جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء - كلية الزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق

تأثير بعض المحفزات الفيزيائية و الكيميائية في انتاج المركبات الايضية لنبات الحلبة *Trigonella foenum – graecum L* خارج الجسم الحي

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية الزراعة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية/ البستنة وهندسة الحدائق

من قبل

شروق حاكم كاظم

بإشراف

أ.م.د. سراب عبد الهادي محمد المختار

كانون الاول 2022 جمادى الاولى 1444

إقرار المشرف

اشهد ان اعداد الرسالة الموسومة : **تأثير بعض المحفزات الفيزيائية و الكيميائية في بعض المؤشرات الفسيولوجية وانتاج المركبات الايضية الثانوية في نبات الحلبة *Trigonella foenum – graecum* L. خارج الجسم الحي** جرت تحت اشرافي في قسم البستنة وهندسة الحدائق / كلية الزراعة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير / علوم في الزراعة - البستنة وهندسة الحدائق.

التوقيع:

اسم المشرف: سراب عبد الهادي محمد

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان : كلية الزراعة - جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2022

توصية رئيس قسم البستنة وهندسة الحدائق ورئيس لجنة الدراسات العليا

بناءً على التوصية المقدمة من الأستاذ المشرف أرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : كاظم محمد عبد الله

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية الزراعة - جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2022

اقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا اعضاء لجنة المناقشة قد اطلعنا على الرسالة الموسومة(تأثير بعض المحفزات الفيزيائية و الكيميائية في بعض المؤشرات الفسيولوجية وانتاج المركبات الايضية الثانوية في نبات الحلبة *Trigonella foenum – graecum* L. خارج الجسم الحي) وناقشنا الطالب في محتوياتها ووجدنا انها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير/ علوم في الزراعة – البستنة وهندسة الحدائق.

رئيس اللجنة

أ.د. بشير عبد الحمزة محمد

كلية العلوم - جامعة بابل

عضواً

أ.م.د. صباح عبد فليح

كلية الزراعة - جامعة كربلاء

عضواً

م.د. زيد خليل كاظم

كلية الزراعة - جامعة كربلاء

عضواً ومشرفاً

أ.م.د. سراب عبد الهادي محمد

كلية الزراعة - جامعة كربلاء

صدقت الرسالة في مجلس كلية الزراعة - جامعة كربلاء

أ.د. ثامر كريم خضير

العميد وكالة

2023 . ١٠ . 30

الأهداء

الى روح الحق

الى من أرسله الله رحمة للعالمين

الى النبي المرسل محمد صلى الله عليه وعلى اهله وصحبه وسلم

الى الروح التي خلقها الله تعالى نور في حياتي الى سندي اختي

الى والدي اللذان اوقدوا حياتهم لاجلي

الى من كان السند بالكلمة قبل الفعل الى ذاتي

الى من اسندني و وجهني في كل خطوة

دكتورة سراب المختار

شــكــر وتــقـديـــــــــــر

الحمد لله مالك الملك قبل كل شيء و بعد كل شيء، ونصلي ونسلم على المبعوث رحمة للعالمين سيدنا محمد وعلى آله وصحبه أجمعين.

أتقدم بالشكر إلى عمادة كلية الزراعة ورئاسة قسم البستنة وهندسة الحدائق والى كافة العاملين في الكلية لدورهم الكبير في أنجاز هذا الجهد العلمي.

شكري وتقديري إلى السادة أعضاء لجنة المناقشة لتفضلهم لمناقشة الرسالة وتوجيهاتهم العلمية.

كل الشكر و التقدير إلى الأستاذ الدكتورة سراب عبد الهادي محمد المختار لإشرافها على الرسالة ورعايتها لي طيلة مدة البحث. كما اتقدم بكامل الشكر الى مديري الدكتور المهندس وسام كريم متعب مدير قسم المشاريع الاستراتيجية في ديوان محافظة كربلاء المقدسة وزملاء العمل لدعمهم المعنوي طيلة مدة الدراسة.

وكل تقديري الى الاستاذ سعدون تركي عواد رئيس مهندسي الزراعيين لدعمه المعنوي المتواصل لي

ويقتضي مني واجب الوفاء أن أسجل شكري وتقديري إلى الاخ والزميل الاستاذ الحسن نصر الله لمساعدته الكبيرة في انجاز هذا البحث.

كما لا يمكن أن أنسى الجهد الكبير والمتميز من قبل زملائي طلبة الدراسات العليا لدعمهم الدائم لي.

واخيراً وليس آخراً فأنني لا يمكن أن أنسى الجهد والدعم الكبير المُقدم من قبل عائلتي والى كل من مد يد العون لي لإنجاز هذا البحث.

الباحث

قائمة المحتويات

التسلسل	عنوان الموضوع	الصفحة
	المستخلص Abstract	أ
1	المقدمة	1
2	مراجعة المصادر	4
1-2	الوصف العام لنبات الحلبة	4
2-2	التصنيف العلمي لنبات الحلبة	5
3-2	الاهمية الطبية لبذور نبات الحلبة	5
4-2	المحتوى الكميائي لنبات الحلبة	7
1-4-2	البروتينات	7
2-4-2	الكاربوهيدرات	7
2-4-3	الزيوت الثابتة و الطيارة	7
4-4-2	الفيتامينات	7
5-4-2	العناصر الغذائية	7
5-2	المركبات الفعالة في بذور نبات الحلبة	8
1-5-2	القلويدات	8
2-5-2	Trigonelline	9
3-5-2	الكلايكوسيدات	9
2-5-4	Diosgenine	10
6-2	إنتاج مركبات الأيض الثانوية خارج الجسم الحي	11
2-7	الأيض الثانوي في النباتات	13
8-2	تقانة زراعة الأنسجة النباتية	14
2-9	تعقيم الاجزاء النباتية	15

10-2	أستحثاث الكالس	16
11-2	منظمات النمو النباتية	18
12-2	تأثير الأوكسينات والسايتوكاينينات في تضاعف الزروعات	19
13-2	الاشعة فوق البنفسجية	19
2-13-1	التأثيرات الفسلجية للأشعة فوق البنفسجية	20
2-13-2	دورالأشعة فوق البنفسجية في انتاج المركبات الثانوية للنبات	22
14-2	الاحماض الامينية	22
15-2	Tryptophan	23
16-2	التشخيص الكمي والنوعي للكلايكوسيدات القلبية بواسطة HPLC	24
3	المواد وطرائق العمل	26
3-1	مصدر الاجزاء النباتية	26
3-2	التعقيم Sterilization	26
3-2-1	تعقيم الادوات المستخدمة	26
3-2-2	تعقيم البذور	26
3-3	الوسط الغذائي	27
3-4	مرحلة النشوء	28
5-3	مرحلة التضاعف	28
3-6	تعريض النموات الخضرية لاشعة فوق البنفسجية UV مع الحامض الاميني L-Tryptophan	29
3-7	تقدير الكلوروفيل	29
3-8	قياس تركيز الكاربوهيدرات	29
9-3	المنحنى القياسي للكاربوهيدرات	29
10-3	استحثاث الكالس	30
3-11	ادامة الكالس	31

12-3	تحفيز انتاج المركبات الايضية الثانوية (القلويدات والكلايكوسيدات)	31
3-13	التقدير الكمي والنوعي للمركبات الفعالة لنبات الحلبة (Diosgenineو Trigonelline) باستخدام تقانة كروموتوكرافيا السائل فائق الاداء(HPLC)	31
3-14	التحليل الاحصائي	32
4	النتائج والمناقشة	33
4- 1	تأثير NaOCl والمدد في النسبة المئوية لتلوث بذور نبات الحلبة	33
4-2	تاثير نوع الجزء النباتي و تراكيز BA في نشوء الزروعات	34
4-3	تاثير تراكيز BA و NAA والتداخل بينهما في معدل عدد الافرع الخضرية لنبات الحلبة	36
4-4	تاثير تراكيز BA و NAA والتداخل بينهما في معدل طول الافرع الخضرية لنبات الحلبة	37
4- 5	تأثير الـ BA و الـ NAA و التداخل بينهما في معدل عدد الاوراق لنبات الحلبة	39
4-6	تأثير الـ BA و الـ NAA و التداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للافرع الخضرية	41
4-7	تأثيرالتربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) و التداخل بينهما على معدل عدد الافرع الخضرية بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS	43
4-8	تأثيرالتربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) و التداخل بينهما على معدل طول الافرع الخضرية بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS-	44
4-9	تأثيرالتربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) و التداخل بينهما على معدل عدد الاوراق بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS-	45
4-10	تأثيرالتربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) و التداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للمجموع الخضري-	46
11-4	تأثيرالتربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) و التداخل بينهما في معدل تركيز الكلوروفيل للمجموع الخضري	48
12-4	تأثيرالتربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) و التداخل بينهما في معدل تركيز الكاربوهيدرات للمجموع الخضري-	49
13-4	تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في معدل تركيز Trigonelline (مايكروغرام-غم$^{-1}$) للمجموع الخضري-	52

14-4	تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في معدل تركيز Diosgenine (مايكروغرام-غم$^{-1}$) للمجموع الخضري-	53
15-4	تاثير تراكيز 2,4- D و BA في النسبة المئوية لاستجابة القمة النامية لاستحثاث الكالس-	54
16-4	تاثير تراكيز 2,4- D و BA في النسبة المئوية لاستجابة الورقة لاستحثاث الكالس-	56
17-4	تاثير تراكيز 2,4- D و BA في معدل الوزن الطري للكالس المستحث من القمة النامية-	58
18-4	تاثير تراكيز 2,4- D و BA في معدل الوزن الجاف للكالس المستحث من القمة النامية-	59
19-4	تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل الوزن الطري للكالس-	61
20-4	تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل الوزن الجاف للكالس-	62
21-4	تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل تركيز Trigonelline (مايكروغرام-غم$^{-1}$) في كالس نبات الحلبة -	64
22-4	تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل تركيز Diosgenine (مايكروغرام-غم$^{-1}$) في كالس نبات الحلبة -	65
5	الاستنتاجات والتوصيات	68
1-5	الاستنتاجات	68
2-5	التوصيات	69
6	المصادر	70
1-6	المصادر العربية	70
2-6	المصادر الاجنبية	73
7	الملاحق	85
	Abstract	A

قائمة الجداول

التسلسل	عنوان الجدول	الصفحة
1	مكونات وسط MS	27
2	مكونات وسط MS الخاص بمرحلة النشوء	28
3	تأثير NaOCL والمدد والتداخل بينهما في النسبة المئوية لتلوث بذور الحلبة بعد 14 يوم من الزراعة على وسط MS	34
4	تأثير الـ BA و نوع الجزء النباتي في مرحلة النشوء بعد 30يوم من الزراعة على وسط MS	35
5	تأثير تراكيز BA و NAA و التداخل بينهما في معدل عدد الافرع الخضرية بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS	36
6	تاثير الـ BA والـ NAA والتداخل بينهما في معدل طول الافرع الخضرية (سم) بعد اربعة اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	38
7	تأثير الـ BA و الـ NAA و التداخل بينهما في معدل عددالاوراق بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS	39
8	تأثير الـ BA و الـ NAA و التداخل بينهما في معدل الوزن الطري بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS-	42
9	تأثير الـ BA و الـ NAA و التداخل بينهما في معدل الوزن الجاف بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS-	43
10	تأثير التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) والتداخل بينهما في معدل عدد الافرع بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS-	44
11	تأثير التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) والتداخل بينهما في معدل طول الافرع بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS-	45
12	تأثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) والتداخل بينهما في معدل عدد الاوراق بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS-	46
13	تأثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS-	47
14	تأثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) والتداخل بينهما في معدل الوزن الجاف بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS-	48
15	تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في معدل تركيز الكلوروفيل (ملغم -غم$^{-1}$) في للمجموع الخضري بعد شهر من الزراعة على وسط MS-	49

16	تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في معدل تركيز الكاربوهيدرات (ملغم -غم$^{-1}$) للمجموع الخضري بعد شهر من الزراعة على وسط MS-	50
17	تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في معدل تركيز قلويد الـ Trigonelline (مايكروغرام -غم$^{-1}$) للمجموع الخضري بعد شهر من الزراعة على وسط MS-	53
18	تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في معدل تركيز مركب الـ Diosgenine (مايكروغرام -غم$^{-1}$) للمجموع الخضري بعد شهر من الزراعة على وسط MS-	54
19	تاثير تراكيز الـ 2,4-D والـ BA في النسبة المئوية لاستجابة القمم النامية لاستحثاث الكالس بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	55
20	تاثير تراكيز الـ 2,4-D والـ BA في النسبة المئوية لاستجابة الورقة لاستحثاث الكالس بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	56
21	تاثير تراكيز 2,4- D و BA في معدل الوزن الطري للكالس (ملغم) المستحث من القمة النامية بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	58
22	تاثير تراكيز 2,4- D و BA في معدل الوزن الجاف للكالس (ملغم) المستحث من القمة النامية بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	59
23	تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل الوزن الطري للكالس (ملغم) بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	62
24	تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل الوزن الجاف للكالس (ملغم) بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	63
25	تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل تركيز قلويد الـ Trigonelline (مايكروغرام-غم$^{-1}$) في كالس نبات الحلبة بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	65
26	تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل تركيز مركب الـ Diosgenine (مايكروغرام-غم$^{-1}$) بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	66

قائمة الاشكال

التسلسل	عنوان الشكل	الصفحة
1	بذور ونبات الحلبة	4
2	الصيغة الكيميائية و التركيبية لـ Trigonelline	9
3	الصيغة الكيميائية و التركيبية لـ Diosgenine	10
4	طرائق إنتاج مركبات الايض الثانوية	13
5	الصيغة التركيبية للحامض الأميني L-Tryptophan	24
6	المنحنى القياسي للكاربوهيدرات	30
7	التداخل بين BA و NAA في معدل عدد الافرع الخضرية	37
8	التداخل بين BA و NAA في معدل طول الافرع الخضرية	38
9	التداخل بين BA و NAA في معدل عدد الاوراق	40
10	تاثير تداخل التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في صفات المجموع الخضري لنبات الحلبة	52
11	تاثير التراكيز المختلفة من الاوكسين 2,4-D والسايتوكانين BA في النسبة المئوية للكالس المستحث من القمه النامية والاوراق	57
12	تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في كالس نبات الحلبة -	64

قائمة الملاحق

التسلسل	عنوان الملحق	الصفحة
1	**المحاليل القياسية للكلايكوسيد الصابوني Diosgenine وقلويد Trigonelline**	85
2	**تاثير التربتوفان بتركيز5 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-**	86
3	**تاثير التربتوفان بتركيز15 ملغم.لتر$^{-1}$ و اشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-**	87
4	**تاثير التربتوفان بتركيز10 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-**	88
5	**تاثير التربتوفان بتركيز20 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-**	89
6	**تاثير التربتوفان بتركيز10 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-**	90
7	**تاثير التربتوفان بتركيز20 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-**	91
8	**تاثير التربتوفان بتركيز15 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-**	92

9	تاثير التربتوفان بتركيز5 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	93
10	تاثير التربتوفان بتركيز20 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	94
11	تاثير التربتوفان بتركيز15 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	95
12	تاثير التربتوفان بتركيز10 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	96
13	تاثير التربتوفان بتركيز5 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	97
14	تاثير التربتوفان بتركيز10 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	98
15	تاثير التربتوفان بتركيز20 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	99
16	تاثير التربتوفان بتركيز15 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	100
17	تاثير التربتوفان بتركيز5 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS-	101

قائمة المختصرات

NaOCl	**Sodium Hypochlorite**
2,4-D	**Dichlorophenoxyacetic acid**
BA	**Benzyl adenine**
NAA	**Naphthalene Acetic Acid**
MS	**Murashige and Skoog medium (1962)**
pH	**power Hydrogen**
L-S-D	**Least Significant Difference**
UV	**Ultra Violet ray**
HPLC	**High performance liquid chromatography**
ATP	**Adenine triphosphate**
µg	**Microgram**
µl	**Microliters**
2ip	**Isopentenyl Adenine**
kin	**Kinetin**

المستخلص

نفذت الدراسة في مختبرات زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق/ كلية الزراعة- جامعة كربلاء للمدة من ايار 2021 ولغاية حزيران 2022، بهدف دراسة تاثير المحفزات الفيزيائية والكيميائية في انتاج مركبي Trigonelline وDiosgenine من نبات الحلبة .*Trigonella foenum- graecum* L خارج الجسم الحي، ويمكن تلخيص نتائج الدراسة بالاتي:-

1- ان افضل معاملة في تعقيم بذور نبات الحلبة كانت باستخدام التركيز 2% من هايبوكلورات الصوديوم NaOCl لمدة 15 دقيقة.
2- اعطت العقد كجزء نباتي استخدم في مرحلة النشوء اعلى استجابة بلغت 80% عند التركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$ BA في حين لم تعط القمم النامية اي استجابة تذكر.
3- ان الوسط الغذائي المجهز بالـ BA وبالتركيز 2ملغم/لتر كان الافضل في زيادة عدد الافرع وطولها وعدد الاوراق والوزن الطري والجاف للمجموع الخضري اذ بلغت (8.65 فرع. جزء نباتي$^{-1}$، 4.00 سم، 26.33 ورقة.نبات$^{-1}$ 4.03، ملغم، 1.22 ملغم) على التوالي.
4- حقق التركيز 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ NAA اعلى معدل لعدد الافرع والاوراق والوزن الطري والجاف للمجموع الخضري بلغ (7.49 فرع.نبات، 21.50 ورقة.نبات$^{-1}$ ، 3.64 و0.95 ملغم) على التوالي في حين حقق التركيز 0.4 ملغم.لتر$^{-1}$ اعلى معدل لطول الافرع بلغ 3.92 سم.
5- أدت معاملة النموات الخضرية بالحامض الاميني التربتوفان الى تفوق التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ منه في تحقيق اعلى معدل للصفات المدوسه والتي شملت عدد وطول الافرع الخضرية وعدد الاوراق والوزن الطري والجاف للمجموع الخضري وكذلك معدل تركيز الكلوروفيل والكاربوهيدرات اذ بلغت (34.05 فرع.نبات، 5.05سم، 63.33 ورقة.نبات$^{-1}$ ، 3.21 و 1.54 ملغم ، 3.72 و4.25 ملغم.غم$^{-1}$) على التوالي. في حين حققت معاملة التشعيع بالاشعة فوق البنفسجية UV عند الدقيقة 20 اعلى معدل للصفات ذاتها بلغت (32.64 فرع.نبات، 5.01سم ، 50.26 ورقة.نبات$^{-1}$ ، 2.64 و 1.16 ملغم ، 3.16 و 3.90 ملغم.غم$^{-1}$) على التوالي.
6- لدى معاملة النموات الخضرية بتراكيز مختلفة من التربتوفان حقق التركيز 15 ملغم.لتر$^{-1}$ اعلى معدل لتركيز مركبي الـ Trigonelline و Diosgenine بلغ (277.23 و 212.73) مايكروغرام.غم$^{-1}$ على التوالي. بينما اعطت معاملة التشعيع عند الدقيقة 20 اعلى معدل للمركبات ذاتها بلغت (286.45 و 210.60) مايكرو غرام.غم$^{-1}$ على التوالي.

7- تفوقت القمة النامية معنوياً على الآوراق في تحقيق نسبة استجابة بلغت 100% عند جميع توليفات الـ 2,4-D مع BA في حين حققت الورقة نسبة استجابة بلغت 30% عند التركيز املغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D وبالتداخل مع جميع تراكيز BA.

8- حقق التركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس المستحث من القمة النامية بلغ (172.75 و 15.31) ملغم على التوالي، في حين حقق التركيز 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ BA اعلى معدل وزن للصفات ذاتها بلغ (141.60 و 12.22) ملغم على التوالي.

9- لدى معاملة الكالس المستحث من القمة النامية بتراكيز مختلفة من التربتوفان حقق التركيز 15ملغم.لتر$^{-1}$ اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ (299.49 و27.23) ملغم على التوالي، كما حققت معاملة التشعيع عند الدقيقة 20 اعلى معدل للصفات ذاتها بلغت (265.14 و 24.08) ملغم على التوالي.

10- اعطى التركيز 20 ملغم.لتر تربتوفان اعلى معدل لتركيز مركب Trigonelline بلغ 239.89 مايكروغرام. غم$^{-1}$ في حين كان اعلى معدل تركيز لمركب Diosgenine في الوسط المجهز بالتركيز 15 ملغم.لتر تربتوفان بلغ 190.34 مايكروغرام. غم$^{-1}$.

11- وعن تاثير اشعة الـ UV على معدل تركيز المركبات الايضية في كالس نبات الحلبة فقد تفوقت الدقيقة 20 في اعطاء اعلى معدل تركيز لمركبي Trigonelline و Diosgenine بلغ (248.06 و192.21) مايكروغرام. غم$^{-1}$ على التوالي.

1- المقدمة

كانت النباتات الطبية والعطرية ومازالت الاساس الذي تطورت منه صناعة الادوية والعقاقير، اذ ظهرت حضارات عريقة بنيت أساساً على الطب النباتي، لكن بسبب التطور والتقدم العلمي في القرن المنصرم في شتى الميادين بدأ الاستغناء تدريجياً عن النباتات الطبية في العلاج واستبدالها بالأدوية والعقاقير الكميائية، وكان من المتوقع أن يتراجع المرض وتزداد السيطرة عليه، لكن الذي حدث هو العكس تماماً. فقد عرف الانسان أمراضاً لم تكن معروفة من قبل ولاسيما الامراض المزمنة، وفي كل يوم نجد ان مراكز البحث العلمي في الدول المتقدمة ومنظمة الصحة العالمية تكشف لنا عن التاثيرات الجانبية الخطيرة للادوية الكميائية حتى أصبحت هناك قائمة سوداء للادوية السامة التي يحظر استعمالها من قبل بني البشر ولهذه الاسباب اتجهت الدول المتقدمة الى النباتات الطبية والعطرية في التداوي والعلاج (عبد الله، 2011).

يعد نبات الحلبة واحدة من النباتات الطبية المعروفة والمسجلة تاريخيا والتي تعود الى العائلة البقولية Fabaceae واسمه العلمي .*Trigonellafoenum-graecum* L لها اسماء اجنبية عديدة منها :-

K ˈu-Tou (Chinese), fenegriek (Dutch), fenugrec (French), methi (Indian), fenogreco (Italian), koroba (Japanese), Sambelid (Iran).

(Peteropoulos،2002).

