاملةA2B1 في صفات عدد الاوراق 15.30، 14.80 ورقة والوزن الطري للمجموع الخضري 1.61و 1.59 غم والوزن الجاف للمجموع الخضري 0.160 و0.160 غم. واعطت المعاملة A0B1 التي جذرت وتم اقلمتها محتوى كمي من القلويدات الكلية 0.105 (ملغم.غم$^{-1}$). وادت اضافة ال BA بالتركيز 2 (ملغم.لتر$^{-1}$) الى زيادة في المحتوى الكمي للقلويدات الكلية بلغت 0.091 (ملغم.غم$^{-1}$)، وادى اضافة ال 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 وA1B1 في الحصول على اعلى زيادة من القلويدات الكلية بلغت 0.101 و0.100 (ملغم.غم$^{-1}$) مقارنة بمعاملة المقارنة A0B0 التي اعطت اقل محتوى 0.029 (ملغم.غم$^{-1}$).

كلمات مفتاحية: نبات الاشواجندا، البنزل ادنين، حامض السالسليك، القلويدات الكلية

*البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول

EFFECT OF SOME PlANT GROWTH REGULATORS ON TOTAL ALKALOIDS PRODUCTION OF ASHWAGANDHA (*Withania somnifera* L.) *In Vitro*

A. Kh. Hamood **B. H. Majeed**

Researcher **Ass. Prof.**

Dept. Horticulture - College of Agriculture –Baghdad University

alikhalf568@yahoo.com

ABSTRACT

An experiment was conducted in the tissue culture laboratory, College of Educated For Pure Science, Diyala Uinversity in 2014-2015,to investigate the influences of some plant growth regulators on total alkaloids production for ashwagandha 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 respectively، and also four concentrations of Salicylic acid 0, 10, 20, and 30 mg.l^{-1} which were represented with B0, B1,B2 and B3 respectively, with the interaction among of Benzyl Adenine and Salicylic acid,these are concentrations added to growing media(MS) in multiplication stages. Seeds were soaked with gibberellic acid 500 mg.l^{-1} for 18 h at room temperature in the all treatments. Benzyl Adenine at 1 mg.l^{-1} significantly increased branches number 4.22 branch, and Chlrophyll content 34.07 (SPAD Unit),there is no significant differences at 2 mg.l^{-} in leaves number 12.05,11.32 leaf, fresh and dry matter of vegetative system 1.42,1.40 g, and 0.134,0.128 g, also SA at 10 mg.l^{-1} led to increased in number of branches 3.45 branch, number of leaves 14.05 leaf, dry weight of vegetative system 0.140 g , fresh and dry weight of root system 0.76 ,0.06 g respectively, there is no significant differences at 20 mg.l^{-} in Chlrophyll content 33.77, 35.47(SPAD Unit), fresh weight of vegetative system,1.47, 1.40 g, number of roots 18.00,20.10, and percentage of rooting 7.89% ,8.51%. Interaction among of Benzyl Adenine and Salicylic acid (A1B1) shows a significant superiority in all studed vegetative characters, there is no significant differences with (A2B1) in leaves number15.30, 14.80 leaf, fresh weight of vegetative system1.61,1.59 g, dry weight of vegetative system 0.160 ,0.160 g, A0B1 treatment which rooted 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 alkaloids0.091 (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: ashwaghndha plant, benzyl adenine, salicyic acid, total alkaloids.