استعملت نباتات الحلبة أو بذورها بصور مختلفة في مجالات الطب الشعبي (البديل) من قدماء المصريين وأطباء الاغريق، ومن بعدهم الاطباء المسلمين، اذ وردت في كتب ابن سينا وابن البيطار والانطاكي وحالياً تستعمل اوراق وبذور الحلبة بشكل مسحوق او مستخلصات في المجالات الطبية ويعزى الاستعمال الواسع لها لاحتوائها على بعض النواتج الطبيعية المهمة طبياً وخاصة الدايوسجنين Diosgenine الذي يؤدي دوراً مهما في السيطرة على ايض الكولسترول فضلا عن عده المصدر التقليدي للبناء الكيميائي للادوية الستيرويدية والترايكونيلين Trigonelline الذي يعد مضاداً للسرطان . (Sunita وأخرون ،2011)

لاهمية النبات من الناحية الطبية واحتوائه على مركبات آيض ثانوية مهمة تدخل في الصناعات الصيدلانية ولكن انتاجها قليل مقارنة بالحاجة الفعلية لهذه المركبات وبالنظر لاهمية رفع انتاج مركبات الايض الثانوية في المزارع النسيجية لنبات الحلبة، لذلك استوجب توظيف تقنية زراعة الانسجة لإنتاج مركبات الأيض الثانوي من كالس النباتات الطبية واضافة بعض المحفزات التي قد تزيد من انتاج المركبات الفعالة واكثار النبات نسيجياً كي يمكن استثمار المزارع النسيجية على مدار السنة في انتاج المركبات المهمة صيدلانياً لما تتميز به هذه التقانة من مزايا متعددة منها تتيح السيطرة بالظروف البيئية وإمكانية السيطرة على عملية الإنتاج بمراحلها المختلفة ولا تتطلب مساحة شاسعة

لغرض الإنتاج وقلة التكاليف ووفرة الإنتاج لتلك المركبات في أغلب الأحيان أضافة الى خلوها من الملوثات (ابراهيم، 2017). كما يمكن الاستفادة من تقنية زراعة الانسجة في انتاج المركبات الطبية طيلة ايام السنة دون التقيد بموسم النمو (Park واخرون، 2008).

إن علم تغذية النبات هو من العلوم المهمة التي تعمل على زيادة المادة الفعالة في النباتات الطبية سيما الاحماض الامينية التي تعد كمبادئ لبعض المركبات الطبية فضلا عن دورها المهم في تحفيز العمليات الفسلجية والكيمو حيوية في النباتات اذ تشترك في بناء البروتينات والكاربوهيدرات عن طريق بناء الكلوروفيل وتحفيز عمليات التمثيل الكاربوني وزيادة مقاومة النبات للاجهادات الحرارية والمائية وتشترك في بناء عمل العديد من الانزيمات والمرافقات الانزيمة (Shafeek واخرون، 2012). كما يؤدي استخدام الاحماض الامينية الى انخفاض الجهد الازموزي الذي بدوره يقلل من الجهد المائي للخلية، ومن ثم تزداد قابلية الخلية على سحب الماء والعناصر المغذية من وسط النمو ومن ثم زيادة النمو الخضري، كما تؤدي الى زيادة مدة وعدد الانقسامات الخلوية وتوسيعها (ابو ضاحي واليونس، 1998).

هناك نوعان من التطبيقات المستخدمة في المجالات الزراعية هي التطبيقات الكيميائية والفيزيائية حيث الكيميائية أصبح معلوماً مدى آثارها السلبية على المحاصيل الزراعية وعلى البيئة، لذا توجه العلماء إلى جعل القرن الحالي قرن الفيزياء الحياتية Biophysical، إذ تعتمد معظم العوامل الفيزيائية على زيادة توازن الطاقة Energy balance عن طريق نقل الطاقة وزيادة الجهد الكهربائي للأغشية الخلوية ومن ثم زيادة تبادل المواد عبرها وتنشيط عمليات النمو والتطور. ومن أهم الظواهر الفيزيائية المستخدمة في هذا المجال الأشعة فوق البنفسجية والكهرباء والضوء والمغناطيسية والصوت، وتتميز هذه الظواهر برخصها وتأثيرها الآمن على الصحة والبيئة، وتعتبر الأشعة فوق البنفسجية Ultra-violet (UV) هي أحد الإشعاعات الكهرومغناطيسية غير المؤينة يتراوح طولها الموجي بين 200-400 نانوميتر تمتلك فوتوناتها طاقة عالية تكفي لحدوث انتقال للالكترونات بين المدارات ذات الجزيئات المكونة للمادة التي تعرضت للإشعاع (Hader وآخرون،2007)، وأن تعريض النبات لجرع منخفضة (تحفيزية) من الاشعة (UV) عمل على تنظيم العمليات المورفولوجية والفسلجية، فالجرع الواطئة تحفز نمو جينات الحماية من الأشعة فوق البنفسجية مثل الجينات المسؤولة عن تكوين الفلافينويدات وغيرها من المركبات الفينولية التي تتراكم في طبقة البشرة وتوفر الحماية للنبات، اما المستويات العالية من الأشعة فتؤدي إلى ذبول النبات لقلة انتفاخ الخلايا وتقليل المحتوى المائي نتيجة لتقليل عدد وحجم أوعية الخشب ومن ثم تقليل الماء الممتص (Zlatev وآخرون،2012).

هدفت الدراسة التي تناولت نبات الحلبة أحد النباتات الطبية المهمة الى تحقيق :-

1- دراسة تاثير منظمات النمو في نشوء مزارع الافرع الخضرية لنبات الحلبة.
2- دراسة تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية في صفات النمو الخضري لمزارع الافرع الخضرية لنبات الحلبة وفي تحفيز انتاج بعض مركبات الايض الثانوي (Diosgenine وTrigonelline).
3- دراسة تاثير منظمات النمو في نشوء مزارع الكالس لنبات الحلبة.
4- دراسة تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية في صفات مزارع الكالس لنبات الحلبة وفي تحفيز انتاج بعض مركبات الايض الثانوي (Diosgenine وTrigonelline).
5- التقدير الكمي والنوعي لمركبي الـ Diosgenine وTrigonelline باستعمال تقانة الـ HPLC في مزارع الافرع الخضرية والكالس لنبات الحلبة.

2- مراجعة المصادر

2-1- الوصف العام لنبات الحلبة

الحلبة Foenum .L *Trigonella foenum-graecum* من النباتات العشبية حولية شتوية قائمة تشبه نبات البرسيم جذوره وتدية وتوجد عليه عقد بكتيرية وساقه جوفاء يتراوح طولها من 20-60 سم أو اكثر حسب البيئة المزروعة تختلف نقطة تفرع الساق باختلاف الانواع وله أوراق ريشية مركبة ثلاثية الوريقات بيضوية الشكل مسننة تسنناً بسيطاً باذينات مستطيلة نوعاً ما، الازهار صغيرة صفراء اللون في بداية النمو بيضاء عند النضج يتراوح طولها مابين 1.6 – 2.2 سم، اذ تبدو الازهار جالسة في محاور الورقة. عدد الاوراق الكأسية 5 جرسية الشكل ذات لون ابيض شاحب يتراوح طولها ما بين 6-8 ملم، الاوراق التويجية 5 اوراق بيضاء فراشية الشكل، يبلغ طولها ضعف طول الاوراق الكاسية أو اكثر بقليل (1.5-1.8سم). الاسدية عشرة ثنائية الحزم Diadelphous ، المدقة كربلة واحدة بسيطة مرتفعة المبيض والمشيمة جدارية. أما الثمار عبارة عن قرون طويلة رمادية مصفرة اللون تتراوح أطوالها بين 6-10سم ويحتوي كل قرن على 10-20 بذرة والبذور صلبة مستطيلة او بيضوية الشكل لونها بني مصفر طولها 3.5-6.0 ملم وعرضها 2.5-4.0 ملم تحتوي على أخدود عميق يقع بين الجذير Redicle والفلقات Cotyledons تقسم البذرة على نصفين غير متساويين. وتميز برائحة خاصة وطعم يميل الى المرارة ناشيء عن احتوائها على مركب الفيورانون Furanone ومواد متطايرة اخرى(عبد الحسين وأخرون، 2013).

شكل (1) بذور ونبات الحلبة

2-2- التصنيف العلمي لنبات الحلبة :-

Kingdom: Plantae

Sub kingdom: Trachobionta

Super division: Spermatophyta

Division: Magnoliphyta

Class: Magnolopsida

Sub class: Rosidae

Order: Fabales

Family: Fabaceae

Sub family: Papilionoideae

Genus: *Trigonella* L.

Species: foenum – graecum

(Nathiya وأخرون، 2014)

2-3- الاهمية الطبية لنبات الحلبة :-

يعد نبات الحلبة واحداً من أكثر أنواع النباتات فائدة للانسان، لما فيه من فوائد وقيم غذائية مرتفعة جدا، ولقد استخدمت الحلبة دواء منذ آلاف السنين حيث استعملت بذورها في :-

1- علاج قرحة المعدة والتهابات الامعاء والغشاء المخاطي للمعدة والتهابات المثانة لاحتوائها على نسبة عالية من المواد الهلامية وعلاج التهابات المفاصل والروماتيزم والامراض الصدرية، كما تستعمل مادة Diosgenine في تحضير هرمون الكورتيزون ومشتقاته المستعملة في علاج الامراض الصدرية والروماتزمية (Kaviarasan وأخرون،2006).

2- كموانع فموية للحمل عند السيدات لوجود مادة Diosgenine التي تعد المادة البادئة في تحضير الهرمونات الجنسية المستعملة في صناعة موانع الحمل التي تستعملها السيدات وتقوية وتنشيط الناحية الجنسية لوجود مواد منشطة للرغبة الجنسية مثل Trimethyl amine (خضر،2007).

3- علاج وتثبيط نمو الاورام الخبيثة او الوقاية من الاصابة بها خاصة سرطان غدة المثانة البروستاتا وسرطان الثدي وسرطان المعدة وهذا راجع الى دور بعض المركبات مثل مادة Trigonelline الموجودة في البذور

كمركب مضاد للسرطانات، كما استعملت البذور في الطب الصيني القديم كتحاميل في علاج سرطان عنق الرحم(Zhou وأخرون 2013).

4- قد اشارت مصادر عديدة الى استعمالها كمادة مانعة لتخثر الدم وعلاج تجلط الدم والامراض القلبية لاحتواء بذورها على مادة الكيومارين التي تمنع تخثر الدم استعملت في تخفيض نسبة الكولسترول والدهون خاصة الكلسيريدات الثلاثية في الدم، كما تستخدم في علاج انخفاض ضغط الدم (Ghule وأخرون 2012).

5- معالجة داء السكري وجد في تجربة على الفئران ان اضافة مستخلص بذور الحلبة الى ماء شربها ادى الى خفض ضغط دمها بصورة معنوية وتخفيض نسبة السكر عند المصابين بداء السكر النوعين 1 و2 حيث تؤدي مجموعة من المركبات الموجودة في البذور أما بشكل منفرد او مجتمعة في تأثيرها العلاجي لهذا المرض إذ وجد Srinivasan،(2005) في تجاربه السريرية على مرض داء السكري ان مستخلص بذور الحلبة له تأثير فعال في معالجة داء السكري (Hamza وأخرون ،2012).

6- استخدمت بذور الحلبة كمضادات للبكتريا و كمنبة للهضم وفاتح للشهية و علاج حالات سوء الهضم و حالات الامساك و الانتفاخ و القالون العصبي ، و في تخفيف الام البواسير كونها تحتوي مادة ملينة وهذا التاثير يعزى لوجود الالياف و المواد الهلامية في البذور بكميات كبيرة (Srinivasan،2005).

7- إن المستخلص المائي او الكحولي للبذور المطحونة او مطحون البذور في كبسولات تستعمل عن طريق الفم في الاسابيع (4-6) الاخيرة من الحمل يساعد في تسهيل عملية الولادة حيث يزيد من تقلص العضلات الرحمية أثناء الولادة ،اما في مدة الرضاعة تعطي البذور لزيادة ادرار اللبن في ثدي الامهات المرضعات، ويرجع ذلك الى دور المركبات الصابونية الاستريودية التي لها تأثير مشابة لحامض اللاكتيك المسؤول عن انتاج اللبن (ويتم أستخلاص زيت الحلبة حيث يزيد من ادرار اللبن وفي تنظيم اضطرابات الدورة الشهرية الغير مستقرة ولايقاف حالات النزيف (خضر ،2007).

8- ولها تأثير مدر للبول لاحتوائة على مواد مدره و لها دور فعال في الطب الصيني لمعالجة قرحة الاثنى عشر (Raju وBird، 2006).

9- ولها استعمالات في صناعة المراهم الصيدلانية ومستحضرات التجميل المستعملة في تطرية الجلد والوقاية من الاشعاع الحراري ومضادة للالتهابات الجلدية والمراهم المستعملة في علاج التقرحات الجلدية والاكزيما والجروح والكدمات (Sunita وأخرون ،2011).

10- كما تستعمل بذور الحلبة كأعلاف للماشية بوصفها مادة منشطة ومحفزة على أدرار الحليب كما انها تعد ذات قيمة غذائية عالية لاحتوائها على عناصر غذائية عالية كما تضاف الى عليقة الطيور لتزويد وزنها وتحسن من صفات لحومها (علي ،2018).

2-4- المحتوى الكميائي لنبات الحلبة :-

2-4-1- البروتينات:

عبارة عن مجموعة من الاحماض الامينية التي تكون نسبتها متباينة بين البذور والمجموع الخضري اذ اشارت المصادر ان التحلل الكيميائي للبروتين الموجود في بذور الحلبة هو بحدود 24,7% اما الاجزاء الخضرية فتحتوي على 4.58 – 6.0% وتحتوي الحلبة على نسبة عالية من البروتينات المخزونه أهمها Globulin ، Glutelin وAlbumin فضلاً عن وجود أحماض أمينية حرة مثل Lysine، Argenin، Tryptophan، Methionin، Histidin، Cystine و Tyrosinأضافة الى Aspartic acid فضلاً عن الحامض الأميني 4- Hydroxyisoleucine الذي تبين أن له تأثيراً خافضاً لمستوى السكر في الدم، ويوجد حصرياً في بذور الحلبة (Chhibba وآخرون،2007).

2-4-2- الكاربوهيدرات :

توجد نسبة عالية من الكاربوهيدرات في البذور تصل الى 60% من الوزن الجاف للبذور،أما السكريات الأحادية الموجودة هي Glucose،Arabinose، Galactose و Manose فضلاً عن وجود سكريات معقدة غير متجانسة مثل Galactomannan والذي يوجد في سويداء البذور Endosperm بنسبه تبلغ 51% (العطار، 2012).

2-4-3- الزيوت الثابتة و الطيارة :-

الزيـوت الثابتة الموجودة في بذور الحلبة تتميز برائحتها غير المقبولة ويقدر نسبتها بأكثر من 5% وتتكون من مجموعة من الأحماض الدهنية منها Palmitic acid ,Stearic acid ,Oleic acid ,Linoleic acid اما بالنسبة للزيوت الطيارة فنسبتهـا قليلـة وتتكـون مـن Sesquiterpenes(العطار، 2012).

2-4-4- الفيتامينات Vitamins :-

تعد بذور الحلبة مصدراً غنياً لكثير من الفيتامينات مثل فيتامين A بهيئة بيتا كاروتين β-Carotene و Thiamine فيتامين B1 ، Riboflavin فيتامين B2، Niacin فيتامين B3، Pantothenic acid فيتامين B5، Folic acid فيتامين B9، كما تحتوي على Biotin فيتامين H، وغيرها وان البذور المستنبتة غنية بحامض الاسكوربيكفيتامين C. (الجابر،2008).

2-4-5- العناصر الغذائية Nuterant Minerals :-

تحتوي بذور الحلبة على عناصر غذائية تتفاوت في نسبها أهمها الصوديوم Na والكالسيوم Ca والحديد Fe والفسفور P والمغنيسيوم Mg والبوتاسيوم K وكميات اقل من المنغنيز Mn والخارصين Zn والنحاس Cu وغيرها (الجابر،2008).

2-5- المركبات الفعالة في نبات الحلبة

2-5-1- القلويدات :

هي مركبات عضوية قاعدية التي تحتوي وحدتها التركيبية تحتوي المركبات القاعدية القلويدية على ذرة نتروجين أو أكثر تصل إلى حد 5 ذرات والتي تكون عادةً مرتبطة في الحلقات غير المتجانسة في مركب القلويد، تكون على شكل أمين أولي R-NH2 أو أمين ثانوي R2-NH أوأمين ثلاثيN -R3 (2005,Sarin) .

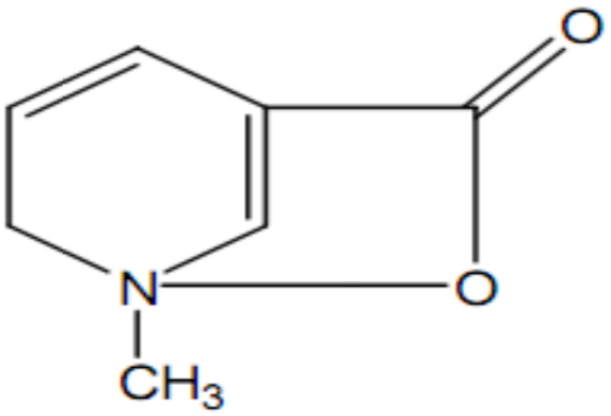
توجد القلويدات في النبات اما بصورة أملاح لأحماض عضوية أهمها حامض الخليك وحامض السترك أو على شكل كلايكوسيدات لسكريات مثل الكلوكوز والكالكتوز او كاسترات للاحماض العضوية مثل الاتروبين Atropin. وقد توجد بشكل حر كالنيكوتين ومشتقاته من المركبات الرئيسة لمجموعة البيريدين Pyridine القلويدية (Ramawat2008,). تعد القلويدات من أهم المركبات المستعملة في تحضير الأدوية لما لأغلبها أن لم يكن لجميعها تأثير فسلجي في الكائن الحي، وتوجد في النباتات بكميات قليلة، وهي من الناحية الكيميائية مركبات عضوية قاعدية بلورية عديمة اللون والرائحة حساسة لدرجات الحرارة العالية التي تتحلل بها ومن النادر أن يحتوي النبات على مركب قلويدي واحد، بل يحتوي بشكل عام على مجموعة من المواد الفعالة المترابطة كيمياويا(Facchini وآخرون، 2004).

تتراكم القلويدات في الانسجة التي يكون معظمها في مواقع النهايات الطرفية في النبات، وان الانتاج الكمي لها في العموم يكون واطئا جداً، وعلى الرغم من ذلك فان لبعضها قيمة باهضا الثمن ولاسيما عندما يقاس على مستوى النبات الكامل، لكن لوحظ أنه يمكن أن يكون بتراكيز أعلى عند عضو او نسيج معين (Ramawat ، 2004).

تعطي القلويدات فوائد مهمة للنباتات التي توجد فيها، كمواد دفاعية لحماية النبات من الكائنات الأخرى لأن معظمها ذات مذاق مر لاذع فضلاً عن أهميتها في التوازن الآيوني في النبات وكذلك كونها موادا خازنة للنتروجين أو عناصر أخرى لتزود النبات عندالحاجة. ويتم البناء الحيوي للقلويدات في منطقة القمة النامية للجذر بعدها تنتقل المركبات القلويدية إلى الجزء الخضري بوساطة النسغ الصاعد بصورة استرات،كما تحدث عمليات أيضية أخرى لأنتاج القلويدات في الأجزاء الهوائية من النبات (حمود، 2017). توجد القلويدات عادةً في فجوة الخلية على شكل أملاح لأحماض عضوية قابلة للذوبان في الماء مثل Tannic، Succinic، Oxalic، Malic،Citricكذلك Acetic،Tartaric، كما تتحد بعض القلويدات مع السكريات مكونة ما يسمى gluco-alkadoid، تخزن في الأنسجة الأقدم عمراً بحالة صلبة ونادراً ما تكون بحالة بلورية (المهداوي،2013).

Trigonelline -2-5-2

أبرز القلويدات الموجودة في نبات الحلبة هو قلويد الترايكولين Trigonelline(N-methyinicotinicacid) وله صيغة التركيبية كما في الشكل (2)



$C_7H_7NO_2$

الشكل (2) الصيغة الكيميائية و التركيبية لـ Trigonelline (المهداوي، 2013).

ينشأ قلويد Trigonelline من أيض النياسين Niacin ويتشكل من حامض النيكوتين والميثيونين Methionine بوجود ثلاثي فوسفيت الادنين Adenine triphosphate (ATP) وكلوريد المنغيسيوم $MgCl_2$، درجة انصهاره 130مْ ويمتاز بسهولة ذوبانه في الماء والكحول الاثيلي الساخن و يذوب نسبياً في الكلورفورم والايثر وقليل الذوبان في الكحول الاثيلي البارد وينصهر مع هيدروكلوريد الترايكونيلين Trigonelline hydrochloridعند درجة 260مْ وقابلية ذوبانه عالية في الماء وقليلة جداً في الكحول (Al-Hakemi, 2002) . اشارت العديد من الدراسات ومنها الدراسة التي قامت بها (حسين، 2021) الى تفوق مزارع الكالس في محتواها من قلويد الـ Trigonelline مقارنة بمحتوى البذور والجذور والسيقان من هذا القلويد. كما تحتوي البذور على كميات أقل من قلويدات Carpaine وGentianin وBetaine (Makai وأخرون ،2004).

2-5-3-الكلايكوسيدات :-

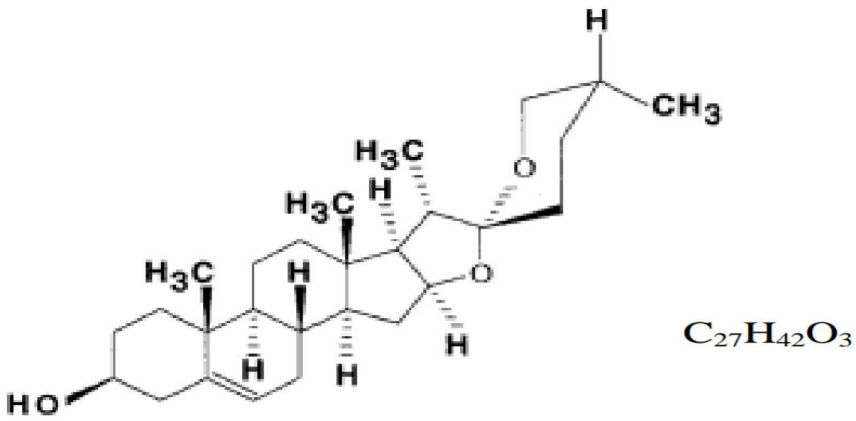
الكلايكوسيدات Glycosides تشكل جزء مهم من المواد لفعالة طبياً في العديد من النبات الحلبة فهي مركبات العضوية تتحلل بفعل الانزيمات أو الحوامض مما ينتج عنها مركبان هما مركب سكري يدعى باسم glycone ومركب غير سكري يدعى باسم aglycone (النعيمي، 2010). الجزء السكري يتكون عادة من مجموعة واحدة أو أكثر من الكلوكوز في حين الجزء غير السكري يمكن أن يكون واحدامن مركبات الايض الثانوي ويكون ذا تركيب مختلف من نبات إلى آخر (Gurib-fakim، 2006). ويعتمد ذوبان الكلايكوسيدات على الجزء غير السكري وعلى عدد ونوع الجزيئات السكرية المرتبطة بالجزء غير السكري ويميل الجزء غير السكري للذوبان

بالمذيبات العضوية أما الجزء السكري فأنه يذوب بالمذيبات المائية، وتأتي أهمية الكلايكوسيدات طبياً لإحتواءها على كلايكوسيدات انثراكينونية anthraquinone glycosides. وعند تناولها ستتحلل في الامعاء الغليظة (القولون) محررة aglycones (الجزء غير السكري) الذي يحفز زيادة حركة الأمعاء وزيادة كمية الماء في القولون. حيث يعمل الجزء السكري كحامل للجزء غير السكري اي ينقله الى المكان المراد علاجه، أما التأثير العلاجي الفعال فيعزى للجزء غير السكري، لكن يجب عدم وجود مواد أخرى تحد من فعالية الكلايكوسيدات مثل التانين ذا المفعول القابض وبذلك تعمل على الحد من التأثير المسهل للكلايكوسيدات الانثراكينونية. وتضم الكلايكوسيدات الصابونية الاسترويدية التابعة الى مجموعة التربينات الثلاثية Triterpene.اذ قد تصل نسبته الى 90% من كمية الصابونيات الاستيرويدية (شاكر، 2016).

Diosgenine-4-5-2

يعد Diosgenine احد أهم المركبات هذه المجموعة طبياً و أكثرها تواجدا في نباتات الحلبة يليه Yamogenin و Tigogenin وNeotigogenin وغيرها من المركبات التي تعد اغلبها مشتقات للـ Diosgenine .

يكون Diosgenine بشكل مسحوق بلوري درجة انصهاره 195مْ،عديم الذوبان في الكحول وله صيغة التركيبية كما في الشكل (3).



الشكل (3) الصيغة الكيميائية و التركيبية لـ Diosgenine (المهداوي، 2013).

استخدم الـ Diosgenine في تحضير هرمون الكورتزون المستخدم في علاج الامراض الصدرية والروماتزم كا استخدمت مستخلصاتها كمضاد للسرطان و زيادة افراز الغدة الدرقية (Devasena و Menon،2003).

يتواجد ستيرويد Diosgenine في نباتات اخرى اذ تعد درنات الانواع البرية لنبات *Dioscorea sp.* المصدر الطبيعي و التجاري له، وبسبب حاجة النبات لسنوات عدة لانتاج الدرنات بالحجم المناسب لاستخلاص

Diosgenine منها تجاريا وكلفتها عالية، ادى ذلك الى ايجاد مصادر نباتية اخرى فانتخبت الحلبة مصدراً بديلاً يمتاز بسهولة زراعتها ودورة نموها السريع وانتاجها بذورا خلال 3-4 اشهر، فضلا عن كونها من النباتات البقولية المثبتة للنيتروجين الجوي (Christen,2002).

تتراكم المركبات السيترويديه وخاصة Diosgenine في الازهار والقرنات الفتية ولكن تنخفض مستوياتها في البذور الناضجة، اذ سجل محتواه في البذور بمقدار 5.6ملغم.غم$^{-1}$ وزن جاف، ولكن سجلت للبادرات الفتية بعمر 30 يوم 20.0 ملغم .غم$^{-1}$ وزن جاف والتي انخفضت الى 9.6ملغم.غم$^{-1}$ وزن جاف بعمر 45 يوماً، في حين بلغت مستويات هذا المركب أقصاها في السيقان و الجذور 6.7 و2.3ملغم.غم$^{-1}$ وزن جاف على التوالي في البادرات بعمر 45 يوماً، أما محتوى القرنات فيبلغ 4.3 ملغم .غم$^{-1}$ وزن جاف (حسين،2021). كما ذكر المهداوي، (2013) أن محتوى بادرات الحلبة من Diosgenine وبقية الكلايكوسيدات يكون باعلى محتواى في مراحل النمو الفتية للنبات.

2-6- إنتاج مركبات الأيض الثانوية خارج الجسم الحي:

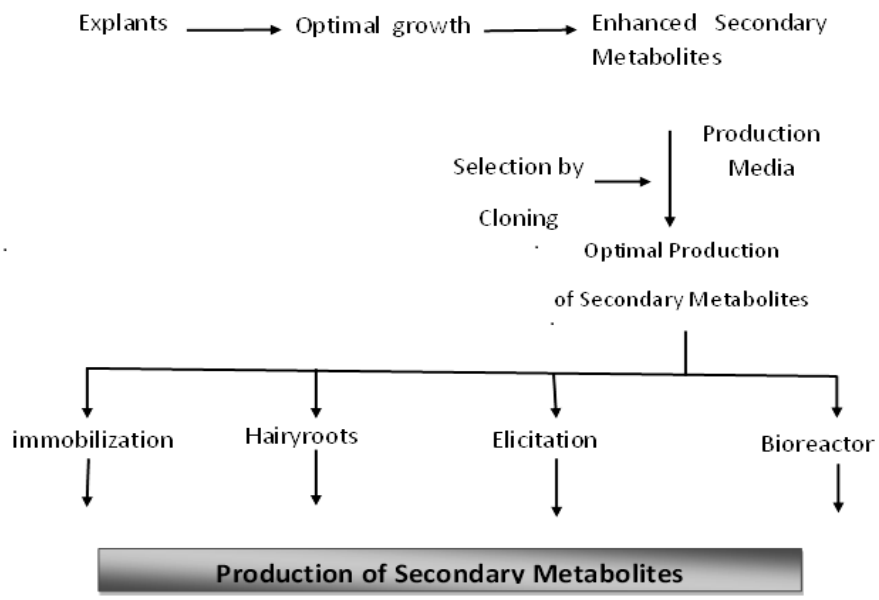
تنتج خلايا النباتات نوعين من نواتج الأيض هما نواتج الأيض الأولية والتي تدخل مباشرة في نمو وأيض النبات مثل الكاربوهيدرات واللبيدات والبروتينات، ونواتج الأيض الثانوية والتي تعد نواتج نهائية لعمليات الأيض الأولية، وهي لا تشترك في النشاطات الأيضية للنبات مثل المركبات القلويدية والفينولات والزيوت الطيارة والستيرويدات واللكنين والتانينات وغيرها ويشير مصطلح مركبات الأيض الثانوي إلى مركب تنتجه النباتات أو الكائنات الحية الدقيقة أو الحيوانات غير اللازم لنموها (Pickensوآخرون،2011).

حيث يطلق على أغلب تلك المركبات بمواد الأيض الثانوي (Secondary metabolites) والتي لا تدخل في البناء الحيوي مباشرة ولكنها ذات وظائف فسيولوجية أهمها زيادة تحمل الاجهادات البيئية. تنمو النباتات في بيئات يحيطها العديد من الكائنات الحية كالحيوانات والحشرات والبكتريا والفطريات والفايروسات وغيرها، وتسبب هذه الكائنات أضراراً كبيرة للنبات لا يمكن تجنبها وهنا يبرز دور مركبات الأيض الثانوي فقد تكون وسيلة دفاعية للنباتات بوصفها وسيلة وقائية ضد المسببات المرضية (Taiz وZeiger،2010).

بين ابراهيم، (2017) أن النباتات تنتج مركبات كيميائية مختلفة وتحت مسميات متنوعة تحت مظلة كيميائيات النبات (phytochemicals).تسعى المؤسسات العلمية ومختبرات صناعة الأدوية في العالم إلى استعمال التقنيات الحديثة ومنها زراعة الأنسجة النباتية في مجال تصنيع هذه المركبات وتحويلها إلى أدوية علاجية، وقد اثبتت زراعة الأنسجة انها وسيلة فعالة ومفيدة في إنتاج الكثير من المواد الطبيعية والعقاقير الطبية مثل المركبات القلويدية Alkaloids والفينولية Phenols والكلايكوسيدية Glycosides والصابونينيات Saponins من النباتات المختلفة كما أن قسماً من هذه المركبات لا يمكن تحضيرها مختبرياً لذلك لابد من استخراجها من مصادرها النباتية

(Mulabagal وTsay، 2004). تشمل مركبات ذات قيمة صيدلانية منها منكهات وعطور ومواد تجميل ومضافات غذائية وأعلاف ومواد مضادة للميكروبات، ولفائدة هذه المركبات وتداخلها في صناعات مهمه خاصة الدوائية لذلك تم التزايد بالاهتمام بتقانة زراعة الأنسجة النباتية Plant tissue culture واعتمادها بديلاًعن الزراعة التقليدية في إكثار النباتات التي يصعب اكثارها وفي إنتاج المركبات الطبية بعيداً عن تحكم ظروف البيئة في وجود النبات في موسم معين دون غيره الذي يؤدي ذلك الى صعوبة الحصول على المركبات المهمة طبياً بكميات مناسبة ذات فائدة ونوعية ثابتة (شكري والمعيقل، 2013). وهنا تأتي أهمية الزراعة النسيجية لإنتاج العقاقير والمواد الصيدلانية فهي تساعد في الإنتاج السريع لهذه المواد والمركبات على مدار السنة من دون التقيد بموسم الزراعة فضلاً عن تقليل المساحات اللازمة للزراعة بالإضافة إلى النقاوة العالية للمواد المتكونة إذا ما قورنت بتلك المصنعة مختبريا (Georgiev وآخرون، 2009). لقد برزت في العقود الاخيرة زراعة خلايا وأنسجة وأعضاء النبات كبديل عن زراعة النباتات بأكملها لإنتاج مركبات الأيض الثانوية (Paek وآخرون، 2014). إنَّ خلايا وأنسجة النبات المزروعة لديها القدرة على إنتاج عدد لا يحصى من مركبات الأيض الثانوية المفيدة (Vijayasree، 2010).

تتميز هذه التقانة بالبساطة في إنتاج وسرعة عزل المركبات الثانوية من اجزاء النبات بدلاً من عزلها من كامل النبات كما في الزراعة الحقلية، ووجد الباحثون في هذه التقانة ان أجزاء النبات المختلفة تعد مصدر اً جيد اً للمركبات الثانوية اذ يلجأ الى زراعة نسيج نباتي من اجل تضاعف للافرع التي يتم الحصول منها على مركبات تشكل اهمية دوائية (Mazidوآخرون،2011). لذا فان تضاعف الجزء النباتي يتحقق من خلال نوع النسيج النباتي فضلاً عن عوامل الوسط وتعد عملية تنمية الاجزاء الخضرية كالأفرع احدى تقانات زراعة الانسجة النباتية وأحد الاهداف الرئيسة في إنتاج المركبات الثانوية (Ramawat، 2004). حيث ان تركيب الوسط الغذائي والظروف البيئية في تقانة زراعة الانسجة النباتية يؤديان دورا مهما في تراكم المركبات الأيضية وتؤدي السايتوكاينينات التي تضاف الى الوسط الغذائي الى تشجيع تضاعف الافرع والتمايز المورفولوجي اللذان يرتبطان بانتاج بعض المركبات الثانوية التي تشكل أهمية دوائية كبيرة (Shardaوآخرون،2007). تعمل بعض المحفزات في الوسط الغذائي على قدح وتنشيط تراكم المركبات الثانوية إذ تعطي اشارة للبدء بعملية التراكم وكجزء من استجابة دفاعية خارجية، إن المعاملة بالمحفزات في تقانة زراعة الأنسجة النباتية سواء كانت احيائية ام غير احيائية هي طريقة نافعة للحث على انتاج المركبات الثانوية (Zhao وآخرون، 2013)



شكل(4) طرائق إنتاج مركبات الايض الثانوية (Ramawat، 2004)

2-7- الأيض الثانوي في النباتات

تعدُّ النباتات المصدر التقليدي لكثير من المركبات الكيميائية النباتية،حيث تنتج خلية النبات نوعين من نواتج الأيض وهي نواتج الأيض الأولية التي تشترك مباشرة في نمو وأيض النبات كالكاربوهيدرات واللبيدات والبروتينات، وهي مركبات كيميائية تنتج بكميات كبيرة في خلايا النبات، وتنتج هذه المركبات من عملية التمثيل الضوئي والتنفس وتشترك في بناء مكونات الخلية المختلفة، وتنتج النباتات مركبات عضوية معقدة ليس لها وظيفة مباشرة في النمو تسمى بمركبات الايض الثانوي أو المركبات الكيميائية النباتية Phytochemical Compound (ابراهيم، 2017). وتنتج هذه المركبات من مركبات الايض الاولي (الكاربوهيدرات، البروتينات، الدهون). ذات الاهمية الفسلجية الكبيرة في عمليات نمو وتطور النبات (Ramawat،2004). وتعد نواتج الأيض الثانوي هي نواتج وسطية للأيض الأولي ولا تشترك بنشاط الأيض الأولي مثل القلويدات، فينولات، زيوت طيارة، ستيرويدات، لكنين، تانينات وغيرها، قد تكون مركبات الأيض الثانوي محددة بمجموعة خاصة كأن تكون جنساً، أو نوعاً أو عائلة، تتجمع هذه المركبات على الأغلب في خلايا نباتية خاصة وبكميات قليلة وفي مراحل تطور محددة جاعلة عملية استخلاصها صعبة مقارنة بمركبات الأيض الأولي والتي تنتج بالنبات كاملاً أو في عضو معين. (HopkinsوHuner،2009). يقدر الباحثون وجود أنواع كثيرة من مركبات الايض الثانوي ذات الأهمية العلاجية اذ انها تدخل في الصناعة الدوائية والعقاقير الطبية وأن أكثر من ربع الأدوية المنتجة في العالم خلال الثلاثين سنة الماضية هي مشتقة من مركبات نباتية ثانوية(العبيدي، 2014).

أن نمو النباتات في بيئات تحيطها العديد من الكائنات الحية كالحيوانات والحشرات والفطريات والبكتريا والفايروسات ...الخ وتسبب هذه الكائنات أضراراً كبيرة للنبات لا يمكن تجنبها وهنا يتجلى دور مركبات الايض الثانوي فقد تكون وسيلة دفاعية للنباتات كونها وسيلة وقائية ضد المسببات المرضية مع العلم ان معرفة ماهية وميكانيكية هذا الدور وعلاقته بتفاعل النبات وتكيفه مع البيئة المحيطة محدودة فضلا عن ان هذه المركبات تعد مواداً جاذبة للملقحات أو وسيلة وقائية من الأشعة فوق البنفسجية ويزداد إنتاج هذه المركبات عند تعرض النباتات للأعداء الطبيعيين لآفات هذه النباتات أو بسبب أحد أنواع الشد الحيوي كالبرودة، الحرارة، الضغط الأزموزي والأضرار الميكانيكية(Taiz و Zeiger،2010).

2-8- تقانة زراعة الأنسجة النباتية :

زراعة الأنسجة النباتية أو الزراعة خارج الجسم الحي هي تقانة لنمو الخلايا أو الأنسجة أو الأعضاء النباتية في أوساط غذائية تحتوي على العناصر المغذية والفيتامينات ومنظمات نمو النبات في ظل ظروف معقمة (Singh وKummar، 2009). ان هذه التقنية تعتمد بشكل أساسي على الطاقة الكامنة Totipotencyللخلية النباتية والتي تشير الى قدرة الخلية النباتية الذاتية المفردة على الانقسام والنمو والتكشف مؤدية الى توليد نبات كامل مطابق للنبات الأم حيث يتم عزل خلية أو نسيج أو عضو نباتي تحت ظروف خالية من المسببات المرضية وتعقيمه وزراعته في أوساط غذائية أصطناعية معقمة وتحضين الجزء المزروع في ظروف مسيطر عليها من درجة حرارة وضوء ورطوبة وصولا" الى مرحلة تكوين النبات الكامل(Hussain وأخرون 2012). يرجع نمو وتطور خلايا وأنسجة وأعضاء النبات الى محتوى الاوساط الغذائية لهذا فان اختيار الوسط المناسب هو المفتاح لنجاح تقانة زراعة انسجة النبات. يتضمن الوسط العناصر التي يحتاجها النبات الكامل في نموه والتي يصنع منها احتياجاته، حيث نلاحظ الاجزاء النباتية النامية خارج الجسم الحي تكون معتمدة في غذائها على مكونات الوسط Heterotrophic ولا تستطيع تصنيع غذائها كما يفعل النبات في الطبيعة (ابراهيم،2017).

حيث تزرع النباتات الطبية في الحقل للحصول على المركبات الفعالة وهذا يتطلب مساحة من الارض وعمليات خدمة ووقتا طويلاً نسبيا حتى اكتمال نضج النبات علاوة على مخاطر الزراعة الحقلية المتمثلة في الظروف البيئية والمناخية غير المضمونة التي تؤثر سلبا في نمو هذه النباتات وحاصلها ومن ثم كمية المواد الفعالة المنتجة ونوعها وهذا دفع بعض الباحثين الى انتاج بعض المركبات الفعالة طبياً ذات استعمالات المتعددة عن طريق زراعة الانسجة، ومن هنا تبرز اهمية زراعة الانسجة التي تعد احدى التقانات الحيوية التي ادت ومازالت تؤدي دورا مهما في خدمة الانسان ولاسيما في مجال اكثار انواع عدة من النباتات تعد تقانة زراعة الأنسجة والخلايا النباتية كمدخل في التحسين النوعي والكمي للمحاصيل الزراعية المتمثلة في التحوير الوراثي بين النباتات (Smith،2000). لما تمتاز به هذه الطريقة من ميزات لعل من اهمها امكانية أنشاء نباتات خاليه من الامراض الفايروسية والمشابهة للنبات الام في وقت قصير نسبيا وفي اي وقت من السنة، فضلاعن استعمال هذه التقانة في مجالات بحثية وتطبيقية

منها تربية وتحسين النبات وانتاج العقاقير الطبية والادوية، ودراسة الجوانب الاساسية لنمو وتطور النبات والايض الثانوي (Gupta وIbarakl،2006). كما اظهرت تقانة زراعة الانسجة في حالات كثيرة انتاجا عالياً من المواد الايضية الثانوية مقارنة بالنبات الاصلي وهذا الانتاج يمكن ان ينظم بواسطة استخدام منظمات النمو النباتية (Umamaheswariو Lalitha,2007)، وازداد اهتمام العلماء بانتاج مواد نباتية طبيعية عالية القيمة بتقانة الزراعة النسيجية التي يمكن ان تتغلب على كثير من المشكلات بانتاج النباتات حقلياً اذ برز دور المزارع النسيجية التي يمكن وصفها بانها مصانع تحويل حيوي bioconversion من مركبات ذات قيمة واطئة الى نواتج ذات قيمة عالية (Yong واخرون،2008).

بدأت دراسات مبكرة حول إدخال تقانة زراعة الانسجة الانتاج من خلال مسارات عدة لانتاجها (Sangwan وآخرون، 2007). اشار Sharada وآخرون 2007 الى أن الزراعة خارج الجسم الحي التي تعتمد الاجزاء الخضرية للأفرع تعد أكثر إنتاجا لمركبات الايض الثانوي، كما أن إنتاج المركبات الثانوية من أجزاء نباتية مختلفة لنبات الحلبة عادة ما تكون متفاوتة كميا (Chaudhary وآخرون، 2018). فقد أمكن إستعمال التقانة خارج الجسم الحي في إنبات بذور النبات وزراعة أطراف الأفرع والحصول على اكبر عدد من الافرع بزيادة تضاعف الجزء النباتي باستخدام اجزاء نباتية مختلفة مثل الاوراق الفلقية والعقد والقمم النامية، وامكن الحصول على تضاعف للافرع من اجزاء نباتية مختلفة (Kumar وآخرون،2011و2013) والبراعم الابطية axillary (Valizadeh bud، 2011) والسلاميات internode (Valizadeh,2009) وفي قمم الافرع apex shoot (Sivanesan، 2007) وكذا الحال في العقد (Siddique وآخرون، 2004) والسويقة تحت الفلقة hypocotyl والأوراق الفلقية cotyledonary leaf(Rani وآخرون، 2003) والقمم النامية shoot tip (Rani وGrover، 1999).

2-9- تعقيم الاجزاء النباتية :-

ان عملية التعقيم هي الخطوة الاساسية في نجاح برنامج زراعة الانسجة النباتية والتي من دونها لايمكن اكمال المرحلة اللاحقة. ومشكلة تلوث الاجزاء النباتية من اهم المشاكل التي تواجه زراعة الانسجة النباتية لذلك يعد تعقيم الجزء النباتي Explant من الخطوات التي تعتمد عليها نجاح زراعة الانسجة والتي بنجاحها يتم انشاء مزارع الانسجة النباتية. إن عملية التعقيم تعني القضاء على جميع الأحياء المجهرية التي يمكن أن ترتبط بنمو الجزء المزروع على وسط غذائي وتؤدي إلى هلاكه، اما بسبب نموها السريع ومنافسة الجزء المزروع على المواد الغذائية أو نتيجة لقيامها بإفراز بعض المواد السامة التي يؤدي امتصاصها إلى قتل ذلك الجزء ومن ثم فشل عملية الزراعة النسيجية.

كما تعرف عملية التعقيم بأنها ازالة الكائنات الدقيقة كافة التي تنمو على السطح الخارجي للجزء المستعمل كمنطلق لزراعة الانسجة كالبكتريا والفطريات وغيرها لذا يطلق عليها التعقيم السطحي Surface sterilization، (Ramawat، 2004). وتختلف مدة التعقيم و نوع المادة المستعملة بأختلاف الجزء النباتي المراد زراعته وبشكل عام فان اهم المعقمات المستخدمة هي كحول الاثيلي وهايبوكلورات الصوديوم وكلوريد الزئبق وبيروكسيد الهيدروجين و مضادات حيوية، ويستخدم مادة ناشرة مع هذه المواد مثل الـــTween 20 أو Tween 80 التي تساعد على نشر المادة المعقمة بشكل تام على سطح الجزء النباتي لاسيما عندما يكون السطح الخارجي للجزء النباتي مغطى بمادة شمعية كالكيوتكل او السوبرين (الموسوي،2017)، ومن خلال مراجعة المصادر وجد ان مادة هايبوكلورات الصوديوم من أكثر المواد المستخدمة في تعقيم الاجزاء النباتية المهيأة للزراعة خارج الجسم الحي وتختلف نوع المعاملة وتركيزها ومدة التعقيم تبعاً لنوع الجزء النباتي، درجة تلوثه وظروف نموه . ونجح Perez-Alonso واخرون (2009)، في تعقيم بذور نبات الحلبة بغمرها بمحلول NaOCl 5% لمدة 10 دقائق ثم الغسل بالماء المقطر المعقم مرات عدة.

وتمكن العطار (2012) من استعمال NaOCl بتركيز 3% لمدة 5 أو 10 دقيقة ثم غسلها بالماء المقطر المعقم لثلاث مرات، قد اعطى اقل نسبة تلوث واعلى نسبة انبات عند تعقيم بذور نبات الحلبة.

اما حسين (2021) فقد استخدم NaOCl بتركيز2% لمدة 15 دقيقة مع التحريك المستمر ثم غسلها بالماء المقطر المعقم لثلاث مرات، قد اعطى اقل نسبة تلوث واعلى نسبة انبات عند تعقيم بذور نبات الحلبة.

2-10- أستحثاث الكالس

ان الكالس عبارة عن نسيج غير متمايز يتألف من خلايا برنكيمية غير متمايزة تنشأ من مناطق القطع أو الجرح للأجزاء النباتية المزروعة في الوسط الغذائي، ويتكون الكالس طبيعياً في النبات كاستجابة الى الجروح، أو في منطقة التطعيم . ووصفه بأنه كتلة من الخلايا التي تنمو على وسط صلب، وهذا يوظف في دراسة العديد من الفعاليات الفسيولوجية، في مجال النبات وراثياً، فضلاً عن دراسة تكوين الأعضاء والأجنة الجسمية(Trigiano وGray،2005). من العمليات المهمة التي يمر الكالس بها هي ثلاث مراحل هي التحفيز والانقسام والتمايز. ففي مرحلة التحفيز تحدث تغيرات مهمة في الخلايا مثل بناء البروتينات والـ DNA لتكون مهيئة لعملية الانقسام. وتشهد المرحلة الثانية انقسام الخلايا بصورة متتالية وتكوين كتلة من خلايا الكالس تغطي الجزء النباتي. تليها مرحلة التمايز من خلال توسع خلايا مرستيمية معينة وتمايزها مكونة أجنة لا جنسية بشرط توفر عوامل النمو المناسبة(Taiz وZeiger،2006). فيما قسّم(Sateesh, 2003) مراحل نشوء الكالس إلى:

1- طور الفتورLagphase وهنا تتحضر الخلايا للانقسام.