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

المقدمة

يعد نبات الاشواجندا(Withania somnifera L.) من النباتات الطبية والاقتصادية، يتبع العائلة الباذنجانية Solanaceae، ينمو بريا وموطنه الأصلي الهند ويزرع في مناطق عديدة من العالم، ينمو النبات في العراق بريا بشكل محدود في المناطق الوسطى والجنوبية ويسمى بعدة تسميات منها الوذنية فى اللغة الهندية، ويسمى ايضا الأشواجندا في اللغة السنسكريتية وكرز الشتاء winter cherry، سم الفراخ (22)، يحدث للبذور احيانا تباين وراثي عند اكثارها جنسيا، ويمكن أن تعامل البذور قبل البذار ببعض المعاملات الكيميائية مثل حامض الجبرلين لزيادة نسبة الانبات (15). أستخدم النبات منذ ما يزيد عن 3000 سنة في نظام الطب الأيروفيدا الهندي Ayurvedic practitioners لامتلاكه مركباته قدرات علاجية منها القلويدات التي تعد موسعة للشرايين، وتقلل الكوليسترول فى الدم، وتعالج مرض نقص المناعة المكتسب (الإيدز) وكمضادات للأكسدة اضافة الى تثبيطها الاورام (8). يحدث انتاج لهذه المركبات القلويدية الستيرويدية alkaloids steroidal والقلويدات الاخرى طبيعيا في نبات الاشواجندا (17). تلعب منظمات النمو دورا في أنتاج الاحماض الأمينية التي تعد كبادئات أو كمواد أولية لإنتاج تلك القلويدات (28) تتراكم قلويدات النبات في الأنسجة التي يكون معظمها في مواقع مثل النهايات الطرفية وأن الأنتاج الكمي لها في العموم يكون واطئ جداً، رغم ذلك فأن لبعضها قيمة باهضة الثمن (20). تزايد الاهتمام بتقانة زراعة الأنسجة النباتية Plant tissue culture واعتمادها كبديل عن الزراعة التقليدية في إنتاج المركبات الطبية وتعد عملية تنمية الاجزاء الخضرية كالافرع احدى تقانات زراعة الانسجة النباتية وأحد الاهداف الرئيسية في انتاج المركبات الثانوية (18). تؤثر منظمات النمو النباتية في أيض النبات ومستويات نواتج الأيض الثانوية وتراكمها في النبات، وقد لا يقتصر تأثيرها على مركب معين (20) تعمل السايتوكاينينات على زيادة انقسام الخلايا وبناء الكلوروفيل والبروتينات وتنشيط أنزيمات الخلية (13) ولها دور في التمايز على مستوى الخلية وتكوين الأعضاء وسير العمليات الايضية، كذلك تشترك المسارات الحيوية لبناء للسايتوكاينينات مع بعض المسارات الحيوية الاخرى لانتاج المركبات الثانوية (28) اذ لها دورا ايجابيا ايضا في زيادة انتاج القلويدات وعبر مركب البنزل أدنين (20)، وتؤدي السايتوكاينينات التي تضاف الى الوسط الغذائي الى تشجيع تضاعف الافرع والتمايز المورفولوجي اللذان يرتبطان بانتاج بعض المركبات الثانوية التي تشكل اهمية دوائية كبيرة في نبات الاشواجندا (24). كذلك تؤثر المحفزات Elicitors في النمو والايض الثانوي والتي يعد بعضها من منظمات النمو مثل حامض السالسليك (20). يعمل على قدح وتنشيط تراكم المركبات الثانوية حيث يعطي اشارة للبدء بعملية التراكم وكجزء من استجابة دفاعية خارجية (30). ويؤدي حامض السالسليك ايضا دورا مهما في تنظيم العمليات الفسيولوجية مثل النمو، والتمثيل الكاربوني وايض النتروجين، مما ينعكس على زيادة المجموع الخضري وبالتالي انتاج المركبات الثانوية (10)، أشار Shakirovaواخرون(23) الى ان حامض السالسليك يزيد من محتوى الاوكسينات والسايتوكاينينات في النبات. كما يعمل على تحسين النمو الجذري وزيادة كفاءة امتصاص الجذور والوزن الجاف للجذور (26). لقد بدات دراسات مبكرة حول انتاج المركبات الثانوية خارج الجسم الحي من نبات الاشواجندا، واشار Sharada واخرون (24) الى ان الزراعات الاجزاءالخضرية للأفرع تعد أكثر انتاجا للمركبات الثانوية في نبات الأشواجندا من الزراعات التي تعتمد على الكالس او زراعات الخلايا المعلقة، فقد أمكن إستعمال هذه التقانة بإنبات بذور النبات وزراعة أطراف الأفرع (25). وجد Supeواخرون (27) أن البنزل أمينو بيورين BAP أفضل السايتوكاينينات في زيادة عدد الافرع، وان اضافة حامض السالسليك خارج الجسم الحي يؤثر في انتاج مركبات الثانوية في نبات الاشواجندا، اذ يعمل ايضا على زيادة الوزن الجاف لاوراق النبات، اذ كلما زاد زادت كمية المركبات الفعالة في الاوراق المعاملة بحامض السالسليك(8).ويعد من أكثر الطرق الفعالة في إنتاج القلويدات في مجال النباتات الطبية (14). ان معرفة قدرة الجزء النباتي المزروع على التجذير واستكمالا لمتطلبات التجربة النسيجية من الدعائم المكملة لمراحل التجربة النسيجية.