2- طور التسارع Exponential phase في هذه المرحلة يزداد مستوى انقسام الخلايا.

3- الطور الخطيLinear phase في هذه المرحلة مستوى انقسام الخلايا يبطىء لكن يزداد توسع الخلايا.

4- طور التحللDeceleration phase يقل مستوى انقسام الخلايا واستطالة الخلايا.

5-الطور المستقرStationary phase هنا عدد وحجم الخلايا على الأغلب يبقى ثابت.

يتم الحصول على مظاهر مختلفة للكالس اعتمادا على مكونات الوسط الغذائي ونوع الجزء النباتي المستخدم حيث تنمو الخلايا والأنسجة المزروعة بالاعتماد على ما يوفره الوسط الغذائي من العناصر الغذائية والفيتامينات والحوامض الأمينية ومنظمات النمو النباتية، إذ ليس بمقدورها تصنيع غذائها بنفسها (Aurelia وآخرون، 2007). ومن أفضل الأوساط الغذائية المستخدمة في استحثاث الكالس هو الوسط الغذائي MS الذي استخدم من قبل Murashige وSkoog (1962).ومن اكثر العوامل الفيزيائية التي تؤثر في الكالس هو الظلام حيث أشار العديد من الباحثين إلى أهمية التحضين بالظلام وهذا يعود إلى دور الظلام في منع أكسدة بعض المركبات الحساسة للضوء مثل الهرمونات كالأوكسينات. إذ يعمل الضوء على تنشيط أنزيم الـ IAA oxidase. لذا فأن إعادة الزراعة للكالس في أوساط جديدة واستمرار تحضينها في الظلام يزيد من كمية الكالس المستحث من الأجزاء النباتية. اضافة ان الظلام يؤدي إلى تثبيط المواد الفينولية بواسطة أنزيمات الأكسدة التي يحفزها الضوء. كما يعتقد بأن تحضين الأجزاء النباتية في الظلام يؤدي إلى زيادة رقة الجدران الخلوية وقلة سمكها، مما يؤدي إلى زيادة نفاذية المواد ولاسيما منظمات النمو إلى داخل الأنسجة المزروعة ومن ثم استجابة هذه الأجزاء لاستحثاث الكالس (ابراهيم، 2017). أضافة لدور لمنظمات النمو الكبير في تحفيز نشوء ونمو نسيج الكالس، إذ وجد أن التوازن بين الأوكسينات والسايتوكاينينات في الوسط الغذائي له الدور الأكبر في تحفيز تكوين الكالس، لأن الزيادة الحاصلة في تركيز السايتوكانينات نسبة إلى الأوكسين تحفز تكوين الأفرع الخضرية في حين أن النسب العالية من الأوكسين إلى السايتوكاينين تشجع تكوين الجذور العرضية والمستويات المتوازنة تؤدي إلى استمرار الكالس بالنمو(ابراهيم، 2017).

يحتاج الكالس عادةً إلى مدة زمنية مناسبة بعد استحثاثه لينمو ويصل إلى الحجم المناسب لإعادة زراعته على وسط غذائي جديد بعد تقطيعه إلى قطع ذات وزن مناسب لغرض الحصول على كمية من الكالس وتتراوح هذه المدة من أربعة إلى ستة أسابيع أو أكثر معتمدة على نوع النبات والجزء النباتي المستخدم والوسط الغذائي، كما إن إعادة زراعة الكالس Subculture على أوساط غذائية جديدة وفي أوقات زمنية منتظمة تعدُّ أساسية في نمو وتطور الكالس. إذ أن استمرار نموه في الوسط الغذائي نفسه يؤدي إلى استنزاف المواد الغذائية من الوسط وجفافه. فضلاً عن تجمع وتراكم النواتج النهائية للفعاليات الأيضية حتى تصل إلى مستويات سامة تؤثر بصورة مباشرة في نمو وتطور الكالس(الشكري والمعيقل، 2013). لقد أوصى كثير من الباحثين بضرورة إعادة زراعة الكالس بعد حوالي 4-5 أسابيع من استحثاثه وتعاد الزراعة بعد المدة نفسها إلى أن يتم الحصول على الكمية المطلوبة من الكالس وهذا ما وجده كل من Wakhluو Bhau (2000) على نبات *Coryphantha elephantidens* و Huan وآخرون (2004) على نبات *Cymbidium orchid*.

2-11- منظمات النمو النباتية Plant growth regulators

أول الهرمونات المكتشفة هي الاوكسينات، واطلق مصطلح Auxin من قبل الجمعية الامريكية للفسيولوجيين النباتيين على المركبات التي تتصف بمقدرتها على تحفيز الاستطالة في خلايا الساق، والاوكسينات عبارة عن مجموعة من الأحماض العضوية ذات الأوزان الجزيئية العالية، تحدث تأثيراً كبيراً في العمليات الفسلجية في النبات عند استخدامها بتراكيز قليلة جداً وذلك من طريق تشجيع او تثبيط او تحوير احدى العمليات الفسلجية في النبات، وتُعد المرستيمات القمية والبراعم الجانبية والأوراق الفتية أهم مراكز بناء الاوكسينات (الخفاجي،2014).
توجد انواع عديده للاوكسينات منها الطبيعية مثل Indole acetic acid (IAA) والصناعية مثل (NAA) Naphthalene acetic acid وIndole Butric acid (IBA) و Dichlorophenoxy acetic (2,4-D) acid الذي يعد أفضل و أكثر الاوكسينات فعالية في أستحثاث الكالس (Smith، 2000)، وعملها هو تحفيز الأنزيمات المسؤولة عن بناء الجدار الخلوي وتحلله ومن ثم التأثير في الخصائص الميكانيكية له (Taiz وZeiger،2010) وتحفيز ليونة الجدار الخلوي من طريق كسر روابط الجدار الخلوي واعادتها تحت تأثير الضغط الانتفاخي مما يسهم في زيادة حجم الخلية واتساعها واستطالة الخلايا وتطور الأعضاء أو تكوينها ولها دور في تكوين الجذور (الشكري والمعيقل، 2013).
السايتوكانينات عبارة عن مشتقات قواعد نتروجينية للأدنين ذات أوزان جزيئية عالية لها تأثيرات فسيولوجية عديدة في النبات عند تراكيز قليلة (Dellolio، 2007)، إذ انها تشجع انقسام الخلايا النباتية وتمايزها ونمو البراعم الابطية وتعمل على تحويل الخلايا البرنكيمية إلى خلايا مرستيمية (Ramawat، 2004)، وقد أشارت الدراسات العلمية إلى أن السايتوكاينينات تنتج في النبات طبيعياً مثل Zeatin والتي تتألف من D-ribos Phosphoric acid substitused Adenine- N^6 وتكون أما حرة أو مرتبطة معt-RNA للسايتوبلازم والكلوروبلاست او تصنع مختبرياً مثل Benzel adinin وThidiazuron (TDZ) (George واخرون، 2008).ان اماكن انتاجها يعتقد في قمة الجذر وتنتج ايضا في الاوراق الفتية وللسايتوكاينين تأثير في النبات يتم بطرائق عدة فهي تؤثر في الأنسجة الحديثة عن طريق تنظيم نمو الخلية وانقسامها وتؤثر في نسيج الكالس والأنسجة المجروحة عن طريق تنظيم تكوين العناصر الوعائية (الخفاجي، 2014).

للسايتوكانينات دور اساسي في الانقسام الخلوي والذي يتم بخطوات، إذ يتم تكوين الـDNA وRNA والبروتينات والأنزيمات وحصول الانقسام غير المباشر ثم انقسام الخلية. إن السايتوكانين يعمل على تحفيز وإنتاج الأحماض النووية نتيجة تنشيط وتحفيز إنتاج البروتينات والحامض النووي الـRNA نتيجة تحفيز نشاط وفعالية الجينات المسؤولة عن تكوين الأنزيمات، وأظهرت الدراسات أن السايتوكانين يحفز حركة وانتقال العناصر الغذائية داخل الأنسجة والخلايا النباتية.

وأوضح George وآخرون(2008) إن السايتوكانينات الاكثر استعمالاً في الزراعة النسيجية هو الكاينتين Kin، والزياتين،BA و 2ip، ويعد الكاينتين kin أول سايتوكانين تم اكتشافه، وبصورة أدق فإن الأكثر استعمالاً حالياً هو الـBA بسبب فعاليته العالية وثباتيته ورخص ثمنه نسبياً.

تزداد فعالية السايتوكانينات إذا احتوت السلسلة الجانبية لها على أواصر مزدوجة أكثر، لذلك فإن فعالية الـBA تكون عالية مقارنة بالكاينتين Kin و2ip بسبب احتواء السلسلة الجانبية على ثلاث أواصر مزدوجة بخلاف Kin و2ip اللذين يحتويان على آصرتين أوآصرة مزدوجة واحدة لكل منهما على التوالي، وكذلك احتوائها على حلقةBenzyl (Hopkins وHuner، 2009).

2-12- تأثير الأوكسينات والسايتوكاينينات في تضاعف الزروعات

تتحكم الأوكسينات في العمليات الأساسية مثل إنقسام واستطالة الخلية. ونظراً لتحفيزها على الإنقسام الخلوي بوجود السايتوكاينينات فإنها تشارك في تكوين المرستيمات التي تؤدي إلى تكوين نسيج غير منتظم أو أعضاء محددة،وتتشارك في تنظيم العديد من العمليات الفسيولوجية مثل السيادة القمية وتكوين الجذور الجانبية والعرضية وكذلك تثبيط تكوين البراعم العرضية والإبطية (George وآخرون، 2008).

اما السايتوكانين يشترك مع الأوكسين بظاهرة يطلق عليها ظاهرة النمو المتلازم أو المترابط مثل السيادة القمية، فعملية انتقال السايتوكانين يكون نحو قمة الفرع وهو يعاكس أو يضاد حركة الأوكسين القطبية نحو الأسفل وبصورة عامة فان الأوكسين والسايتوكانين يتحكمان في مختلف الاستجابات التطورية التي تتضمن تنظيم انقسام الخلايا ونشوء الأفرع والجذور، وإن التوازن بين نسبة الأوكسين إلى السايتوكانين في البيئة الغذائية يحفز تكوين نسيج الكالس على الأجزاء النباتية المزروعة (Aniszewski،2015).

2-13- الاشعة فوق البنفسجية Ultra Violet :-

الاشعة فوق البنفسجية هي موجة كهرومغناطيسية ذات طول موجي أقصر من الضوء المرئي لكنها أطول من الاشعة السينية سميت بقوق البنفسجية لان طول موجة اللون البنفسجي هي الاقصر بين ألوان الطيف الشمسي و طول موجتها يبدأ من 10 نانومتر الى 400 نانومتر، كما هي أشعة مؤينة (أي تفصل الالكترونات عن ذراتها) فقد تسبب تفاعلا كيميائياً، وتجعل العديد من المواد متوهجة. وقد أدرك الكثير من الناس تأثير الاشعة فوق البنفسجية في الجسم مسببة حالات من ضربة الشمس، ولكن طيف تلك الاشعة له تاثيرات أخرى قد تكون مفيدة أو مضرة للنباتات. وقد تمكن العلماء من تحديد كيفية تخريب الاشعة فوق البنفسجية للنباتات. اذ انها تدمر المادة الوراثية في الخلية النباتية، فيفقد النبات مخزونه من الشفرات السرية التي تنظم عملياته الحيوية، وفضلاً عن ذلك، فان تلك الاشعة تحطم مادة اليخضور والتي بدونها لا يستطيع النبات استقبال طاقة الشمس الضرورية لاتمام عملية البناء الضوئي ومن ثم يؤثر في نمو الخلايا النباتية ومن ثم يكون النقص في الانتاج وللتقليل من التأثير المدمر للاشعة فوق البنفسجية، فان بعض هذه النباتات يعمل على انتاج كميات كبيرة من من المواد الصبغية عديمة اللون لها القدرة

الكبيرة على امتصاص الاشعة فوق البنفسجية وحماية النبات منها. هناك مجموعة أخرى من النباتات لها أوراق مغطاة بمادة شمعية تنعكس على أسطحها أشعة الشمس فلا تتاثر بها كثيراً، ومجموعة ثالثة من النباتات يغطي نفسه بزوائد تشبه الزغب أو الوبرتعمل على أمتصاص جزء كبير من الاشعة وتجنب النبات تأثيرها الضار، أما المجموعة الرابعة فقد وفرت لنفسها سلاحا كميائياً ضد الاشعة فوق البنفسجية اذ أنها تفرز مركبات كمياوية تعمل من خلال تفاعلات معقدة على أصلاح ماأفسدته الاشعة واعادة صلاحية جزيئات مادة حامض النووي وللاشعة فوق البنفسجية تأثيرات نافعة يمكن ان يستغلها النبات منها تقليل المساحة الورقية وزيادة سمك الورقة وهنا بالرغم من قلة مساحة الورقة الا أن الانتاج يزداد نتيجة لزيادة سمك الورقة ومن ثم زيادة المواد الغذائية. والمعاملة بالاشعة فوق البنفسجية يقلل من مساحة الخلايا ويزيد عددها ومن ثم يزيد من سمكها وتحدث العملية السابقة نتيجة لتأثير الاشعة فوق البنفسجية في نشاط البيروكسيديز وهي احدى العضيات الموجودة في الخلية المرتبطة بجدار الخلية، ان زيادة نشاطها يؤثر في توسع الخلية ليؤثر ذلك بالتبعية في الخواص الميكانيكية للجدار الخلوي، ومن ثم يؤدي التعرض الزائد للاشعة فوق البنفسجية الى نقص المساحة الخلوية، لتقليل استطالة الساق. وذلك لتأثير تلك الاشعة في الهرمونات الداخلية في النبات بالتالي يمكن اعتبار الاشعة فوق البنفسجية أداة لتقسية النبات لعملها على زيادة السمك وتقلل الطول، وزيادة التفريع وزيادة التصبغات، ان تأثير الاشعة فوق البنفسجية على التصبغات سريع جداً يتراوح من ساعات الى أيام و عن طريق التحكم فيها، نستطع التحكم في الالوان (مهم جداً في مجال نباتات الزينة). زيادة انتاج مركبات الايض الثانوي في الخلايا عن طريق تحفيز الخلايا على الانتاج، وتقليل الاصابة بألامراض النباتية، خاصة الاصابة الحشرية فبعض الحشرات مثل الذبابة البيضاء لا تستطيع الرؤية بدون الاشعة فوق البنفسجية و باتحكم في تلك الاخيرة يمكننا كبح مثل تلك الحشرة و غيرها مع زيادة القدرة على الحفظ وزيادة الكتلة الحيوية ومحصول الزيت مع جعل الطعم أقوى وأفضل. ويأمل بعض العلماء أن ينجحوا في استخدام تقانات الزراعة النسيجية على النباتات لتكتسب القدرة على حماية نفسها من خطر الاشعة فوق البنفسجية وبالوقت نفسه الاستفادة منها لتحفيز النباتات وزيادة الانتاج (الموسوي، 2017).

2-13-1- التأثيرات الفسلجية للأشعة فوق البنفسجية

طبقة الغلاف الجوي Stratospheric (O_3) تخفِفمن وصول الأشعة فوق البنفسجية بطول أقل من 310 نانوميتر من الوصول إلى الأرض، وأن نقصان سمك هذه الطبقة سوف يسمح بنفاذ كمية أكبر للأشعة خاصة الحزمة UV-B للوصول إلى سطح الأرض. وعلى الرغم من أن نسبة أشعة UV-B تبلغ 0.5% من مجموع الإشعاع الشمسي، إلا أن الزيادة البسيطة في كمية ونوعية هذه النسبة تتسبب في انخفاض واضح في النمو والعمليات الفسلجية للعديد من النباتات الحساسة، ويلاحظ في معظم الأنواع النباتية أن 70% من هذه الأشعة التي تصل إلى سطح الورقة تخفف قبل أن تصل إلى طبقة النسيج المتوسط Mezophyll، وتظهر النباتات الصحراوية Xerophytes درجة عالية من قدرتها على تخفيف أشعة UV-B بواسطة طبقة البشرة، وتعتمد قدرة البشرة في ترشيح هذه الأشعة

على محتواها من الفلافونيدات التي يعمل تراكمها كمضاد جيد لهذه الأشعة (Piri وآخرون، 2011). تتكون الفلافونيدات في فجوات خلايا البشرة ويتحفز تكوينها بشكل كبير بكل من الضوء المرئي والأحمر والأزرق (Saewan وJimtaisong، 2013)، وتمتلك النباتات آليات مختلفة لحماية الخلايا من التأثير الضار المتسبب عن الأكسدة الضوئية Photo-oxidation كتكوين الجزيئات الكابتة Quencher molecules والجذورالحرة Free radicals مثل $^{-}(O_2)$ و H_2O_2 و HO^{-} التي تزال بواسطة طرق انزيمية كإنزيمات Superoxide- dismutase و Peroxidase و Catalase و Glutathione reductase أو بطرق غير انزيمية كتكوين Ascorbic acidو Glutathione وكذلك تكوين الفينولات التي تعطي حماية من ضرر UV-B. ويزداد نشاط انزيم البيروكسيديز عند التعرض للأشعة فوق البنفسجية الذي هو نوع من الإجهاد لتمنح الخلايا مقاومة ضد تكوين مركب بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2،وتقوم الفلافونيدات بحماية DNA عضيات الخلية ضد التأثيرات الضارة لأشعة UV-B بتكوين Thymine dimers، وتقوم الأنثوسيانينات كالفلافونيدات بالحماية لغرض تخفيف مضار أشعة UV-B لحماية مكونات الخلية، كما وتعمل الجذور الحرة كـ Signal cascades على تغيير التعبير الجيني في النبات (Holley وآخرون، 2003). ووجد أن تعريض النبات لجرع منخفضة غير ضارة تحفز وتنظم العديد من التغيرات المورفولوجية والفسلجية والأحيائية فيه (Frohnmeyer و Staiger، 2003)، فالجرع الواطئة من هذه الأشعة تحفز تعبير العديد من الجينات بضمنها جينات الحماية من الأشعة فوق البنفسجية مثل الجينات المسؤولة عن تكوين الفلافونيدات وغيرها من المركبات الفينولية التي تتراكم في طبقة البشرة وتحمي النبات من الأشعة فوق البنفسجية(Aitken وآخرون،2007).

ومن أهم التأثيرات الفسلجية لتعرض النبات إلى الأشعة فوق البنفسجية هو انخفاض لبيـــدات أغشية الكلوروبلاست مثل Galactolipids عند تعرض العديد من النباتات لهذه الأشعة، وتهدم منظم النمو IAA داخل النبات، وتحفيز إنزيمات الأكسدة المساهمة في استجابات النمو،إضافة إلى تحفيز تلف الغشاء الخلوي الذي يحدث بسبب تكوين الجذور الحرة الداخلية التي تتسبب في أكسدة الدهون. في حين تتسبب المستويات العالية من أشعة UV-B في ذبول النبات بسبب قلة انتفاخ الخلايا Turgidity وقلة المحتوى المائي وتقليل عدد وحجم أوعية الخشب وبالنتيجة تقليل كمية الماء الممتص. ويتقزم النبات وينخفض الضوء الفعال في التمثيل الكاربوني Photosynthetically active radiation(PAR) بسبب قصر المسافة بين العقد وتقليل عدد العقد وربما يعود السبب إلى تراكم الفلافينات Flavins التي تقوم كمستقبلات ضوئية Photoreceptors لأشعة UV-B المسؤولة عن تثبيط نمو السلاميات (Ballare وآخرون، 1995). وهناك احتمال حدوث تغيرات أو تلف في أجزاء من DNAالخلايا خاصة تلك التي تمتلك آليات ضعيفة لإصلاح نفسها، أو حدوث تغيرات في استنساخ DNA الخلايا عند التعرض لهذه الأشعة، وقد تحدث هذه التغيرات في وقت سريع ، وأن بعض مستويات هذا التغير يحدث خلال تعرض النبات للأشعة فوق البنفسجية لمدة ساعة واحدة، وتعد الـ DNA من أكثر أجزاء الخلية تضرراً بهذه الأشعة

بسبب وقوع طيف امتصاصها في منطقة الأشعة فوق البنفسجية، وأن جرع قليلة من هذه الأشعة كفيلة بقتل بعض الطفرات Mutant التي لها آلية ضعيفة لإصلاح الـ DNA المتضرر، كما وتتسبب في تلف الأحماض النووية والبروتين (Casati و Walbot، 2004).

2-13-2-دور الأشعة فوق البنفسجية (UV) في أنتاج المركبات الثانوية للنبات

تأثير الأشعة فوق البنفسجية UVيعتمد عند الرغبة في زيادة إنتاجية النسيج النباتي لمركب ما أو مجموعة من المركبات حيث يعتمد على عوامل عدة منها النوع النباتي و نوع النسيج المعرض للأشعة، وعلى المركب أو مجموعة المركبات المطلوب زيادتها وعلى شدة الأشعة ومدة تعريض النسيج النباتي لها أضافة لعوامل فسلجية أخرى كالمحتوى الرطوبي للنسيج النباتي (Piri وآخرون،2011).

اوضحFonseca وآخرون (2006) أن معاملة نبات *T. parthenium* L بالأشعة فوق البنفسجية من (UVA+UVB) أدت إلى زيادة تركيز Parthenolide بمعدل ثلاثة أضعاف قياسا بالنباتات غير المعاملة. وجد إن تعريض النباتات للأشعة فوق البنفسجية UV-B أدى إلى تراكم التربينات ويعتقد أن الأشعة UV-B عملت على تحفيز التعبير الجيني مما أدى إلى زيادة في تصنيع وتراكم هذه المركبات، إذ حفزت UV-B زيادة تراكم مركب Paclitaxel بعد تعريض أوراق نبات *Taxus cuspidate* لهذا النوع من الأشعة (Hajnos وآخرون،2001).كما ادت هذه الاشعة الى تنشيط الانزيمات المرتبطة بتصنيع الفينولات مثل أنزيم Alanineammonia (PAL) و Chalcon synthase (CHS). وكذلك الانزيمات الداخلة في تصنيع الفلافينويدات وكما يزداد تركيز الكيومارين ولاسيما التي تدخل حلقة Furan في تركيبه، (Luis وآخرون،2007). لوحظ زيادة تراكم صبغة الانثوسيانين في التفاح والورد الشجيري وكان تأثير الأشعة من طريق زيادة تعبير الجينات المتحكمة للأنزيمات الداخلة في المسالك التصنيعية للانثوسيانين (Mahdavian واخرون، 2008)، وينتج تعريض النسيج النباتي لنوعين من الأشعة UV-A+UV-B أكثر من 10 أضعاف من القلويدات مقارنة مع التعريض للأشعة UV-B فقط، واستثمرت هذه الخاصية في زيادة انتاج نبات عين البزون المزروع خارج الجسم الحي من مركبي Vinblastine وVincristine(Ramani واخرون،2007).

2-14- الاحماض الامينية :-

الأحماض الأمينية عبارة عن أحماض كاربوكسيلية تحتوي على مجموعة أمينية واحدة أو أكثر،أن الوحدة البنائية الأساسية في البروتينات هي الأحماض الأمينية من نوع α–amino acid وفيها ترتبط المجموعة الأمينية بذرة الكاربون ألفا وهي الذرة المجاورة للمجموعة الكاربوكسيلية، علماً بأن الأحماض الأمينية التي تدخل في تركيب البروتينات ذات توزيع فراغي مطلق متشابه من النوع L، وتعد مواداً لبناء وتخليق مركبات عضوية اخرى كالهرمونات والانزيمات والفيتامينات. وهناك صورتان للأحماض الامينية الاولى الصورة الحرة (L-amino acids) وهي التي تمتص ويتم بناؤها من النبات والثانية D-amino acids وهي التي لا تشارك في تخليق البروتين

ولها دور في تكوين الانزيمات (Servpro، 2010). وقد صنف Mello، (2015) الحوامض الأمينية على أساس الحامض الاميني :

1-الحوامض الأمينية الأساسية Essential Amino Acids

وهي الحوامض الأمينية التي لا يمكن أن يصنعها الجسم ذاتيا لذا يجب أخذها عن طريق الغذاء أما Arginine و Histidine فيُعدان من الحوامض الأمينية شبه الأساسية .

2- الحوامض الأمينية غيرالبروتينية Non - Protein Amino Acids

وهي الحوامض الأمينية التي توجد بصورة حرة أو مرتبطة ولكنها لا تدخل في تركيب بروتينات الكائنات الحية مثل Ornithine و Citrulline، بل تدخل في تركيب بعض المركبات الثانوية.

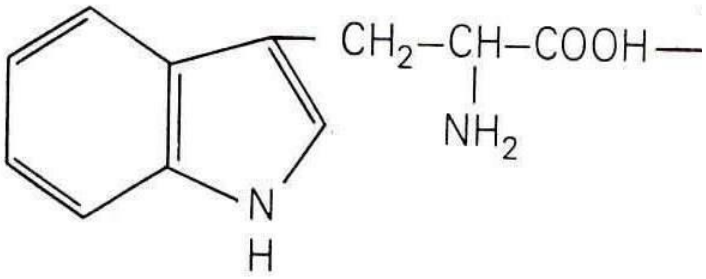
3- الحوامض الأمينية النادرة Rare Amino Acids

وهي الحوامض الأمينية الرئيسة (البروتينية) التي تدخل كعناصر ثانوية في تركيب بعض البروتينات المتخصصة مثل 5-hydroxyproline و 4- hydroxyproline الموجودان في البروتين الليفي Collagen و N-Methyllysine الموجود في البروتين العضلي مايوسين Myosin.

للاحماض الامينية اهمية خاصة في تحفيز ونمو الخلايا وهي بمثابة مخازن تساعد في الحفاظ على pHداخل النبات، كما تعد منشطات حيوية تؤثر بشكل مباشر او غير مباشر على الانشطة الفسيولوجية للنبات فهي تؤثر في سرعة نمو وتطور النبات من خلال تأثيرها في الاوكسينات والجبرلينات ولها دور في زيادة النمو الخضري وانتاجية النبات من أثناء تنشيط الكلورفيل ورفع كفاءة عملية البناء الضوئي، كما وتعد من العوامل المهمة التي تساعد على فتح الثغور من خلال رفع ازموزية سايتوبلازم الخلايا الحارسة ولها تأثير مخلبي على العناصر الصغرى فهي تساعد على زيادة سرعة امتصاصها ونقل العناصر داخل النبات من خلال زيادة نفاذية غشاء الخلية (Goya،2011 وWeaver، 2013).

Tryptophan -15-2

يعرف الحامض الأميني التربتوفان أيضاً β-3 indolylalanine ذو حلقة غير متجانسة Heterocyclic Amino Acids، تركيبه الكيميائي α-amino-ß-3-indole propionic acid وهو حامض أميني عطري (Maedae وDudareva، 2012). كما في الصيغة التركيبية التالية.



شكل (5) الصيغة التركيبية للحامض الأميني L-Tryptophan (البرزنجي، 2007).

يعد الحامض الاميني التربتوفان Tryptophan او بادئه Indoe-3-glycerol phosphate هما بادئا البناء الحيوي IAA، اذ وجد في النبات اربعة مسارات حيوية لتصنيعه ثلاثة منها معتمدة على الحامض الاميني التربتوفان Trtptophan-dependent Auxin biosynthesis وهي: مسار Indole-3-Pyruvic acid IPyA ومسار TAM tryptamine ومسار Indole-3-acetonitrile IAN، اما المسار الرابع فلا يعتمد على الحامض الاميني التربتوفان اذ يبني IAA من مركب Indole-3-glycerol phosphate (Kokubo وأخرون، 2017). ان هذا التعدد في مسارات البناء الحيوي IAA سيما من الحامض الاميني التربتوفان يظهر الدور المهم لهذا الهرمون وبادئه في نمو وتطور النبات (Mano وNemoto, 2012). بينBaldi واخرون (1991) في دراسة عن تأثير اضافة L-tryptophan و D-tryptophan الى نبات عدس الماء Lemna gibba في بناء هرمون IAA، أن L-tryptophan قد اسهم في تخليق IAA فيما لم يسهم D-tryptophan في عملية التخليق، كما لاحظ عدم تحول L-tryptophan الى D-tryptophan، وقد اشار الباحث ذاته ان توفر الحامض الاميني L-tryptophan داخل النبات يعد العامل الرئيس والمحدد لبناء IAA لكون كميات هذا الهرمون التي بنيت داخل النبات بوساطة الحامض الاميني المعلم كانت اقل من المتوقع حتى لو تمت مضاعفة كميات الحامض الاميني المعلم الى ثلاثة اضعاف، مما يؤكد وجود مسارت اخرى لتخليق IAA لا تعتمد على هذا الحامض الاميني.

2-16- التشخيص الكمي والنوعي للكلايكوسيدات القلبية بواسطة HPLC

ان اكتشاف الفعالية الحيوية لمركبات الايض الثانوي والمستخلصات وعملية تشخيص موادها الفعالة كانت عملية مكلفة وتتحدد بالوقت إذ انها يمكن ان تأخذ اسابيعاً او اشهراً او سنيناً وذلك اعتمادا على درجة تعقيد المركب المنشود، الا ان هذه العملية حاليا اصبحت سريعة بسبب التطور السريع الذي طرأ على الاجهزة المختبرية التي تساعد في عمليات اكتشاف وتشخيص هذه المركبات مثل جهاز High performance liquid chromatography (HPLC) انسجاما مع التطور في جهاز الـ Mass spectrometry (MS) وغيره من الاجهزة. تعد هذه التقنية كوسيلة لتقدير كمية ونوعية المركبات الايضية الثانوية ومن ضمنها القلويدات والكلايكوسيدات نظراً لقابلية هذه المنظومة على فصل مكونات مستخلص أجزاء النبات أو الكالس إلى مكوناتها مما يمكن من التعرف

على المواد المطلوبة مقارنة بالعينات القياسية، حيث تستخدم المحاليل القياسية لمركبات القلويدات والكلايكوسيدات، إذ حقنت في جهاز HPLC لغرض تحديد زمن الاحتجازRetention timeومساحة العينة Peak area وارتفاع الحزم على نحو منفرد لكل نموذج للتاكد على عدم وجود تداخل بينها تحت ظروف الفصل المستعملة حيث يتم قياس المركبات الموجودة في العينات عن طريق مقارنة مساحات حزم العينات مع مساحات الحزم للمادة القياسية وحسب تركيز المركبات (طاهر، 2017).

أمكن التعرف على قلويد hydroxyisoleucine -4 من نبات الحلبة من قبل Ahmed واخرون (2011). عند استخدام جهاز HPLC بواسطة Column 4.6x250 mM وMobile Phase يحتوي على 97.5 mM من KH2 PO4:Either 2.5 وسرعة جريان Flow Rate بنسبة 0.8 ml.min .وتمكن Altabtabaal واخرون، (2019) من الكشف عن مركبي Trigonelline و Diosgenine من كالس نبات الحلبة باستخدام جهاز HPLC بعمود فصل (Column C18 – ODS 25cm * 4.6 mm) وطور متحرك يتكون من acetonitrile: water بنسبة (90:10 v/v) ، وسرعة جريان 1ml/min، وتمكن Mohamadi واخرون (2020) من الكشف عن مركبي Trigonelline و Diosgenine و Nicotinic Acid من بذور نبات الحلبة عند استخدام جهاز HPLC بنسبة سرعة جريان Flow Rate 1ml/min وطور ثابت Column 25cm * 4.6 mm وطورمتحرك Mobile Phase متكون من methanol: water بنسبة (90:10). في حين تمكنتHussain،(2021) من الكشف عن مركبي Trigonelline و Diosgenine من كالس نبات الحلبة باستخدام جهاز HPLC بواسطة طور متحرك Mobile phase متكون من Methanol : ماء مقطر بنسبة (95:5, v/v) وعمود فصل Column (C18 – ODS 25cm * 4.6 mm) وسرعة جريان Flow Rate 0.8 ml/min.

3- المواد و طرائق العمل

أجريت هذه الدراسة في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم بستنة وهندسة الحدائق في كلية الزراعة / جامعة كربلاء المقدسة للمدة من 2021 الى 2022، و اجريت تحاليل الكلوروفيل والكاربوهيدرات في مختبر المركزي لكلية الزراعة - جامعة بغداد وتحاليل الـ HPLC في شركة الحقول البيضاء للاستثمارات و الدراسات البيئية والهندسية .

حيث شملت

3-1- مصدر الاجزاء النباتية :-

استعملت بذور نبات الحلبة التي تم الحصول عليها من المكاتب الزراعية

3-2- التعقيم Sterilization

تعد عملية التعقيم من العوامل المهمة التي يعتمد عليها نجاح تقنية زراعة الانسجة النباتية لذا شملت مراحل العمل المختلفة أجراء عمليات التعقيم سواء فيما يتعلق بالبذور او الوسط الغذائي MS ومكان وادوات العمل وقد شملت مراحل التعقيم ما يأتي:-

3-2-1- تعقيم الادوات المستخدمة :

عقمت جميع الادوات المستعملة عند الزراعة المتمثلة بالملاقط وشفرات التقطيع بعد تغليفها بورق الالمنيوم كذلك الماء المقطر واطباق بتري باستخدام جهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة 121مْ وتحت ضغط 1بار لمدة 30 دقيقة مع استخدام الكحول الاثيلي بتركيز 70% ومصباح بنزن burner لحرق الشفرات والملاقط بعد كل عملية زراعة داخل منضدة الزرع ولضمان أضافي للتخلص من الملوثات التي قد تنتقل اليها عند الزراعة، مع مراعاة فتح الحاويات داخل منضدة انسياب الهواء الطبقي عند الحاجةوعقمت الأيدي ومنضدة انسياب الهواء الطبقي بإستخدام الكحول الأثيلي بتركيز 70%.

3-2-2- تعقيم البذور :

غسلت البذور بالماء الجاري tap water لمدة 30 دقيقة ثم نقلت الى كابينة انسياب الهواء الطبقي Laminer air flow cabinet وعقمت سطحياً باستخدام الكحول الاثيلي C2H5OH (بتركيز 70%) لمدة دقيقة واحدة مع التحريك المستمر، ثم غسلت الاجزاء بالماء المقطر المعقم مرة واحدة و لمدة 5 دقائق لضمان ازالة تأثير الكحول الضار بعدها عقمت باستخدام محلول هايبوكلورات الصوديوم NaOClوحضرت منه تراكيز مختلفة عن طريق التخفيف بواقع 100 مل لكل تركيز وكانت التراكيز (1 , 2 , 3) % للمدد الزمنية (15,10,5) دقيقة على التتابع، ثم غسلت البذور بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لمدة 5 دقائق مع التحريك المستمر للتخلص من محلول هايبوكلورات الصوديوم، بعدها زرعت البذور على وسط MS الخالي من الهرمونات بواقع 10 مكررات و لكل

تركيز وبذرة واحد لكل مكرر وحضنت الزروعات في غرفة النمو تحت ظروف تحضين 16 ساعة ضوء/ يوم و 8 ساعات ظلام مقدرة بـ 1000 لوكس وبدرجة حرارة 25مْ $\pm$ 2 سجلت النتائج بعد عشرة ايام من الزراعة على اساس النسبة المئوية للتلوث.

3-3- الوسط الغذائي :

استخدم الوسط الغذائي MS (Murashige و Skoog,1962) واضيف اليه السكروز بمقدار 30غم.لتر$^{-1}$ ومنظمات النمو حسب نوع التجربة، عدل الاس الهيدروجيني PH الى 5.7 وذلك باستخدام هيدروكسيد الصوديوم NaOH او حامض الهيدروكلوريك HCl عياري، اكمل الحجم الى لتر واحد بعدها اضيفت مادة الاكار نوع (Agar-Agar) بمعدل 7 غم.لتر$^{-1}$الى الوسط الغذائي، سخنت مكونات الوسط الغذائي على جهاز الخلاط الكهربائي المغناطيسي الحراري Magnetic Stirrer Hot Plate لغرض اذابة الاكار مع مكونات الوسط الغذائي وبعد ان اصبح الوسط متجانساً ووزع الوسط الغذائي في انابيب الزراعة بواقع 10 مل لكل انبوب. غطيت الانابيب بغطاء محكم وعقمت بجهاز المؤصدة الـAutoclave على درجة حرارة 121مْ وضغط 1بار لمدة 15 دقيقة، اخرجت الانابيب من المؤصدة بعد انتهاء مدة التعقيم وبعدها تركت لتتصلب على درجة حرارة الغرفة وتصبح جاهزه للزراعة.

جدول (1) مكونات وسط MS من الاملاح اللاعضوية المستخدمة في تحضير الوسط الزراعي

المجموعة	المكونات	الصيغة الكميائية	محتويات الوسط الغذائي ملغم /لتر
النترات	نترات الامونيوم	NH4NO3	1650
	نترات البوتاسيوم	KNO3	1900
الكبريتات	كبريتات المغنسيوم المائية	MgSo4.7H2O	370
	كبريتات المنغنيز المائية	MnSO4.H2O	22.3
	كبريتات الزنك المائية	ZnSO4.7H2O	8.6
	كبريتات النحاس المائية	CuSO4.5H2O	0.025
الهاليدات	كلوريد الكالسيوم المائي	CaCL2.2H2O	440
	كلوريد الكوبلت المائي	CoCL2.6H2O	0.025
	يوديد البوتاسيوم	KI	0.83
B-P-MO	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	KH2.PO4	170
	حامض البوريك	H3BO3	6.2
	مولبيدات الصوديوم المائية	Na2MoO4.2H2O	0.025
الحديد المخلبي	كبريتات الحديدوز المائية	FeSO4.7H2O	27.856
	المادة المخلبية	Na2-EDTA.2H2O	37.25

3-4- مرحلة النشوء Initiation stage

بعد الحصول على افضل تركيز ومدة للتعقيم في الفقرة 3-2 أستئصلت الاجزاء النباتية (القمم النامية – البراعم الجانبية) من البادرات النامية من البذور المعقمة بعمر شهر وزرعت على الوسط الغذائي MS المجهز بتراكيز مختلفة من الـ BA (3,2,1,0) ملغم.لتر$^{-1}$ بواقع 10 تكرارات لكل تركيز .

حضنت الزروعات في غرفة النمو الـ growth room في درجة حرارة 25مْ $\pm$2 واضاءة 1000 لوكس مدة 16ساعة .يوم$^{-1}$ ،اخذت القياسات بعد أربعة اسابيع من الزراعة وتم تسجيل النسبة المئوية للاستجابة (نسبة البراعم التفتحة)% وتم حسابها على وفق المعادلة الاتية :-

نسبة الاستجابة = عدد البراعم النامية / العدد الكلي للبراعم المزروعة × 100%

جدول (2) مكونات وسط MS الخاص بمرحلة النشوء

المادة	الكمية (ملغم/لتر)
املاح MS	قوة كاملة
Pyrodoxine- Hcl	0.5
Glycine	2.0
Nicotinc asid	0.5
Thiamine	0.1
Myo- inositol	100
Sucrose	30000
Agar	7000
BA	3,2,1,0

3-5- مرحلة التضاعف Multiplication stage

بعد أربعة اسابيع من نمو الاجزاء الخضرية داخل الحاضنة واعتماداً على نتائج المتحصل عليها من تجربة نشوء الزروعات استخدمت الافرع الجانبية الناتجة من العقد في تجربة التضاعف الخضري واستبعدت القمة النامية من الدراسة لعدم استجابتها،قطعت النبيتات بمعدل 2سم وزرعت على وسط MS الصلب والمجهز بالـ BA(3,2,1,0) ملغم.لتر$^{-1}$ بالتداخل مع الـ NAA (0 ,0.2 ,0.4 .0,6) ملغم.لتر$^{-1}$ بواقع 10مكررات لكل تركيز في انابيب الزراعة. حضنت الزروعات تحت الظروف المشار اليها سابقاً. أخذت البيانات على مؤشرات الدراسة التي تضمنت عدد الافرع واطوالها وعدد الاوراق والوزن الطري والجاف للاجزاء الخضرية أضافة الى نسبة الكلوروفيل وتركيز الكاربوهيدرات.

3-6- تعريض النموات الخضرية لاشعة فوق البنفسجية UV مع الحامض الاميني L-Tryptophan

بعد الحصول على افضل توليفة وادامتها اخذ طول ثابت من النموات الخضرية2سم وزرعت على وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من الحامض الاميني L-Tryptophan (0 ,5 ,10 ,15 ,20) ملغم .لتر$^{-1}$ بوجود تركيز ثابت من افضل توليفة تركيز من BA اذ بلغت2 ملغم.لتر$^{-1}$ و 0.2ANN ملغم.لتر$^{-1}$، عرضت النبيتات الى أشعة UV للمدد (0 , 10 , 20) دقيقة وحضنت في غرفة النمو على درجة حرارة 25مْ $\pm$2 ومدة اضاءة 16 ساعة. يوم$^{-1}$ ، أخذت مؤشرات الدراسة بعد اربعة اسابيع من الزراعة، التي شملت عدد الافرع واطوالها وعدد الاوراق والوزن الطري والجاف للمجموع الخضري أضافة الى معدل تركيز الكلوروفيل والكاربوهيدرات.

3-7- تقدير الكلوروفيل :-

قدرت صيغة الكلوروفيل باتباع طريقة (1976.Goodwin) وكالاتي :-

اخذ 1غم من النموات الخضرية النامية في مجال زراعة الانسجة ووضعت في هاون خزفي واضيف لها 9مل من الاسيتون 85% ثم سحقت الانسجة النباتية لحين الحصول على بقايا عديمة اللون، رشح المحلول بورق الترشيح الى انبوبة حجمية وأكمل الحجم الى 10 مل باستخدام الاسيتون نفسه، سحب مل من المحلول واجري له التخفيف المناسب، قرىء الامتصاص الضوئي للمحلول على طول موجتين 663 و645 نانوميتر باستخدام جهاز الـSpectrophotometer

حسب المحتوى الكلي للكلوروفيل وحسب المعادلة الاتية :-

Total Chlorophyll mg/l = 20.2D (645) +8.02D (663)

حيث ان D = قراءة الجهاز

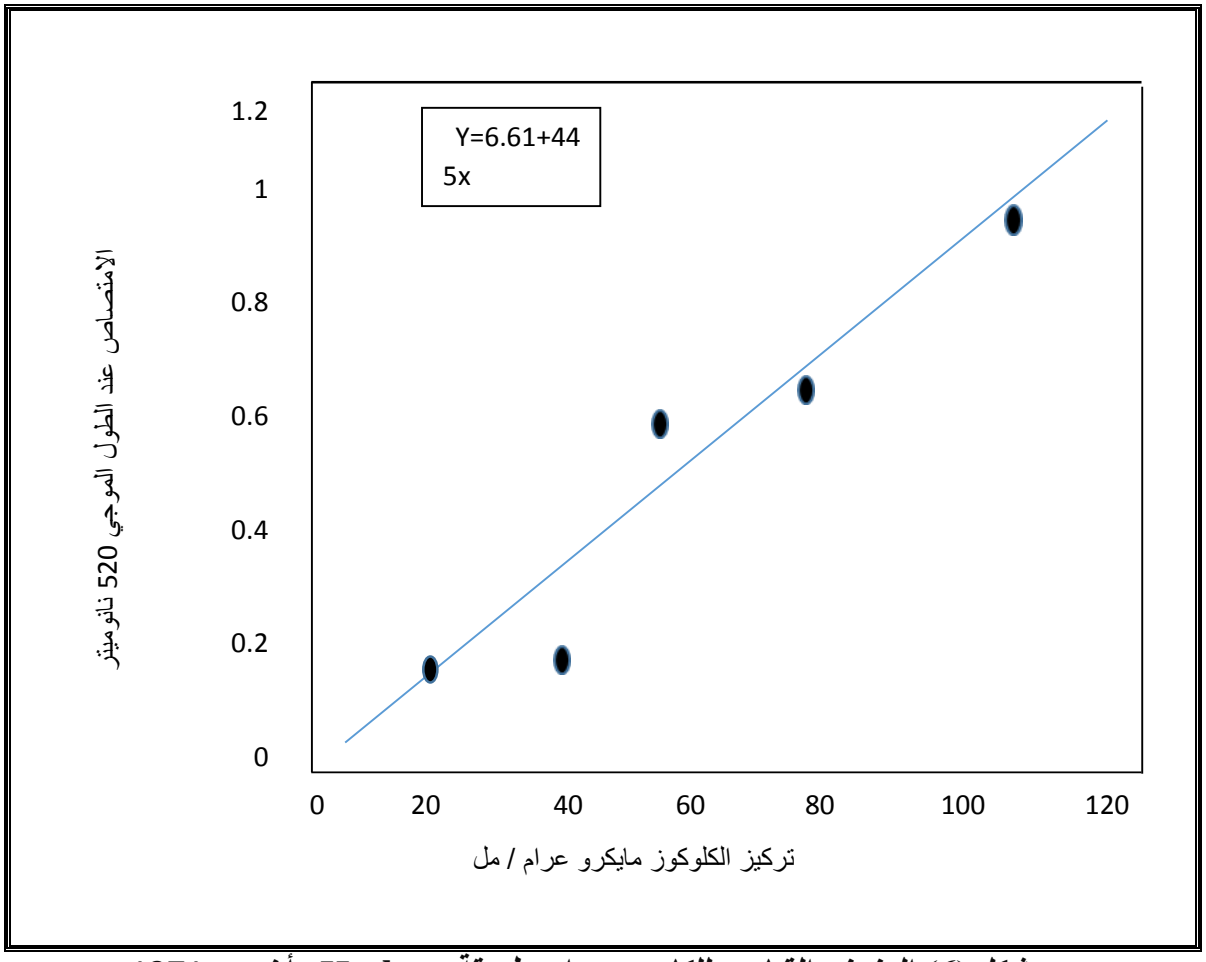
3-8- قياس تركيز الكاربوهيدرات :-

اتبعت طريقة Herbert وأخرين(1971) المسماة طريقة الفينول حامض الكبريتيك حيث اخذ 0.1غم من العينات المطحونةووضعت في انبوبة اختبار جافة واضيف لها 10مل من الكحول الاثيلي 70%، وبعد الرج الجيد وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 10دقائق وعلى سرعة 1500دورة . دقيقة$^{-1}$، واخذ 1مل من الراشح الى انبوبة اختبار واضيف له 1مل من كاشف الفينول ذي تركيز 5% مع 5مل من حامض الكبريتيك 99% . مزج الخليط جيدا وحضن في حمام مائي على درجة حرارة (25-30)مْ لمدة 20دقيقة، تركت الانابيب لتبرد وقدر تركيز الكاربوهيدرات بقياس شدة اللون بواسطة جهاز المقياس الطيفي عند الطول الموجي488 نانوميتر وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة وتركيز وقورنت مع المنحى القياسي للكاربوهيدرات .