المواد وطرائق العمل

نفذ البحث في مختبر زراعة الأنسجة النباتية في كلية التربية للعلوم الصرفة– جامعة ديالى للفترة من 1/ 10/ 2014 الى 11/1/ 2015.تم الحصول على بذور نبات الاشواجندا من مشروع زراعة النباتات الطبية والعطرية التابع للشركة العامة 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 لهA، والعامل الثاني حامض السالسيلك Salicylic acid(SA) ويرمز له B، وبثلاث تراكيز لكل منهما (1 ،2، 3 للعامل الاول و 10، 20، 30 ملغم. لتر$^{-1}$للعامل الثاني) ويرمز لهما (A1 ، A2 ، A3 وB1، B2 ، B3) على التوالي، بالإضافة الى معاملة المقارنة التي يرمز لها A0 وB0 والتداخل بينهما عند مرحلة التضاعف (25) و (8) و (11)، واستخدم التصميم العشوائي الكامل (Completely Randomized Designe) (7). عوملت البذور بالجبرلين بتركيز500 ملغم/ لتر لمدة 18 ساعة عند درجة حرارة الغرفة الاعتيادية في جميع مراحل العمل النسيجية المتعلقة بزراعة البذور (21).

أجريت عمليات التعقيم وشملت مراحل العمل المختلفة سواء فيما يتعلق بالبذور، أو وسط MS، وأدوات العمل ومكانه من خلال وضعها في حاويات معدنية Canisters بأستخدام الموصدة Autoclave على درجة حرارة 121^0C وتحت ضغط 1.04كغم/ سم^2 لمدة 30 دقيقة.

انشاء مزرعة التضاعف

اعتمدت البذور المعاملة بالجبرلين بتركيز 500 ملغم/ لتر لمدة 18 ساعة عند درجة حرارة الغرفة، تم تعقيمها بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز 3% لمدة 15 دقيقة بناءا على اختبارات سابقة ، وزرعت على وسط كامل القوة من MS (19)، للحصول على بادرات استأصل منها القمة النامية والجزء الفلقي بعمر 15 يوما، زرعت تلك الاجزاء النباتية التي حصل عليها على وسط كامل القوة من MS مجهز بالبنزل ادنين تركيز 1ملغم.لتر$^{-1}$، سجلت اعداد الافرع واطوالها بعد 15، 30 يوما واخذت معدلاتها، اجريت عملية اعادة الزراعة subcultur للافرع الناتجة بعد 30 يوما من زراعتها وزرعت على نفس مكونات الوسط وتركيز BA، ثم سجلت القراءات لاعداد الافرع المزروعة واطوالها واخذ معدلاتها بعد مرور 15 و30 و 45 يوما. فيما ابقي على فرع للجزء النباتي الام عند اجراء اعادة الزراعة وزراعته على نفس مكونات الوسط السابق للاستفادة منه بزيادة عدد الافرع وبذا اصبح لدينا مزرعة من الأفرع المتضاعفة. زرعت الافرع التي تم الحصول عليها من انشاء مزرعة التضاعف على وسط MS شبه الصلب لدراسة تأثير عوامل التجربة BAوSA والتداخل بينهما في زيادة القلويدات،وعومل الوسط بتلك المنظمات ووفقا للتراكيز المشار اليهما سابقا، تضمنت كل معاملة 10مكررات، سجلت القراءات لجميع المعاملات بعمر 30 يوما.

مؤشرات الدراسة لتجربة الزراعة النسيجية

النمو الخضري

عدد الأفرع (فرع. نبات$^{-1}$): سجلت اعداد الافرع لكل مكرر من المكررات العشرة اذ تم حسابها مرئيا بالمشاهدة الاعتيادية لكل جزء نباتي، ثم حسب معدلها.