3-9- المنحنى القياسي للكاربوهيدرات :-

رسم المنحنى القياسي للكاربوهيدرات بحسب طريقة Herbertوأخرين (1971)باستخدام تراكيز مختلفة من الكاربوهيدرات تراوحت بين (0-120) مايكروغرام .مل$^{-1}$. اخذ 1مل من كل تركيز وأضيف اليه 1مل من كاشف الفينول تركيز 5% وتم مزجهما جيدا ثم اضيف اليهما 5مل من حامض الكبريتيك المركز ومزج الخليط جيدا،

حضن المزيج في حمام مائي على درجة حرارة (25-30)مْ لمدة 20دقيقة وقدر تركيز الكاربوهيدرات بقياس شدة اللون بواسطة جهاز المقياس الطيفي عند طول الموجي 520 نانو ميترا، رسم المنحنى القياسي للكاربوهيدرات ضوئه قدر تركيز الكاربوهيدرات في النموات المعاملة بالمواد المحفزة .



شكل (6) المنحنى القياسي للكاربوهيدرات طريقة Herbertو أخرون 1971

3-10- استحثاث الكالس Callus induction

اخذت الاجزاء الخضرية (القمم النامية، الاوراق)من النباتات النامية من تجربة التضاعف بطول 2 سم لكل جزء نباتي وزرعت تحت ظروف معقمة في الوسط الغذائي المجهز بتراكيز (4,3,2,1,0) ملغم.لتر$^{-1}$2,4,D و (0.4,0.2,0.1, 0) ملغم.لتر$^{-1}$BA بواقع 10 مكررات لكل معاملة، حظنت الزروعات في الظلام بغرفة النمو تحت درجة حرارة 25مْ $\pm$2 وسجلت النتائج بعد أربعة أسابيع من الزراعة. قيس الوزن الطري للكالس بالملغم لكل مكرر بعد ازالة الاكار وجففت بالفرن الكهربائي على درجة حرارة 70م^{0} لمدة 48 ساعة لحين ثبات الوزن لغرض قياس الوزن الجاف.

3-11- ادامة الكالس Callus maintenance

اعتمدت التوليفة المستخدمة في استحثاث الكالس والتي أعطت اعلى وزن طري من الكالس وأجريت عملية subculture للكالس كل اربعة اسابيع لحين الوصول الى الكمية المطلوبة للتجارب اللاحقة.

3-12- تحفيز انتاج المركبات الايضية الثانوية (القلويدات والكلايكوسيدات)

تعرض الكالس لاشعة فوق البنفسجية UV مع الحامض الاميني الاميني L-Tryptophan بعد الحصول على افضل توليفة وادامتها اخذ وزن ثابت من الكالس 100 ملغم وزرع على وسط مجهز بتراكيز مختلفة من التربتوفان (0 ,5, 10, 15, 20)ملغم .لتر$^{-1}$ وبوجود تركيز ثابت من افضل توليفة تركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$ من 2,4-D و 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ من BAوعرض الى أشعة UV للمدد (0 , 10 , 20) دقيقة، بواقع 10مكررات لكل تركيز ومدة، حفظت الزروعات في الظلام واخذت مؤشرات الدراسة بعد اربعة اسابيع من الزراعة التي شملت الوزن الطري والجاف للكالس.

3-13- **التقدير الكمي والنوعي للمركبات الفعالة لنبات الحلبة (**Diosgenineو Trigonelline **) باستخدام تقانة كروموتوكرافيا السائل فائق الاداء(HPLC)**

تم فصل المركبات (Diosgenineو Trigonelline) في مستخلص نبات وكالس نبات الحلبة على وفق ماذكره Shailajan واخرون (2011) وتحت الظروف الاتية:-

***نوع الجهاز**: HPLC

***الشركة والموديل** : Shimadzu 10 AV- LC

***عمود الفصل Stationary phase**

تم استخدام عمود فصل نوع Macherey- Nagle, C18- Column(USA) بإبعاد (25×4.6 mm)، اذ ان مادة الفصل في العمود (الطور الثابت) هي Octadecyl Silane (ODSI) المرتبطة كيمياويا بمادة silica gel وقطر الجزيئات 3 مايكروميتر وعند درجة حرارة 35 م^{0} .

***الطور المتحرك Mobile phase**

تم تحضير هذا الطور بمزج methanol مع الماء بنسبة 5:95 (حجم: حجم)water: methanol على التوالي، ثم تم ترشيحه والتخلص من الفقاعات الموجودة فيه بواسطة جهاز الترددات فوق الصوتية (Ultrasonic) وبعد ذلك اصبح الطور المتحرك جاهزاً للاستخدام.

***سرعة الجريانFlow rate**

اعتمد معدل الجريان 1مل/ دقيقة وعند طول موجي wave length 220 نانوميتراً.حقن 10 مايكروليتر لكل عينة من العينات المراد قياسها وقورن زمن الاحتجاز ومساحة المنحنى للعينات القياسية، وتم حساب تركيز المركبات الفعالة في المستخلصات وفق المعادلة الاتية:-

$$\textbf{تركيز المجهول(g/µg)} = \frac{\text{مساحة حزمة النموذج}}{\text{مساحة حزمة القياس}} \times \text{تركيز القياس} \times \text{عدد مرات التخفيف}$$

3-14- التحليل الاحصائي :-

نفذت التجارب التي تضمنتها الدراسة باتباع التصميم التام التعشية Completely Randomized Design (CRD) وبتجارب عاملية وبواقع 10 تكرارات لكل معاملة وتحلل النتائج باستخدام البرنامج الاحصائي Genstat وتقارن المتوسطات وفق اختبار اقل فرق معنوي (Least Significant DifferenceLSD) وعلى مستوى احتمال 0.05 (الساهوكي ووهيب،1990).

4- النتائج والمناقشة

4-1- تأثير NaOCl والمدد في النسبة المئوية لتلوث بذور نبات الحلبة

تعد عملية التعقيم الخطوة الاساسية في نجاح برنامج زراعة الانسجة النباتية والتي من دونها لايمكن اكمال المرحلة اللاحقة. ومشكلة تلوث الاجزاء النباتية من اهم المشاكل التي تواجه زراعة الانسجة النباتية لذلك يعد تعقيم الجزء النباتي من الخطوات التي يعتمد عليها نجاح زراعة الانسجة والتي بنجاحها يتم انشاء مزارع الانسجة النباتية.

يبين الجدول (3) تأثير هايبوكلورات الصوديوم ومدة التعقيم في تقليل نسبة تلوث بذور الحلبة، اذ بلغت نسبة التلوث 100% في معاملة المحايد، وبزيادة تركيز هايبوكلورات الصوديوم انخفضت نسبة التلوث معنويا فبلغت (58.33، 26.83، 5.16) % عند التراكيز (1، 2، 3)% على التوالي.

وسجلت مدة التعقيم فروقات معنوية، اذ انخفضت نسبة التلوث بزيادة المدة الزمنية الى 15 دقيقة حيث اعطت نسبة تلوث بلغت 32.50% بينما وصلت نسبة التلوث 63.87% عند مدة التعقيم 5 دقائق.

كما ظهرت فروق معنوية في نسبة التلوث عند تداخل المدة مع تراكيز هايبوكلورات الصوديوم اذ بلغت 100% عند جميع مدد التعقيم في معاملة المحايد. واقلها كان في مدة التعقيم 15 دقيقة عند التركيزين 2 و 3% والمدة 10 دقائق عند التركيز 3% من هايبوكلورات الصوديوم فبلغت 0.0%.

ولوحظ ان زيادة التركيز الى 3% من هايبوكلورات الصوديوم وعند المدد 10 و 15 دقيقة قد ادى الى تأخير انبات البذور فضلاً عن ظهور شتلات بيضاء اللون خالية من الكلوروفيل مقارنة بالتركيز 2% من هايبوكلورات الصوديوم وعند المدة 15 دقيقة الذي اعطى اقل نسبة تلوث بلغت 0.0% دون التأثيرفي الانبات. ان تأثير هايبوكلورات الصوديوم وعمله كمادة معقمة للانسجة النباتية يعود الى حامض Hypoclorous(HOCl) الذي يعد مادة مؤكسدة قوية. اذ يتكون هذا الحامض نتيجة ذوبان الكلور بالماء كما في المعادلة الاتية: (Ramawat، 2004).

$$Cl_2+H_2O \rightarrow HCl + HOCl$$

ان هذه النتائج تتفق مع نتائج عدد من الباحثين الذين وجدوا ان استعمال تركيز 2% من هايبوكلورات الصوديوم لمدة 15 دقيقة اعطى اقل نسبة تلوث منهم Abbas ,(2012) عند تعقيم بذور نبات الحلبة -*Trigonella foenum graecum* و Monokes واخرون، (2013) عند تعقيم بذور نبات *Achyranthes aspera* واتفق مع Younesikelaki واخرون (2016) عند تعقيم بذور نبات الختمية (.L) *Althaea oicinalis* و ماتوصل اليه Carmila و Cardoso (2018) عند تعقيم بذور نبات *Cercospora longissima* خارج الجسم الحي. ومع ماتوصل اليه Altabtabaal واخرون، (2019) عند تعقيم بذور نبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum L.*

جدول (3) تأثير NaOCL والمدد والتداخل بينهما في النسبة المئوية لتلوث بذور الحلبة بعد 14 يوما من الزراعة على وسط MS

الزمن (دقيقة)	تركيز هايبوكلورات الصوديوم%				المعدل
	0	1	2	3	
5	100	80.00	60.00	15.50	63.87
10	100	65.00	30.50	00.00	46.37
15	100	30.00	00.00	00.00	32.5
L.S.D(0.05)	1.80				0.78
المعدل	100	58.33	26.83	5.16	
L.S.D(0.05)	1.10				

2-4- تاثير نوع الجزء النباتي و تراكيز BA في نشوء الزروعات

يؤدي الجزء النباتي دوراً مهماً في الزراعة خارج الجسم الحي لأي نوع نباتي بسبب تحديد امكانية الأخلاف ومعدل تضاعف الافرع ومن ثم الحالة الفسلجية وحساسية الانواع النباتية للمسببات التلوث المختلفة. فقد اظهرت نتائج جدول (4) استجابة العقد المزروعة على وسط MS و المجهز بتراكيز مختلفة من الـBA، بينما لم تسجل القمة اي استجابة تذكر لنشوء الزروعات، و قد يعود سبب ذلك الى اختلاف هذه الاجزاء النباتية في محتواها من الهرمونات الداخلية مما يعكس ذلك الى دورها في عمليات النمو و التطور المختلفة و كذلك الاختلاف في نوع الخلايا ضمن الجزء النباتي الواحد او تجمع المواد الغذائية و الهرمونية في انسجة العقد بكمية اكبر مقارنة بالعقد الجانبية (شكري والمعيقل، 2013).

او قد يعود سبب اختلاف الاستجابة بين الاجزاء النباتية الى عوامل فسلجية تتعلق بمحتوى الانسجة الغذائي والهورموني والذي يعد عاملا محددا للاستجابة حيث تتجمع المواد الغذائية والهرمونية في أنسجة العقد بكمية أكبر مقارنة بالاجزاء الاخرى (Trigiano وGray ، 1996)، إذ أشار الرفاعي والشوبكي (2002) إلى أن الأجزاء النباتية التي تحمل براعم جانبية تكوّن أفرعا جانبية بسرعة خلال مرحلة النشوء، أو الى درجة نضج وتمايز الخلايا المكونة للحزم الوعائية للعقدة المفردة والتي تعتمد عليها عملية نقل الغذاء الممتص من الوسط الغذائي. كما يوضح

الجدول ذاته تأثير BA بتراكيزه المختلفة المجهزة للوسط الغذائي في النسبة المئوية لنشوء زروعات نبات الحلبة فقد حققت العقد الجانبية المزروعة على وسط MS المجهز بـ 2 ملغم.لتر$^{-1}$BA اعلى نسبة استجابة مئوية بلغت 80% في حين لم تحقق معاملة المقارنة اعلى استجابة تذكر. ومن خلال نتائج هذا الجدول يتضح ان اضافة الـ BA في الوسط الغذائي MS قد حفز نمو الافرع الجانبية المزروعة وقد يعود السبب الى دور السايتوكاينينات في تطور الكلوروبلاست، عملية البناء الضوئي، عملية التعبير في الاوراق، يزيد من فعالية انتقال المغذيات، يحفز عملية انقسام الخلايا وتطور الاعضاء (Schmulling ، 2004). فضلا عن ذلك فان السايتوكانينات تساعد في بناء الحامض الرايبوزي RNA وDNA والبروتينات والانزيمات وحصول الانقسام غير المباشر ثم انقسام الخلية الذي يحفز تكوين البراعم الخضرية من الانسجة المرستيمية (الخفاجي، 2014)، كما اشار Haberer و Kieber(2002) ان استخدام السايتوكاينينات ولاسيما BA في الزراعة النسيجية يعود إلى كونها مركبات مستقرة لعدم تحللها بسهولة وكفاءتها العالية في كسر السيادة القمية إذ تعمل على تكشف واتساع الأوعية الناقلة لكل من الخشب واللحاء، ومنع تحلل الكلوروفيل وتحفيز انقسام الخلايا، وزيادة انتاج الاحماض النووية. اتفقت هذه النتائج مع ماتوصل اليه عدد من الباحثين عند انشاء مزارع الافرع الخضرية خارج الجسم الحي ومنهم(Jala، 2012) عند اكثار نبات الكركم .Curcuma longa L و (احمد، 2013) عند اكثار ثلاثة اصناف من الشليك، و (Bansel و Verma، 2014) عند اكثار النبات الطبي زنبق الزنجبيل الابيض، ومع الحميداوي (2016) عند اكثار نبات الجيربرا.

جدول (4) تأثير الـ BA و نوع الجزء النباتي في مرحلة النشوء بعد 30يوم من الزراعة على وسط MS

تركيزBA (ملغم .لتر$^{-1}$)	نوع الجزء النباتي	عدد المكررات	عدد المكررات الناجحة	نسبة الاستجابة%
0	عقد	10	0	0
	قمه	10	0	0
1	عقد	10	4	40
	قمه	10	0	0
2	عقد	10	8	80
	قمه	10	0	0
3	عقد	10	5	50
	قمه	10	0	0

4 -3- تاثير تراكيز BA و NAA والتداخل بينهما في معدل عدد الافرع الخضرية لنبات الحلبة

احدى الصفات التي درست هي تاثير التراكيز المختلفة من الـ BA وNAA و التداخل بينهما في عملية التضاعف الخضري والذي تم ملاحظته من الجدول (5) تفوق الـ BA معنويا بالتركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$ باعطائه اعلى معدل لعدد الافرع بلغ 8.65 فرع. جزء نباتي$^{-1}$، ثم قلت الاستجابة بزيادة التركيز الى 3 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي حقق معدل بلغ 5.57 فرع. جزء$^{-1}$، في حين كان اقل معدل عند معاملة المقارنة الذي بلغ 2.19 فرع. جزء$^{-1}$. كما اشار الجدول ذاته تفوق الـ NAA عند التركيز 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ معنويا الذي اعطى اعلى معدل بلغ 7.49 فرع. جزء نباتي$^{-1}$ مقارنة بمعاملة المقارنة التي اعطت اقل معدل بلغ 2.96 فرع.جزء نباتي$^{-1}$. اما بالنسبة لتاثير التداخل بين تراكيز الـ BA و NAA فقد اختلفت قيمه معنويا عن بعضها اذ اعطى التركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$ من الـ BA وبالتداخل مع التركيز 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ من NAA اعلى معدل لعدد الافرع بلغ 12.00 فرع. جزء نباتي$^{-1}$ بينما حقق الوسط الخالي من منظمات النمو اقل استجابة لعدد الافرع بلغت 2.10 فرع. جزء نباتي$^{-1}$.

جدول (5) تأثير تراكيز BA و NAA و التداخل بينهما في معدل عدد الافرع الخضرية بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS

BA تركيز (ملغم.لتر$^{-1}$)	NAA(ملغم.لتر$^{-1}$) تركيز				المعدل
	0.0	0.1	0.2	0.4	
0.0	2.10	2.15	2.30	2.22	2.19
1.0	3.00	3.67	6.67	4.50	4.46
2.0	4.33	8.28	12.00	10.00	8.65
3.0	2.40	4.36	9.00	6.50	5.57
L.S.D(0.05)	1.38				0.69
المعدل	2.96	4.61	7.49	5.81	
L.S.D(0.05)	0.69				

شكل (7) التداخل بين BA و NAA في معدل عدد الافرع الخضرية

4-4- تاثير تراكيز BA و NAA والتداخل بينهما في معدل طول الافرع الخضرية لنبات الحلبة

تبين نتائج الجدول (6) هناك زيادة معنوية في معدل طول الافرع الخضرية لنبات الحلبة بزيادة تراكيز الـ BA من 1الى 2 ملغم.لتر-1 المضافة للوسط الغذائي والتي اعطت معدل بلغ 3.22 و 4.00 سم على التوالي ثم قلت الاستجابة بزيادة تركيز الـBA الى 3 ملغم.لتر-1 الذي اعطى معدل بلغ 1.97 سم، بينما اعطت معاملة المقارنة معدل بلغ 2.43 سم.

وعن تاثير تراكيز NAA فقد تفوق التركيز 0.4 ملغم.لتر-1 معنويا اذ بلغ المعدل 3.92 سم، في حين حققت معاملة المقارنة اقل معدل بلغ 1.48 سم. اما بالنسبة لتاثير التداخل بين تراكيز الـ BA و الـ NAA فيلاحظ ان اعلى معدل تحقق عند الزراعة على الوسط الغذائي MS الذي يحتوي تركيز 2 ملغم.لتر-1 من الـ BA مع 0.4 ملغم.لتر-1 من الـ NAA حيث بلغ 6.05 سم والذي تفوق معنويا عن بقية المعاملات، اما اقل معدل لطول الافرع حصل عند الوسط الغذائي الخالي الذي بلغ 1.14 سم.

جدول (6) تاثير الـ BA والـ NAA والتداخل بينهما في معدل طول الافرع الخضرية (سم) بعد اربعة اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS.

تركيز BA (ملغم.لتر$^{-1}$)	تركيز NAA(ملغم.لتر$^{-1}$)				المعدل
	0.0	0.1	0.2	0.4	
0.0	1.14	2.61	2.85	3.15	2.43
1.0	1.50	3.11	4.10	4.18	3.22
2.0	1.95	3.75	4.25	6.05	4.00
3.0	1.33	2.17	2.08	2.30	1.97
L.S.D(0.05)	0.12				0.62
المعدل	1.48	2.91	3.32	3.92	
L.S.D(0.05)	0.62				

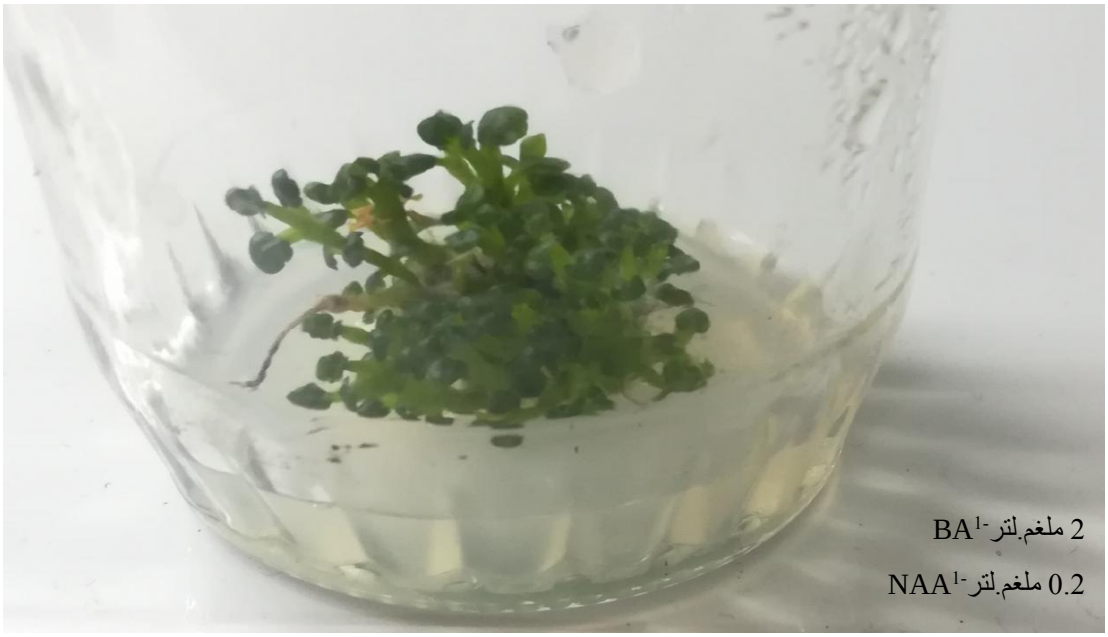
شكل (8) التداخل بين BA و NAA في معدل طول الافرع الخضرية

4-5- تأثير الـ BA و الـ NAA و التداخل بينهما في معدل عدد الاوراق لنبات الحلبة

توضح نتائج الجدول (7) تفوق BA عند التركيز 2 ملغم. لتر$^{-1}$ معنويا على جميع معاملات التراكيز الاخرى والذي بلغ المعدل فيه 26.33 ورقة.نبتة$^{-1}$، وسجلت اقل معدل عدد الاوراق في معاملة المحايد والذي بلغ 2.67 ورقة.نبتة$^{-1}$. كما اظهرت النتائج تفوق NAA عند التركيز 0.2 ملغم. لتر$^{-1}$ معنويا في تحقيق اعلى معدل بلغ 21.50 ورقة.نبتة$^{-1}$مقارنة بمعاملة المقارنة التي بلغ معدل عدد الاوراق فيها فيها 10.17 ورقة.نبتة$^{-1}$. اما بالنسبة لتاثير التداخل بين تراكيز الـ BA و الـ NAA فيلاحظ من نتائج الجدول تفوق الـ BA معنويا عند التركيز 2ملغم.لتر$^{-1}$ وبالتداخل مع الـ NAA عند التركيز0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ في تحقيق اعلى معدل بلغ 34.33 ورقة.نبتة$^{-1}$ مقارنة مع معاملة المقارنة التي اعطت معدل بلغ 2 ورقة.نبتة$^{-1}$.

جدول (7) تأثير الـ BA و الـ NAA و التداخل بينهما في معدل عددالاوراق بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS

BA تركيز (ملغم.لتر$^{-1}$)	NAA تركيز (ملغم.لتر$^{-1}$)				المعدل
	0.0	0.1	0.2	0.4	
0.0	2	2.67	3.33	2.67	2.67
1.0	7	18	25	23.33	18.33
2.0	20.67	22.67	34.33	27.67	26.33
3.0	11	15.67	23.33	19	17.25
L.S.D(0.05)	4.78				2.39
المعدل	10.17	14.75	21.50	18.17	
L.S.D(0.05)	2.39				



شكل (9) التداخل بين BA و NAA في معدل عدد الاوراق

كما يلاحظ من بيانات الجداول (5، 6، 7) تفوق الـ BA وبالتركيز 2ملغم. لتر-1 معنويا في معدل عدد وطول الافرع المتضاعفة وعدد الاوراق وقد يعزى السبب الى الفعل التحفيزي للسايتوكانين في حث الخلايا على الانقسام والتمايز وينتج عن ذلك نمو البراعم الى افرع خضرية كما اشار كثير من الباحثين الى الدور الذي يؤديه السايتوكانين وبالتراكيز الملائمة في الزراعة النسيجية من حيث فعله في كسر السيادة القمية وانشائه مناطق جذب في البراعم الجانبية وهذا يحفز من سرعة انتقال المغذيات اليها والتي ينتج عنها تحفيز نمو البراعم ومن ثم تفوق عدد الافرع، وقد وضعت نظريات عدة لتفسير هذه الظاهرة منها ان السايتوكانين المضاف يتحرك من الاسفل الى الاعلى عبر البراعم الابطية ويلغي بذلك تأثير الاوكسين المتكون في البراعم الطرفية والمتحرك سفليا والذي قد يتجمع بتراكيز عالية في البراعم الابطية ويعيق نموها بتثبيطه للتمايز في الانسجة الوعائية الجانبية في هذه البراعم، وبهذا سيكون دور السايتوكانين المتحرك نحو الاعلى احداث عملية تمايز الانسجة الخشبية والحزم الوعائية للبراعم الابطية لترتبط مع مثيلاتها في الساق وبعد ذلك ستسهل عملية نقل الماء والمغذيات الى هذه البراعم ومن ثم تحفيزها على النمو والتطور وتكوين الافرع الجانبية (عبدول، 1987)، او قد يعود السبب الى عمل الـ BA على حدوث التوازن الهرموني للنسيج النباتي في المناطق المرستيمية الغنية بالاوكسينات لاحداث الاستجابة المطلوبة مما يسبب كسر السيادة القمية وانتقال المغذيات من خلال دفع الجزء النباتي في تحفيز نمو الافرع الخضرية في اباط الاوراق (عبد

الحسين واخرون، 2013)، اما المستويات المرتفعة منها فأنها تسبب تناقصا في معدلات النمو بسبب اضطراب العمليات الحيوية داخل الانسجة نتيجة اختلال التوازن الهرموني فيها الامر الذي يؤدي الى انخفاض معدلات النمو للاجزاء النباتية وهذا الانخفاض لايعني بالضرورة موت الخلايا ولكنه عادة مايكون نتيجة اعاقة للنمو (Devlin و Withman، 1983).

4- 6- تأثير الـ BA و الـ NAA و التداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للافرع الخضرية

تشير نتائج الجدول (8) و (9) ان للتراكيز المختلفة من الـ BA تاثيرا معنويا في معدل الوزن الطري والجاف للافرع الخضرية اذ تفوقت معاملة التركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$ من الـ BA معنويا على جميع المعاملات باعطائها اعلى معدل للوزن الطري والجاف بلغ 4.03 و 1.22 ملغم. نبات $^{-1}$على التوالي مقارنة بمعاملة المقارنة والتركيز 3 ملغم.لتر$^{-1}$ التي سجلت اقل المعدلات للوزن الطري بلغ 1.91 و 2.62 ملغم. نبات $^{-1}$على التوالي، كذلك للوزن الجاف بلغ 0.07 و 0.57 ملغم على التوالي. كما اثرت التراكيز المختلفة من الـ NAA على معدل الوزن الطري والجاف للافرع الخضرية حيث تفوق التركيز 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ في تحقيق اعلى معدل بلغ 3.64 و 0.95 ملغم. نبات $^{-1}$على التوالي في حين سجلت اقل المعدلات عند معاملة المقارنة والتي حققت معدل بلغ 1.79 و 0.35 ملغم. نبات $^{-1}$على التوالي. اما بالنسبة لمعاملات التداخل بين تراكيز الـ BA والـ NAA فقد تفوقت معاملة التركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$ من الـ BA بالتداخل مع التركيز 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ من الـ NAA باعطائها اعلى معدل للوزن الطري والجاف بلغ 5.46 و 1.88 ملغم. نبات $^{-1}$على التوالي، بينما سجلت اقل معدلات التداخل عند الوسط الغذائي MS الخالي من منظمات النمو والتي بلغت 0.30 و 0.01 ملغم. نبات $^{-1}$على التوالي، وقد يعزى ذلك الى ان هذه المعاملات كانت قد تفوقت في معدل عدد الافرع وعدد الاوراق مما ادى الى زيادة الكتلة الحية مما انعكس على الوزن الطري والجاف لهذه الكتلة، وقد يعود السبب في زيادة التضاعف ومن ثم زيادة الوزن الطري والجاف الى دور السايتوكانين المهم في انقسام الخلايا ولا سيما في حالة وجوده مع الاوكسين وبهذا ازداد تاثيره في نمو البراعم الابطية للافرع المزروعة في حال وجوده مع الاوكسين اي يزداد التاثير عند وجودهما معا (ابو ضاحي واليونس، 1988) ان هذه النتائج تتفق مع ماتوصل اليه (الحجيمي، 2010) و (Almukhtar و Muslim، 2019) في صفات الوزن الطري والجاف للنموات الخضرية لنبات عين البزون *Catharanthus rouses*.

جدول (8) تأثير الـ BA و الـ NAA و التداخل بينهما في معدل الوزن الطري بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS.

BA تركيز (ملغم.لتر$^{-1}$)	NAA(ملغم.لتر$^{-1}$) تركيز				المعدل
	0.0	0.1	0.2	0.4	
0.0	0.30	1.16	1.84	1.46	1.19
1.0	2.16	3.18	3.63	3.16	3.03
2.0	2.91	4.10	5.46	3.65	4.03
3.0	1.80	2.40	3.63	2.67	2.62
L.S.D(0.05)	0.26				0.13
المعدل	1.79	2.71	3.64	2.73	
L.S.D(0.05)	0.13				

جدول (9) تأثير الـ BA و الـ NAA و التداخل بينهما في معدل الوزن الجاف بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS.

BA تركيز (ملغم.لتر$^{-1}$)	NAA(ملغم.لتر$^{-1}$) تركيز				المعدل
	0.0	0.1	0.2	0.4	
0.0	0.01	0.02	0.15	0.09	0.07
1.0	0.60	0.77	0.89	0.63	0.72
2.0	0.65	1.48	1.88	0.88	1.22
3.0	0.14	0.54	0.88	0.72	0.57
L.S.D(0.05)	0.08				0.04
المعدل	0.35	0.71	0.95	0.58	
L.S.D(0.05)	0.04				

4-7- تأثيرالتربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) و التداخل بينهما على معدل عدد الافرع الخضرية بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS.

إحدى الصفات التي درست هي ملاحظة تأثير إضافة تراكيز مختلفة من التربتوفان والاشعة فوق البنفسجيةعلى عملية التضاعف الخضري وتحفيز انتاج الايض الثانوي، والذي يلاحظ من الجدول (10) أنه في حالة عدم إضافة الحامض الاميني إلى الوسط الغذائي قد حقق اقل معدل لعدد الافرع بلغ 10.33 فرع.نبات$^{-1}$، ولكن في حالة إضافته وبتراكيز مختلفة حدثت الاستجابة وبدأت البراعم الابطية بالنمو والتضاعف بزيادة التراكيز المضافة للوسط الغذائي MS، وقد تفوق التركيز 20ملغم.لتر$^{-1}$ في تحقيق اعلى معدل بلغ 34.05 فرع.نبات$^{-1}$ والذي لم يختلف معنويا عن التركيز 15 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي حقق معدل بلغ 33.44 فرع.نبات$^{-1}$ ،كما كان للاشعة فوق البنفسجية تاثير واضح في معدل عدد الافرع فقد حققت الدقيقة 20 اعلى معدل بلغ 32.69 فرع.نبات$^{-1}$ مقارنة مع معاملة المقارنة التي اعطت اقل معدل بلغ 18.33 فرع.نبات$^{-1}$ ، اما عن تاثير التداخل بين تراكيز التربتوفان واللاشعة فوق البنفسجية فقد تفوقت معاملة التركيز 20ملغم.لتر عند الدقيقة 20 في تحقيق اعلى معدل بلغ 38.00 فرع.نبات$^{-1}$ في حين لم تعط معاملة المقارنة اي استجابة تذكر.

جدول (10) تأثير التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) والتداخل بينهما في معدل عدد الافرع بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS.

المدة الزمنية لاشعة UV(دقيقة)	تركيز التربتوفان (ملغم.لتر$^{-1}$)					المعدل
	0	5	10	15	20	
0	1.00	15.00	20.00	27.00	28.67	18.33
10	12.00	28.60	28.75	35.46	35.50	28.06
20	18.00	35.50	34.13	37.86	38.00	32.69
L.S.D(0.05)	2.12					1.04
المعدل	10.33	26.36	27.62	33.44	34.05	
L.S.D(0.05)	1.10					

4-8-تأثيرالتربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) والتداخل بينهما على معدل طول الافرع الخضرية بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS.

تشير نتائج الجدول (11) الى وجود اختلافات معنوية بين تراكيز التربتوفان في معدل طول الافرع اذ تفوق التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ في تحقيق اعلى معدل بلغ 5.05 سم في حين حققت معاملة المقارنة اقل معدل بلغ 2.85 سم. وتظهر نتائج الجدول نفسه الى تفوق الاشعة فوق البنفسجية عند الدقيقة 20 في اعطاء اعلى معدل طول للافرع بلغ 5.01 سم الذي تفوق معنوياً عن الدقيقة 10 ومعاملة المقارنة إذ بلغ 4.45 و 2.44 سم على التوالي . وعن تاثير التداخل الثنائي فقد اشارت نتائج الجدول نفسه ان الوسط الغذائي المجهز بالتركيز20 ملغم.لتر تربتوفان والمعرض للاشعة فوق البنفسجية عند الدقيقة 20 كان له تاثير معنوي في معدل طول الافرع بلغ 6.70 سم مقارنة بمعاملة المقارنة التي لم تعط اي استجابة تذكر.

جدول (11) تأثير التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) والتداخل بينهما في معدل طول الافرع بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسطMS.

المدة الزمنية لاشعة UV(دقيقة)	تركيز التربتوفان (ملغم.لتر$^{-1}$)					المعدل
	0	5	10	15	20	
0	2.00	2.66	2.40	2.40	2.75	2.44
10	2.80	2.64	5.80	5.34	5.71	4.45
20	3.75	3.70	5.25	5.66	6.70	5.01
L.S.D(0.05)	0.78					0.30
المعدل	2.85	3.00	4.48	4.46	5.05	
L.S.D(0.05)	0.47					

4-9- تأثيرالتربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) و التداخل بينهما على معدل عدد الاوراق بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS.

تؤدي زيادة عدد الأوراق بتأثير العوامل الفيزيائية التحفيزية إلى زيادةعدد الاوراق، ومن ثم زيادة عملية التمثيل الكاربوني ونواتجها وانعكاس ذلك إيجابياً على النمو. فقد بينت نتائج الجدول (12) وجود فروق معنوية بين تراكيز التربتوفان في تأثيرها بصفة معدل عدد الأوراق، إذ تفوقت معاملة التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ معنوياً باعطاها اعلى معدل عدد أوراق بلغ 50.26 ورقة. نبات$^{-1}$ تلتها معاملة التركيز 15 ملغم.لتر$^{-1}$ بلغت 57.93ورقة. نبات $^{-1}$ وتلتها معاملة التركيز 10 ملغم.لتر$^{-1}$ بلغت 41.74ورقة . نبات $^{-1}$ ومن ثم معاملة التركيز 5 ملغم.لتر$^{-1}$ بلغت 37.97 ورقة .نبات $^{-1}$ ، في حين كان اقل عدد أوراق عند معاملة المقارنة التي بلغت 25.87ورقة .نبات $^{-1}$. كذلك نجد أن هذه الصفة قد تأثرت معنويا بمدد التعرض للاشعة فوق البنفسجية إذ أعطت المدة 20 دقيقة أعلى معدل عدد أوراق بلغ 50.26 ورقة .نبات $^{-1}$ قياساً مع النبيتات غير المعاملة بلغ 38.07 ورقة .نبات $^{-1}$.انعكست التأثيرات المعنوية للمعاملات على تأثير التداخل في هذه الصفة، إذ بلغ أعلى معدل عند التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ والمدة 20 دقيقة من الاشعة بلغت 75.00 ورقة .نبات $^{-1}$في حين اعطت معاملة المقارنة اقل معدل بلغ 12.00 ورقة .نبات $^{-1}$.

جدول (12) تأثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) والتداخل بينهما في معدل عدد الاوراق بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS.

المدة الزمنية لاشعة UV(دقيقة)	تركيز التربتوفان (ملغم.لتر$^{-1}$)					المعدل
	0	5	10	15	20	
0	12.00	33.10	40.18	55.06	50.01	38.07
10	30.50	40.11	45.05	58.25	65.00	47.78
20	35.13	40.70	40.00	60.50	75.00	50.26
L.S.D(0.05)	0.36					0.16
المعدل	25.87	37.97	41.74	57.93	63.33	
L.S.D(0.05)	0.18					

4-10- تأثيرالتربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) و التداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للمجموع الخضري.

تشير النتائج في الجدول (13) إلى أن الوزن الطري للمجموع الخضري قد تأثر معنوياً بتراكيز التربتوفان المضافة للوسط الغذائي، إذ تفوقت معاملة التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ معنوياً عن معاملات التراكيز الباقية وبأعلى وزن طري بلغ 3.21 ملغم. نبات $^{-1}$ تلتها معاملات التراكيز (15، 10، 5) ملغم.لتر$^{-1}$ إذ بلغت (3.08، 2.52، 2.28) ملغم .نبات$^{-1}$على الترتيب في حين سجلت معاملة المقارنة أدنى وزن طري بلغ 0.65 ملغم. نبات $^{-1}$. وكانت لمدد التعرض للاشعة فوق البنفسجية تأثير معنوي في هذه الصفة اذ اعطت المدة 20 دقيقة اعلى وزن طري بلغ 2.64 ملغم. نبات $^{-1}$ قياساً مع النبيتات غير المعاملة والتي سجلت ادنى وزن طري بلغ 1.98 ملغم. نبات $^{-1}$. وانعكست التاثيرات المعنوية لتراكيز التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية على معاملات التداخل الثنائي، إذ سجلت معاملة التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ وعند الدقيقة 20 من التعرض للاشعة اعلى وزن طري بلغ 3.40 ملغم. نبات $^{-1}$ بينما انخفضت هذه الصفة الى 0.22 ملغم . نبات $^{-1}$عند معاملة المقارنة.

تكمن أهمية الوزن الجاف في كونه من أهم الدلائل التي تؤكد على قوة نمو النبات أو ضعفه عن طريق قدرة النبات على التمثيل الغذائي وتراكم نواتج التمثيل الكاربوني في أنسجة النبات والتي تعتمد بدورها على مدى تأثرها بظروف بيئية النمو والعوامل التحفيزية.تبين نتائج الجدول (14) وجود تأثيرات معنوية لتراكيز التربتوفان في صفة الوزن الجاف للمجموع الخضري، إذ أعطت معاملة التركيز 1.54 ملغم. نبات $^{-1}$ مقارنة مع أدنى وزن جاف عند معاملة المقارنة بلغت 0.04 ملغم. نبات $^{-1}$. وكان لمستويات التعرض للاشعة فوق البنفسجية الأثر المعنوي في زيادة هذه الصفة إذ سجلت معاملة المدة 20 دقيقة أعلى وزن جاف بلغ 1.16 ملغم . نبات $^{-1}$ بينما سجلت معاملة المقارنة أدنى قيمة بلغت 0.97 ملغم. نبات $^{-1}$من الوزن الجاف للنبات . وتفوقت معاملة التداخل 20ملغم.لتر$^{-1}$ التربتوفان عند الدقيقة 20 من الاشعة فوق البنفسجية بإعطائها أعلى وزن جاف للنبات بلغ 1.58 ملغم. نبات $^{-1}$ مقارنةً مع اقل وزن جاف عند معاملة المقارنة التي بلغت 0.01 ملغم. نبات $^{-1}$.

جدول (13) تأثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري للمجموع الخضري بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS.

المدة الزمنية لاشعة UV(دقيقة)	تركيز التربتوفان (ملغم.لتر$^{-1}$)					المعدل
	0	5	10	15	20	
0	0.22	1.50	2.18	3.00	3.00	1.98
10	0.85	2.50	2.50	3.10	3.25	2.44
20	0.90	2.85	2.90	3.15	3.40	2.64
L.S.D(0.05)	0.15					0.06
المعدل	0.65	2.28	2.52	3.08	3.21	
L.S.D(0.05)	0.09					

جدول (14) تأثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) والتداخل بينهما في معدل الوزن الجاف للمجموع الخضري بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط MS.

المدة الزمنية لاشعة UV(دقيقة)	تركيز التربتوفان (ملغم.لتر$^{-1}$)					المعدل
	0	5	10	15	20	
0	0.01	0.85	1.00	1.50	1.50	0.97
10	0.05	1.28	1.28	1.52	1.55	1.13
20	0.08	1.30	1.33	1.52	1.58	1.16
L.S.D(0.05)	0.36					0.16
المعدل	0.04	1.14	1.20	1.51	1.54	
L.S.D(0.05)	0.18					

4-11- تأثيرالتربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) والتداخل بينهما في معدل تركيز الكلوروفيل للمجموع الخضري

تشير البيانات المدرجة في الجدول (15) الى وجود فروق معنوية بين المعاملات في معدل تركيز الكلوروفيل بزيادة تراكيز التربتوفان المضافة للوسط الغذائي MS، اذ تفوق التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ في تحقيق اعلى معدل بلغ 3.72 ملغم.غم$^{-1}$ ثم تلاه التراكيز (15، 10، 5) ملغم.لتر$^{-1}$ والتي حققت معدل بلغ (3.61، 2.62، 1.86) ملغم.غم$^{-1}$ على التوالي في حين حققت معاملة المقارنة اقل معدل بلغ 1.59 ملغم.غم$^{-1}$، كما كان لاشعة UV تاثير معنوي في معدل تركيز الكلوروفيل اذ اعطت معاملة UV بالدقيقة 20 اعلى معدل بلغ 3.16 ملغم.غم$^{-1}$ ثم تلتها معاملة الـ 10 دقائق والي بلغت 2.66 ملغم.غم$^{-1}$ واقلها كان عند معاملة المقارنة والتي حققت اقل معدل بلغ 2.22 ملغم.غم$^{-1}$. اما عن تاثير التداخل فقد تفوق التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ تربتوفان عند الدقيقة 20 من اشعة UV في تحقيق اعلى معدل بلغ 4.21 ملغم.غم$^{-1}$ مقارنة مع معاملة المقارنة التي اعطت اقل معدل بلغ 1.27 ملغم.غم$^{-1}$.

جدول (15) تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في معدل تركيز الكلوروفيل (ملغم. غم$^{-1}$) في للمجموع الخضري بعد شهر من الزراعة على وسط MS.

المدة الزمنية لاشعة UV(دقيقة)	تركيز التربتوفان (ملغم.لتر$^{-1}$)					المعدل
	0	5	10	15	20	
0	1.27	1.40	2.03	3.25	3.16	2.22
10	1.65	2.10	2.30	3.45	3.80	2.66
20	1.85	2.08	3.55	4.13	4.21	3.16
L.S.D(0.05)	0.05					0.01
المعدل	1.59	1.86	2.62	3.61	3.72	
L.S.D(0.05)	0.03					

4-12- تأثيرالتربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية (UV) والتداخل بينهما في معدل تركيز الكاربوهيدرات للمجموع الخضري.

اما عن تاثير تراكيز التربتوفان واشعة UV في معدل تراكيز الكاربوهيدرات المقدرة في المجموع الخضري لنبات الحلبة المزروعة على الوسط الغذائي MS فقد اشارت البيانات الموضحة في الجدول (16) الى وجود تفوق معنوي بزيادة تراكيز التربتوفان اذ تفوق التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ في تحقيق اعلى معدل بلغ 4.25 ملغم.غم$^{-1}$ ثم تلاه التراكيز (15، 10، 5) ملغم.لتر$^{-1}$ والتي حققت معدل بلغ (4.22، 3.71، 2.88) ملغم.غم$^{-1}$ على التوالي في حين حققت معاملة المقارنة اقل معدل بلغ 2.15 ملغم.غم$^{-1}$، كما كان لاشعة UV تاثير معنوي في معدل تركيز الكاربوهيدرات اذ اعطت معاملة UV بالدقيقة 20 اعلى معدل بلغ 3.90 ملغم.غم$^{-1}$ ثم تلتها معاملة الـ 10 دقائق والي بلغت 3.49 ملغم.غم$^{-1}$ واقلها كان عند معاملة المقارنة والتي حققت اقل معدل بلغ 2.93 ملغم.غم$^{-1}$. اما عن تاثير التداخل فقد تفوق التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ تربتوفان عند الدقيقة 20 من اشعة UV في تحقيق اعلى معدل بلغ 5.15 ملغم.غم$^{-1}$ مقارنة مع معاملة المقارنة التي اعطت اقل معدل بلغ 2.10 ملغم.غم$^{-1}$.

جدول (16)تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في معدل تركيز الكاربوهيدرات (ملغم. غم$^{-1}$) للمجموع الخضري بعد شهر من الزراعة على وسط MS.

المدة الزمنية لاشعة UV(دقيقة)	تركيز التربتوفان (ملغم.لتر$^{-1}$)					المعدل
	0	5	10	15	20	
0	2.10	2.75	3.18	3.38	3.27	2.93
10	2.12	2.78	4.05	4.19	4.33	3.49
20	2.25	3.13	3.90	5.10	5.15	3.90
L.S.D(0.05)	0.25					0.11
المعدل	2.15	2.88	3.71	4.22	4.25	
L.S.D(0.05)	0.14					

إستنادا لما سبق عرضة من نتائج الجداول (15 - 16) بشكل عام يظهر تفوق معاملات التربتوفان في معدل الصفات المدروسة والتي شملت عدد وطول الفروع المتضاعفة وعدد الاوراق والوزن الطري والوزن الجاف للمجموع الخضري ومعدل تركيز الكلوروفيل والكاربوهيدرات المقاس في المجموع الخضري وقد يعزى سبب ذلك الى تاثير الاحماض الامينية ومن ضمنها التربتوفان التي تمثل المصدر الرئيس للناتروجين العضوي (الرفاعي والشوبكي، 2002) هذا بالاضافة الى دورها في بناء البروتينات والانزيمات التي تؤدي دوراً رئيساً في السيطرة على ميكانيكية تمايز الخلايا (Mano وNemoto, 2012) ومن ثم اخلاف النباتات وزيادة معدلات النمو، فقد اشار(Al-Khayri، 2001) على ضرورة اضافة الاحماض الامينية الى الاوساط الغذائية لاتمام عمليات النمو على الرغم من مقدرة خلايا الاجزاء النباتية على تكوينها كون الكميات المصنعة منها اقل من الحاجة المثالية لها، ومن المعروف ان الاحماض الامينيه تضاف الى الاوساط الغذائيه كمصدر للنايتروجين العضوي وذلك لاستخدامها من قبل الجزء النباتي بشكل اسرع من النتروجين غير العضوي الموجود في الوسط الغذائي ومن ثم تكون اكثر جاهزية هذا ماجعلها واحدة من اهم العوامل التي تساعد في نمو الخلايا واعادة تكوين النبات (جندية،2003) كون الناتروجين يؤدي دوراً رئيساً في بناء صبغة الكلوروفيل لاشتراكه في تركيب وحدات Porphyrins الداخلة في تركيب هذه الصبغة (Havline واخرون،2005) وبناء الكاربوهيدرات

والبروتينات ومن ثم الانسجة الجديدة هذا بالاضافة الى دوره في صنع هرمون النمو الطبيعي IAA الذي يؤدي دورا كبيرا في انقسام الخلايا واستطالتها وتحفيز النشاط المرستيمي للنبات (Maeda و Dudareva، 2012). اتفقت هذه النتائج مع (البرزنجي ،2007) عند أكثار نبات البطاطا. و نتائج (طاهر، 2017) عند أكثار نبات الجرجير .