عدد الاوراق (ورقة. نبات$^{-1}$): تم حساب عدد الاوراق لكل مكرر من المكررات العشرة لكل معاملة، ثم حسب معدلها.

المحتوى النسبي للكلوروفيل في المجموع الخضري (SPAD Unit): استخدام جهاز Chlorophyll meterنوع SPAD-502 والمصنع من قبل شركة Minolta للحصول على قيم الكلوروفيل 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 باستخدام ميزان حساس ثم حسب معدل الاوزان الطرية المجموع الخضري للمكررات العشرة.

الوزن الجاف للمجموع الخضري (غم. نبات$^{-1}$): جفف المجموع الخضري للمكررات العشرة من كل معاملة في فرن كهربائي في درجة حرارة 70^0C لحين ثبات الوزن (6).

النمو الجذري

الوزن الطري للمجموع للجذري(غم.نبات$^{-1}$): تم تقدير الوزن الطري للمجموع الجذري للمكررات العشرة، ووزنت الاجزاء

الجذرية لكل مكرر باستخدام ميزان حساس ثم حسب معدل الاوزان الطرية المجموع الجذري للمكررات العشرة.

الوزن الجاف للمجموع الجذري (غم. نبات$^{-1}$): جفف المجموع الجذري لجميع المكررات العشرة، جففت العينات في فرن كهربائي في درجة حرارة 70^0C لحين ثبات الوزن (6).

عدد الجذور: سجلت اعداد الجذور لكل نبيتة من الاشواجندا من النبيتات العشرة، ثم حسب معدلها.

طول الجذور(سم): تم قياس طول الجذور لكل مكرر بقّياسها 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، وتم زراعتهاعلى وسط يحتوي بتموس فقط مغطاة باكياس بلاستيكية لمدة عشرة ايام ثم نقلتا لى الحقل المكشوف بعد ازالة الاكياس، اخذت العينات الورقية لاغراض التحليل الكيميائي بعد30 يوما من نقلها من المختبر النسيجي الى الحقل المكشوف. ولمعرفة مدى استجابة النبات للتجذير.

التقدير الكمي للقلويدات الكلية في المجموع الخضري: تم اجراء كشف وتقدير الكمي للقلويدات الكلية Alkaloids Total في المختبر المركزي لكلية الزراعة. جامعة بغداد، اذ 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 ماذكره Al-Muktar (5).

النتائج والمناقشة

من الضروري التعرف على استجابة الجزء النباتي كمرحلة اولية للنشوء ،اذ ان زراعة القمة النامية مع الجزء الفلقي على وسط MS يحوي البنزل ادنين بتركيز1(ملغم.لتر$^{-1}$) تعد الاساس في المراحل اللاحقة للتجربة النسيجية لانشاء مزرعة الافرع. وقد يعزى تفوق هذا الجزء النباتي الى سرعة انقسام خلايا القمة النامية كونها خلايا غير متخصصة وغير متمايزة وفي مرحلة تطورية اولية ، ان تركيز1(ملغم/لتر) من البنزل ادنين يعد الافضل في زيادة انقسام الخلايا تتفق هذه النتائج مع ماوجدهSharma وSen (25) الذي بين ان البنزل ادنين عند تركيز 4.4 مايكرومول ادى الى افضل استجابة للجزء النباتي الذي استئصل من بادرات نسيجية لبذور الاشواجندا من حيث النشوء وعدد الافرع، كما ان الوسط MS الذي تزرع عليه الاجزاء الخضرية يعد الافضل في النشوء عند اضافة بعض منظمات النمو.

تأثير المدة الزمنية في زيادة اعداد الافرع واطوالها في مرحلة التضاعف لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي: توضح النتائج في الجدول **1** تأثير المدة الزمنية في زيادة اعداد الافرع واطوالها في مرحلة التضاعف، اذ ان زيادة المدة الزمنية قد ادت الى زيادة عدد الافرع اضافة الى تأثير الجزء النباتي المزروع (الافرع) الناتج من عملية اعادة الزراعة، اذ 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 ، و6.20 (فرع) بعد 45 و30 يوما من الزراعة ومقارنة مع اقل معدل من عدد الأفرع عند 15 يوما من الزراعة بلغ 3.00 (فرع)، ترافقت 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 من عددا لأفرع بلغ 2.10(سم).

جدول 1. تأثير المدة الزمنية في زيادة اعداد الافرع واطوالها في مرحلة التضاعف لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي

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

قد تعزى الزيادة في عدد الافرع واطوالها الى الزيادة بالفترة الزمنية كذلك تاثير عملية Subculture يبدو انها ادت الى زيادة سرعة انقسام الخلايا وتمايزها الى افرع، تعد هذه العملية اساس لانشاء مزرعة تضاعف الافرع، تتفق النتائج مع ماوجده Zeinab (29) من ان عملية Subculture 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 وأطوالها، تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليهSharmaوSen (25) و Irshad واخرون (11) الذين أشاروا الى امكانية استخدام السايتوكاينين مثل BAP لوحده

من اجل تضاعف الافرع عند زراعة اجزاء نباتية لنبات الاشواجندا على وسط MS.

تاثير البنزل أدنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في مؤشرات النمو الخضري لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي للعام 2014

تأثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في عدد الافرع لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي للعام 2014 : 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 تاثير التداخل بين BA وSA فقد اثر معنويا في اعطاء اعلى معدل عند معاملة A1B1 بلغ 4.80 فرع مقارنة مع المعاملة A0B1 التي كانت ادنى معدل بلغ 2.00 فرع.

جدول 2. تاثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في عدد الافرع خارج الجسم الحي لنبات الاشواجندا للعام 2014

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

تاثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في عدد الاوراق خارج الجسم الحي لنبات الاشواجندا للعام 2014

تشير النتائج في الجدول 3 ان BA قد اثر معنويا في زيادة عدد الأوراق واعطى اعلى معدل عند المعاملة A1 وA2 بلغ 12.05 و 11.32 ورقة، وأقل معدل عند المعاملة A3 و A0 وبلغ 9.35و10.00 ورقة على التوالي، واثر SA أيضا معنويا في اعطاء اعلى معدل من عدد الأوراق عند معاملة B1 بلغ 14.05 ورقة التي تفوقت معنوياعن بقية المعاملات، فيما اعطت أقل معدل معاملة المقارنة B0 بلغ 8.45. أما تاثير التداخل بين BA وSA فقد أثر معنويا في اعطاء أعلى معدل عند معاملة A1B1 بلغ 15.30 ورقة التي لم تختلف معنوياعن المعاملات A2B1، A0B1، A1B2 التي بلغت معدلاتها14.80، 14.60، 13.70 ورقة، مقارنة بمعاملة المقارنة A0B0 التي كانت أقل معدل بلغ فيها 6.40 ورقة.

جدول 3. تاثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في عدد الاوراق لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي للعام 2014

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

تاثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في المحتوى النسبي من الكلوروفيل (SPAD Unit) لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي للعام 2014: تشير النتائج في الجدول 4 ان BA قد اثر معنويا في زيادة المحتوى النسبي من الكلوروفيل واعطى اعلى معدل عند المعاملة A1 وA3 بلغ 34.07 و 32.67(SPAD Unit) على التوالي، فيما اعطت اقل معدل معاملة المقارنة A0 بلغ 31.22 (SPAD Unit)، فيما اثر SA معنويا في اعطاء اعلى معدل في المعاملة B2 وB1 وبلغ 35.47، 33.77 (SPAD Unit) على التوالي، بينما اعطت معاملة المقارنة B0اقل معدل بلغ 29.60 (Unit SPAD). اما تاثير التداخل بين BA وSA فقد اثر معنويا في اعطاء اعلى

معدل عند معاملة A1B1 بلغ 38.00 (SPAD Unit) مقارنة بمعاملة المقارنة A0B0 التي كانت أقل معدل بلغ 27.40 (SPAD Unit).

جدول 4. تاثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في المحتوى النسبي من الكلوروفيل (SPAD Unit) لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي للعام 2014

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

تاثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في الوزن الطري للمجموع الخضري (غم .نبات$^{-1}$) لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي للعام 2014: يتضح من النتائج في الجدول (5) ان BA قد اعطى اعلى معدل عند المعاملة A1 بلغ 1.42 (غم.نبات$^{-1}$) التي لم تختلف معنويا عن المعاملة A2 التي بلغت 1.40 (غم.نبات$^{-1}$)، بينما كان اقل معدل المعاملة A3 ومعاملة المقارنة أذ بلغتا 1.14 و 1.15 (غم.نبات$^{-1}$) على التوالي، كما واثر SA ايضا معنويا في اعطاء اعلى معدل عند معاملة B1 و B2 بلغ 1. 47 ، 1.40 (غم.نبات$^{-1}$) على التوالي،مقارنة بأقل معدل عند معاملة المقارنة B0 بلغ 1.10(غم .نبات$^{-1}$). اما تاثير التداخل بين BA وSA فقد اثر معنويا في اعطاء اعلى معدل عند المعاملة A1B1 بلغ1.61 (غم.نبات$^{-1}$) مقارنة بمعاملة المقارنة A0B0 التي كانت أقل معدل بلغ 0.82 (غم.نبات$^{-1}$)، ولم تختلف معنوياعن المعاملات A2B1، A2B2، A1B2 التي بلغت معدلاتها1.59، 1.54، 1.53 (غم .نبات$^{-1}$) على التوالي.

جدول 5. تاثير البنزل ادنين وحامض السالسيلك والتداخل بينهما في الوزن الطري للمجموع الخضري لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي (غم.نبات$^{-1}$) للعام 2014

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

تاثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل في الوزن الجاف للمجموع الخضري (غم .نبات$^{-1}$) لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي للعام 2014: 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. 0 (غم .نبات$^{-1}$) التي تفوقت معنويا على بقية المعاملات، فيما اعطت معاملة المقارنة B0 اقل معدل بلغ 0.095 (غم .نبات$^{-1}$). اما تاثير التداخل بين BA وSA فقد اثر معنويا في اعطاء اعلى معدل عند معاملة A1B1 بلغ 0.160 (غم .نبات$^{-1}$) مقارنة بمعاملة المقارنة A0B0 التي كانت أقل 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.

جدول 6. تاثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في الوزن الجاف للمجموع الخضري (غم .نبات$^{-1}$) لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي للعام 2014

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

تعد تنمية الأجزاء الخضرية (الأفرع) نسيجيا In vitro shoot culture في نبات الأشواجندا احد طرق اكثار وانتاج 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 السايتوكاينينات التي لها القابلية على تحفيز عملية التضاعف الخضري وذلك من خلال القضاء على ظاهرة السيادة القمية للبراعم الطرفية ومن ثم تحفيز البراعم الأبطية للأجزاء النباتية المزروعة على النمو والتطور ومن ثم أعطاء الأفرع الجانبية (29) ويعد افضل السايتوكاينينات في زيادة عدد الافرع نسيجيا عند زراعة اجزاء نباتية مرستيمية مثل القمم النامية shoot tip explants لنبات الاشواجندا على وسط MS (27)، وقد يعمل لوحده او 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 (الجداول 3 –6) تتفق هذه النتائج مع ما حصل عليها على نبات الاشواجندا Sharmaو Sen (25) وSharada واخرون (24). كما أن تأثير SA معنويا في اعطاء اعلى معدل من الأفرع والأوراق وزيادة في المحتوى النسبي من الكلوروفيل والوزن الطري والوزن الجاف قد يعود الى تأثيره في زيادة مستويات السايتوكاينينات التي تعمل بدورها على تشجيع التمايز المورفولوجي وتكوين أكبر عدد من الافرع نسيجيا في نبات الأشواجندا (24) مما يؤدي الى انعكاس ذلك على تحقيق اعلى زيادة في عدد الاوراق. وله دورا في تصنيع البورفرينات التي تدخل في بناء 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 السايتوكاينينات التي تشجع من بناء البروتينات ونقل المغذيات الى الأنسجة الفعالة وتنشيط الأنزيمات اللازمة للتفاعلات الحيوية في الخلية ينعكس على زيادة المادة الجافة في الأوراق، اضافة 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 Kadim واخرون(13) وBanu (8). وادت التاثيرات المشجعة للنمو الخضري لكلا الهرمونين معا الى التفوق في أغلب مؤشرات النمو الخضري.

تاثير حامض السالسليك في مؤشرات المجموع الجذري لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي للعام 2014: لوحظ ان بعض الأفرع الخضرية المزروعة على وسط MS شبه الصلب الخالي من اية اضافة لمنظمات النمو لمعاملة المقارنةB0 قد كونت جذور، اضافة الى تجذير بعض الافرع المزروعة لمعاملات اضافة حامض السالسليك لوحده بتراكيزه المختلفة للمعاملات (B1، B2 ، B3) لذا سجلت القراءات للافرع التي جذرت. اذ تبين النتائج في الجدول (7) أن SA قد اثر معنويا في زيادة عدد الجذور باعطاءه اعلى معدل عند المعاملة B2 وB1 بلغ 20.10 ، 18.00 جذر، ومقارنة بمعاملة المقارنة B0 التي أعطت أقل معدل من الجذور14.70 جذر، وادت اضافته أيضا الى زيادة اطوال الجذور بلغ اعلى معدل لها عند المعاملةB2 8.64 (سم)، ومقارنة بمعاملة المقارنة B0 التي أعطت أقل أطوال من الجذور6.79 (سم)، واثر معنويا في زيادة وزن الطري للمجموع الجذري باعطاءه اعلى معدل عند المعاملةB1 بلغت0.76 (غم) والتي تفوقت معنويا على بقية المعاملات،

وأعطت معاملة المقارنة أقل وزن طري للمجموع الجذري بلغ 0.24 (غم)، واثر 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 المعاملةB2 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 %.

جدول 7. تاثير حامض السالسليك في مؤشرات المجموع الجذري لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي للعام 2014

تركيزB (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

على ضوء ما ذكر سابقا من نتائج فأن 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، أذ 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 الجذور بتشجيعه امتصاص العناصر الغذائية ومنه النتروجين والفسفور والبوتوسيوم (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 أضافة من منظمات النمو النباتية يتفق مع النتائج التي حصل عليهاSharma و Sen (25) على نبات الأشواجندا. يعزى الأستجابة العالية للأقلمة والزيادة في المحتوى الكمي من القلويدات الكلية ذات الأهمية الطبية اذ بلغ المحتوى الكمي للقلويدات الكلية بعد الأقلمة 0.105 ملغم.غم$^{-1}$ الى اعطاء اعلى زيادة في الوزن الجاف للمجموع الجذري (الجدول 7) والتفوق في اغلب الصفات. ان ميل الافرع للتجذير وكما ملاحظ عند تجذيرها على وسط خالي من منظمات النمو النباتية أضافة الى التجذير على وسط غذائي يحتوي على تراكيز مختلفة من SA لا تعني معرفة أفضل هرمون نمو من الاوكسينات يجعل الأفرع الخضرية لنبات الأشواجندا التي تزرع نسيجيا على أوساط غذائية تعطي أفضل استجابة للتجذير ما لم يتم اجراء اختبار لتلك الافرع على اكثر من هرمون.

تاثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في المحتوى الكمي للقلويدات الكلية في المجموع الخضري(ملغم .غم$^{-1}$) لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي للعام 2014:

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 المعاملةA3 بلغ 0.057 (ملغم .غم$^{-1}$)، واثرSA ايضا معنويا في اعطاء اعلى معدل عند معاملة B1 بلغ091. 0 (ملغم .غم$^{-1}$)، فيما اعطت اقل معدل معاملة المقارنة B0 بلغ 0.054 (ملغم .غم$^{-1}$). اما تاثير التداخل بين BA وSA فقد اثر معنويا في اعطاء اعلى معدل عند المعاملة A2B1 بلغ 0.101 (ملغم .غم$^{-1}$) في حين كان اقل معدل في المعاملة A0B0 بلغ0.029 (ملغم .غم$^{-1}$)، لم تختلف معنويا عن المعاملاتA1B1 ، A0B1، A2B2 التي اعطت المعدلات 0.100، 0.099، 0.098 (ملغم .غم$^{-1}$) على التوالي.

جدول 8. تاثير البنزل ادنين وحامض السالسليك والتداخل بينهما في المحتوى الكمي للقلويدات الكلية في المجموع الخضري (ملغم.غم$^{-1}$) لنبات الاشواجندا خارج الجسم الحي للعام 2014

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

أن الزيادة في المحتوى الكمي للقلويدات الكلية في المجموع الخضري كما يتضح من نتائج الجدول 8 عند أضافة BA الى الوسط الغذائي MS قد تعزى الى الزيادة في عدد الاوراق والوزن الطري والوزن الجاف للمجموع الخضري(الجداول 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 أضافة الى العمليات الحيوية الأخرى، تتفق هذه النتائج مع توصل اليه Al-Qaisy (4). اما تأثير أضافة 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 معاملة النباتات نسيجيا تعمل هذه التراكيز على زيادة انتاج القلويدات (16) وقد يرجع الى تاثيره في زيادة النتروجين في الانسجة النباتية من خلال زيادة قابلية الجذور في امتصاص العناصر الغذائية واهمها النتروجين وزيادة فعالية انزيم Nitrate Reductase بوجود No3 وبتالي 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 الكاربوني، 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 تاثير SA في عدد الافرع وعدد الاوراق ومحتوى الكلوروفيل النسبي والوزن الجاف للمجموع الخضري(الجداول 2 ، 3 ،5 ، 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 الجدول (7) يمثل أنعكاس للزيادة في بناء القلويدات، كما وله ودور في زيادة مستوى السايتوكاينينات والاوكسينات اللتان تعملان على زيادة انقسام الخلايا واستطالته وبالتالي زيادة الكتلة الحيوية (23). كما أن التأثيرات المشجعة للنمو الخضري لكلا العاملين BA وSA معا ومنها تأثيراتهما الأيجابية وتفوقهما في زيادة الوزن الجاف للمجموع الخضري جدول (6) أنعكست على تحقيق أعلى زيادة في المحتوى الكمي للقلويدات الكلية كما مبين في الجدول نفسه.

REFERENCES

1. Alam, M. M. M. Naeem, M. Idrees, M. Masroor A. Khan, .2012. Aug -mentation of photosynthesis, crop produc tivity, enzyme activities and alkaloids production in sadabahar (*Catharanthus roseus* L.) thr -ough application of diverse plant growth regulators. J. Crop Sci. Biotech.15 (2); 117129.
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.Agriculture College, Baghdad University. Al-Kufa Journal of Agricultural Sciences: 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.PP:1-225.

4. Al-Qaisy,S.A. 2010.Effect of Nitrogen Fertilizer the Growth and Some Quantity and Quality Charcters and Accumulation of Total Steroidal Alkaloids in Some Potata Cultivars. M.Sc. Thesis. College of Agriculture. University of Baghdad pp:120.

5. Al-Muktar,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 pp: 131.

6. Al-Sahaf, F. H. 1989 a. Plant Nutrition Applic ation. 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 with Anolide Accumulation in Invitro Roots and Leaves of *withania somnifera*.M.Sc. Thesis, Avinashilingam Instiute for Home Science and Higher Education for Woman Coinbatore PP:10043.

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*. Shridevi Institute of Medical Science & Research Hospital, Tumkur.Dep.of Anatomy, Shri B M Patil Medical College, Hospital and Research Centre Bldea University, Bijapur Dept. of Pharmacology Bldea's College of Pharmacy, Bijapur. 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.

11. Irshad A. B., A. Alia, R.C. Saxena. I. S. Kumar, and M. Ahmad.2013. In Vitro Propagation of *Withania Somnífera* (L.) Dunal (Ashwagandha) an Endangered Medicinal Plant *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 2319 – 670X Volume 2 Issue 3.

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. Dep.of Hort. College of Agriculture ,Baghdad University. 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".Agriculture College, Basrah University,Iraq.Journal of King Abdulaziz University,Vol.(23),No. 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: 483488.

16. Klessig .D.F. and J. Malamy, 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 pp:250.

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:1-265.

21.Salman,M.A.2014.Personal Comunication, 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 pp:115.

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. (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. doi: 10.1007/s12010-012-9809-2.

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 Dissentation Agric.College .Baghdad University .Iraq.

30. Zhao, I.C. Davis, and R. Veerporte. 2005. "Elicitor sginal transduction leading to production of plant secondary metabolites. "Biotechnology advances . 23: 283 -333.