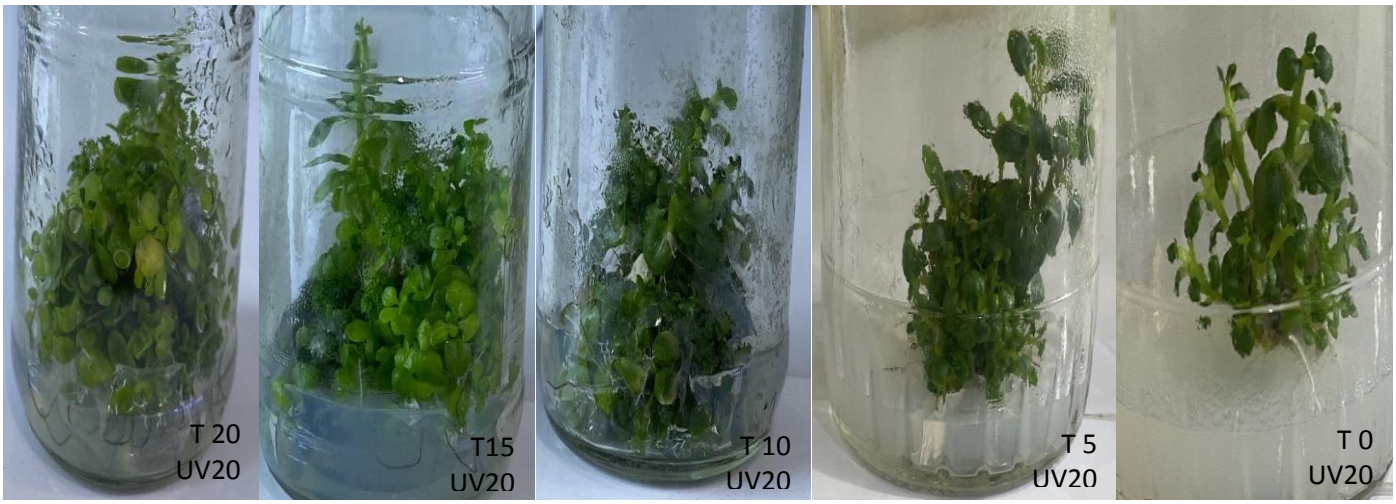
كما كان للاشعة فوق البنفسجة UV تاثير معنوي في معدل الصفات المقاسة ذاتها وربما يعود السبب في ذلك إلى التأثير التحفيزي للأشعة فوق البنفسجية و استنادا إلى حالات عدة تشير إلى انتقال هذا التأثير التنشيطي للإشعاع عبر الأجيال، إضافة إلى إن الجرع التحفيزية للأشعة تعمل على تعطيل عمل بعض الأنزيمات المثبطة لبعض العمليات الحياتية في النبات، ويعتقد أيضا إن ظاهرة التنشيط الإشعاعي تؤدي إلى تغير في الخصائص الفسلجية في السايتوبلازم وهذا مايتسبب زيادة في العمليات الفسلجية والتفاعلات الحياتية فيه (Rukmanskiو Fedin،1969). ومن المعروف أن الضوء ومنه الأشعة فوق البنفسجية يعمل على تهديم هرمون النمو IAA إما عن طريق تقليل فعالية الإنزيم الذي يحول الحامض الأميني التربتوفان إلى IAA ، أو عن طريق تثبيط نشاط هرمون النمو IAA من خلال امتصاص التركيب الحلقي للهرمون لهذه الأشعة ومن ثم تقليل السيادة القمية والذي تكون نتيجته زيادة عدد النبيتات النامية (ياسين، 2001).

وقد تعزى الزيادة في طول الافرع الخضرية المعرضة للأشعة فوق البنفسجية إلى أن الإشعاع له تأثير إيجابي في زيادة نشاط بعض الإنزيمات أو تكوين بعض المركبات الجديدة التي تعتبر منشطة للإنزيمات الخاصة بالنمو، ولكون الإنزيمات هي بروتينات فان تعريض الاجزاء النباتية لمثل هذه الأشعة ستؤثر فيها خاصة وأن الأحماض الأمينية الحلقية وبالأخص التربتوفان تمتص الأشعة في هذه المنطقة من الطيف الضوئي (Korogodin وآخرون، 1969و Gerhardt وآخرون، 1999). وكذلك زيادة نشاط عدد من إنزيمات Mitogen-activated Protein Kinases (MPK) (Holley وآخرون، 2003) إذ أن لهذه الإنزيمات دوراً مهماً في عمليات البناء والتمثيل في الأنسجة النباتية (ياسين،2001).

وقد تعزى زيادة معدل عدد الاوراق في معاملات التعريض للأشعة فوق البنفسجية إلى دور هذه الأشعة في زيادة النمو الخضري من خلال زيادة عدد السيقان والذي يؤدي بالنتيجة إلى زيادة عدد الاوراق، وقد أشارت البحوث التي قام بها Vos (1995) إلى ازدياد عدد الاوراق والمساحة الورقية وزيادة معدل النمو الخضري لنباتات البطاطا المعرضة للاشعة فوق البنفسجية.

وقد تعزى الزيادة في الوزن الجاف للمجموع الخضري في معاملات التعريض لهذه الأشعة إلى دور الإشعاع في زيادة نشاط بعض الإنزيمات والذي يعكس إيجاباً في زيادة النشاط الخلوي ومن ثم زيادة حجم ووزن الخلايا، أو أنه أدى إلى تشجيع تكوين بعض المركبات الجديدة التي تعد منشطة للإنزيمات الخاصة بالنمو (Korogodinوآخرون، 1969)، فضلاً عن أن قوة نشاط النمو الخضري في هذه النباتات ستؤدي إلى زيادة كفاءة التمثيل الكاربوني ومن ثم زيادة تراكم المواد الكاربوهيدراتية في أوراق وسيقان النباتات.

اتفقت هذه النتائج مع ماتوصل اليه (Asma، 2017) عند تعريض نبيتات *Moringa oleifera* المزروعة خارج الجسم الحي الى اشعة الـــ UV فلاحظ تفوق في معدل النمو الخضري ومحتواها من البرولين والكاربوهيدرات مقارنة بمعاملة المقارنة، ومع (الموســـوي، 2017) عند تعريض بذور نبات *Tanacetum parthenium* L. المزروعة خارج الجسم الحي الى اشعة الـUV فوجدت هناك تاثير معنوي في معدل الانبات وعدد وطول الافرع الخضرية والوزن الطري والجاف وانتاج الكلوروفيل والكاربوهيدرات ومركبات الايض الثانوي.



شكل (10) تاثير تداخل التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في صفات المجموع الخضري لنبات الحلبة

4-13- تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في معدل تركيز Trigonelline (مايكروغرام.غم$^{-1}$) للمجموع الخضري.

تشير البيانات المدرجة في الجدول (17) الى وجود فروق معنوية بين المعاملات في معدل تركيز قلويد الـ Trigonelline بزيادة تراكيز التربتوفان المضافة للوسط الغذائي MS، اذ تفوق التركيز 15 ملغم.لتر$^{-1}$ في تحقيق اعلى معدل بلغ 277.23 مايكروغرام. غم$^{-1}$ ثم قلت الاستجابة بزيادة التركيز الى 20 ملغم.لتر$^{-1}$ الي حقق معدل بلغ 265.31 مايكروغرام. غم$^{-1}$على التوالي في حين حققت معاملة المقارنة اقل معدل بلغ 92.90 مايكروغرام .غم$^{-1}$، كما كان لاشعة UV تاثير معنوي في معدل تركيز قلويد الـ Trigonelline اذ اعطت معاملة UV عند الدقيقة 20 اعلى معدل بلغ 286.45 مايكروغرام. غم$^{-1}$ثم تلتها معاملة الـ 10 دقائق والي بلغت 227.25 مايكروغرام.غم$^{-1}$ واقلها كان عند معاملة المقارنة والتي حققت اقل معدل بلغ 126.95 مايكروغرام.غم$^{-1}$. اما عن تاثير التداخل فقد تفوق التركيز 15 ملغم.لتر$^{-1}$ تربتوفان عند الدقيقة 20 من اشعة UV في تحقيق اعلى معدل بلغ 355.75 مايكروغرام.غم$^{-1}$ مقارنة مع معاملة المقارنة التي اعطت اقل معدل بلغ 33.07 مايكروغرام.غم$^{-1}$.

جدول (17) تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في معدل تركيز قلويد الـ Trigonelline (مايكروغرام. غم$^{-1}$) للمجموع الخضري بعد شهر من الزراعة على وسط MS.

المدة الزمنية لاشعة UV(دقيقة)	تركيز التربتوفان (ملغم.لتر$^{-1}$)					المعدل
	0	5	10	15	20	
0	33.07	75.10	145.30	190.55	190.75	126.95
10	85.13	215.18	270.45	285.40	280.13	227.25
20	160.50	280.80	310.15	355.75	325.05	286.45
L.S.D(0.05)	0.17					0.07
المعدل	92.90	190.36	241.96	277.23	265.31	
L.S.D(0.05)	0.09					

4-14- تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في معدل تركيز Diosgenine (مايكروغرام.غم$^{-1}$) للمجموع الخضري.

وعن تاثير تراكيز التربتوفان واشعة UV في معدل تركيز مركب الـ Diosgenine المقدر في المجموع الخضري لنبات الحلبة المزروعة على الوسط الغذائي MS فقد اشارت البيانات الموضحة في الجدول (18) الى وجود تفوق معنوي بزيادة تراكيز التربتوفان (5، 10، 15) ملغم.لتر$^{-1}$ والتي حققت معدل بلغ (126.12، 175.59، 212.73) مايكروغرام.غم$^{-1}$ على التوالي ثم قلت الاستجابة عند التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ محقق معدل بلغ 206.23 مايكروغرام.غم$^{-1}$ ، في حين حققت معاملة المقارنة اقل معدل بلغ 70.09 مايكروغرام.غم$^{-1}$، كما كان لاشعة UV تاثير معنوي في معدل تركيز مركب الـ Diosgenine اذ اعطت معاملة UV بالدقيقة 20 اعلى معدل بلغ 210.60 مايكروغرام.غم$^{-1}$ ثم تلتها معاملة الـ 10 دقائق والي بلغت 162.68 مايكروغرام.غم$^{-1}$ واقلها كان عند معاملة المقارنة والتي حققت اقل معدل بلغ 101.18 مايكروغرام.غم$^{-1}$. اما عن تاثير التداخل فقد تفوق التركيز 15 ملغم.لتر$^{-1}$ تربتوفان عند الدقيقة 20 من اشعة UV في تحقيق اعلى معدل بلغ 272.12 مايكروغرام.غم$^{-1}$ مقارنة مع معاملة المقارنة التي اعطت اقل معدل بلغ 20.10 مايكروغرام.غم$^{-1}$.

جدول (18) تاثير التربتوفان والاشعة فوق البنفسجية (UV) في معدل تركيز مركب الـ Diosgenine (مايكروغرام. غم$^{-1}$) للمجموع الخضري بعد شهر من الزراعة على وسط MS.

المدة الزمنية لاشعة UV(دقيقة)	تركيز التربتوفان (ملغم.لتر$^{-1}$)					المعدل
	0	5	10	15	20	
0	20.10	55.00	112.07	150.35	168.38	101.18
10	65.03	138.08	184.25	215.74	210.30	162.68
20	125.15	185.30	230.45	272.12	240.02	210.60
L.S.D(0.05)	0.09					0.04
المعدل	70.09	126.12	175.59	212.73	206.23	
L.S.D(0.05)	0.05					

4- 15- تاثير تراكيز 2,4, D و BA في النسبة المئوية لاستجابة القمة النامية لاستحثاث الكالس.

تشـير النتائج في الجدول (19) والشـكل (12) الى تاثير التراكيز المختلفة من الاوكسـين 2,4-D والسـايتوكانين BA في النسبة المئوية للكالس المستحث من القمه النامية، حيث يلاحظ استجابة القمم النامية عند جميع تراكيز الـ 2,4-D بالتداخل مع تراكيز الـ BA وبجميع التكرارات لنشوء الكالس في حين لم تعطي معاملة مقارنة الـ -2,4 D وبالتداخل مع جميع تراكيز BA اي استجابة تذكر.

جدول (19) تاثير تراكيز الـ 2,4-D والـ BA في النسبة المئوية لاستجابة القمم النامية لاستحثاث الكالس بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS.

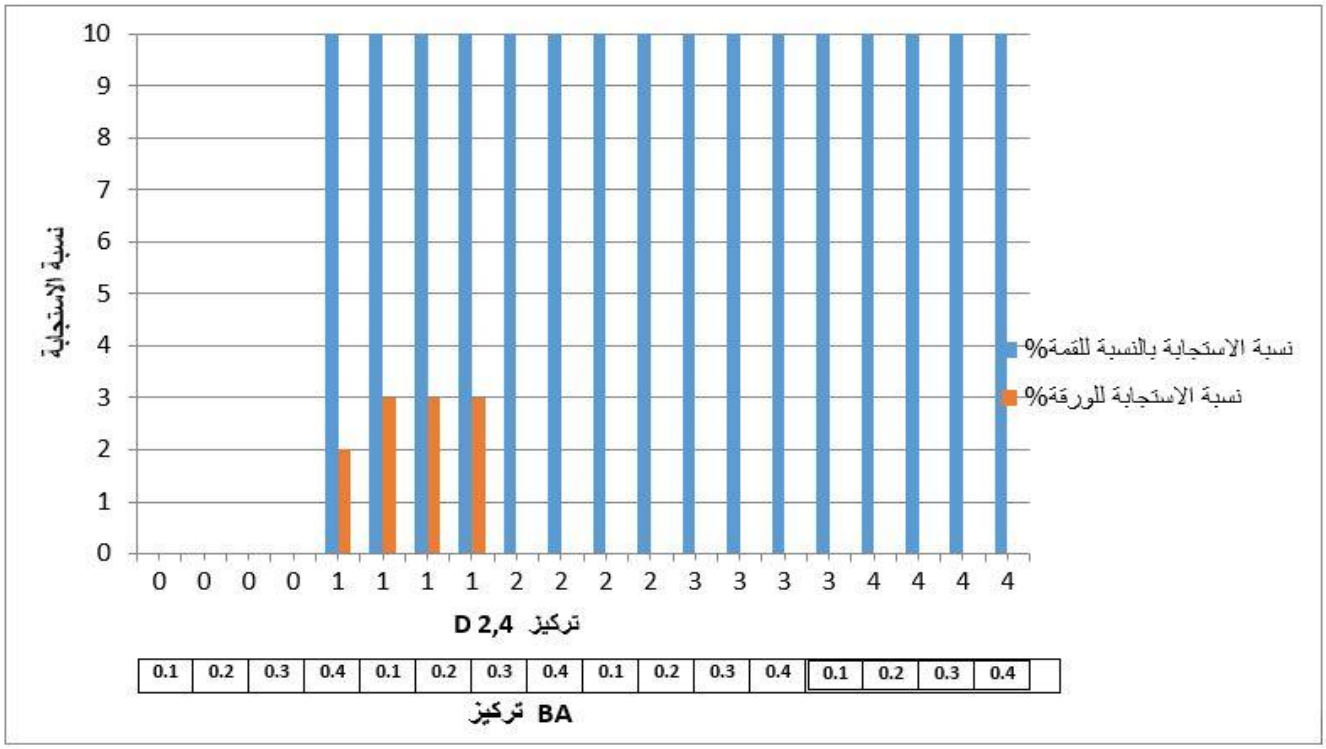
2,4-Dتركيز (ملغم .لتر$^{-1}$)	BAتركيز (ملغم .لتر$^{-1}$)	عدد المكررات	عدد المكررات الناجحة	نسبة الاستجابة%
0	0.0	10	0	0
	0.1	10	0	0
	0.2	10	0	0
	0.4	10	0	0
1	0.0	10	10	100
	0.1	10	10	100
	0.2	10	10	100
	0.4	10	10	100
2	0.0	10	10	100
	0.1	10	10	100
	0.2	10	10	100
	0.4	10	10	100
3	0.0	10	10	100
	0.1	10	10	100
	0.2	10	10	100
	0.4	10	10	100
4	0.0	10	10	100
	0.1	10	10	100
	0.2	10	10	100
	0.4	10	10	100

4- 16- تاثير تراكيز 2,4, D و BA في النسبة المئوية لاستجابة الورقة لاستحثاث الكالس.

بينت نتائج الجدول (20) والشكل (12) تاثير التراكيز المختلفة من الاوكسين 2,4-D والسايتوكانين BA في النسبة المئوية للكالس المستحث من الورقة ، حيث يلاحظ استجابة الورقة لنشوء الكالس عند التراكيز 1 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D و 0 ملغم.لتر$^{-1}$ BA بنسبة بلغت 20% ، بينما حقق التركيز ذاته من 2,4-D عند جميع تراكيز الـ BA نسبة بلغت 30% لنشوء الكالس، في حين لم تعطي جميع التراكيز الاخرى اي استجابة تذكر.

جدول (20) تاثير تراكيز الـ 2,4-D والـ BA في النسبة المئوية لاستجابة الورقة لاستحثاث الكالس بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS.

2,4-Dتركيز (ملغم .لتر$^{-1}$)	BAتركيز (ملغم .لتر$^{-1}$)	عدد المكررات	عدد المكررات الناجحة	نسبة الاستجابة%
0	0.0	10	0	0
	0.1	10	0	0
	0.2	10	0	0
	0.4	10	0	0
1	0.0	10	2	20
	0.1	10	3	30
	0.2	10	3	30
	0.4	10	3	30
2	0.0	10	0	0
	0.1	10	0	0
	0.2	10	0	0
	0.4	10	0	0
3	0.0	10	0	0
	0.1	10	0	0
	0.2	10	0	0
	0.4	10	0	0
4	0.0	10	0	0
	0.1	10	0	0
	0.2	10	0	0
	0.4	10	0	0



الشكل (11) تاثير التراكيز المختلفة من الاوكسين 2,4-D والسايتوكانين BA في النسبة المئوية للكالس المستحث من القمه النامية والاوراق

من هذا يستدل بأن القمة النامية هي الجزء الأفضل لاستحثاث الكالس وقد يعزى السبب إلى كون خلاياها مرستيمية نشطة وكذلك الى محتواها العالي من لأوكسينات الداخلية مقارنة بالأوراق (Taizو Zeiger ،2010)، كما ذكر (دفلن وويذام ، 1998) إن أعلى تراكيز الأوكسين تكون في القمة النامية للنبات، وإن انتشاره وتوزيعه خلال النبات يكون من خلال انتقاله من المناطق المرستيمية لهذا فأن تركيز الأوكسين يتناقص بأستمرار كلما ابتعدنا عن القمة النامية وهذا سينعكس على استجابة القمة النامية وتفوقها على بقية الأجزاء الأخرى في استحثاث الكالس. اتفقت هذه النتائج في الحصول على اعلى استجابة ووزن طري وجاف للكالس المستحث من القمم النامية مع ماتوصل اليه المختار،(2008) عند دراستها على نبات الخشخاش *Papaver somniferum* وكذلك مع Huda واخرون،(2020) عند دراستهم على نبات *Pelargonium graveolens*.

على ضوء نتائج الجداول (19 و 20) فقد تم الاعتماد على القمة النامية كجزء نباتي لاستحثاث وادامة الكالس في تنفيذ تجربة التحفيز اللاحقة.

4- 17- تاثير تراكيز 2,4- D و BA في معدل الوزن الطري للكالس المستحث من القمة النامية.

تبين نتائج الجدول (21) إلى وجود فروق معنوية عند اضافة الـ 2,4-D بتراكيزه المختلفة الى الوسط الغذائي المعد لاستحثاث الكالس من القمم النامية لنبات الحلبة، إذ تفوق الـ2,4- D عند التركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$ وأعطى أعلى معدل وزن طري للكالس بلغ 172.75 ملغم والذي أختلف معنوياً عن بقية المعاملات ثم قلت الاستجابة بزيادة تركيز الاوكسين الى 3 و 4 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي اعطى اقل معدل بلغ (159.97 و 138.32) ملغم على التوالي مقارنة بمعاملة المقارنة التي لم تسجل اي معدل يذكر، وتشير نتائج الجدول نفسه إلى وجود فروق معنوية في معدل وزن الكالس باختلاف تراكيز الـ BA المضافة للوسط الغذائي فقد تفوق التركيز 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ معنويا في تحقيق افضل معدل بلغ 141.60 ملغم مقارنة مع اقل معدل كان عند معاملة المقارنة والذي بلغ 103.44 ملغم. اما عن تاثير التداخل مابين تراكيز الاوكسين والسايتوكانين في معدل الوزن الطري للكالس فقد حقق التركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$-2,4 D عند التركيز 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ اعلى معدل بلغ 210.00 ملغم في حين لم تحقق معاملة المقارنة للاوكسين وعند التراكيز المختلفة من السايتوكانين اي استجابة تذكر.

جدول (21) تاثير تراكيز 2,4- D و BA في معدل الوزن الطري للكالس (ملغم) المستحث من القمة النامية بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS.

تركيز 2,4-D (ملغم.لتر$^{-1}$)	تركيز BA (ملغم.لتر$^{-1}$)				المعدل
	0.0	0.1	0.2	0.4	
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	70.40	160.00	178.00	160.70	142.27
2	140.50	190.00	210.00	150.50	172.75
3	155.80	154.00	180.00	150.10	159.97
4	150.50	122.80	140.00	140.00	138.32
L.S.D(0.05)	23.42				12.15
المعدل	103.44	125.36	141.60	120.26	
L.S.D(0.05)	11.27				

4- 18- تاثير تراكيز 2,4, D و BA في معدل الوزن الجاف للكالس المستحث من القمة النامية.

تشـير البيانات المدونة في الجدول (22) إلى وجود فروق معنوية عند اضـافة الـــ 2,4-D بتراكيزه المختلفة الى الوسط الغذائي MS، إذ تفوق التركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$ وأعطى أعلى معدل وزن جاف للكالس بلغ 15.31 ملغم والذي أختلف معنوياً عن بقية المعاملات مقارنة بمعاملة المقارنة التي لم تسـجل اي معدل يذكر، وتشـير نتائج الجدول نفسه إلى وجود فروق معنوية في معدل الوزن الجاف للكالس باختلاف تراكيز الـ BA المضافة للوسط الغذائي فقد تفوق التركيز 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ معنويا في تحقيق افضـل معدل بلغ 12.22 ملغم ثم قلت الاسـتجابة عند التركيز 0.4 ملغم.لتر$^{-1}$ بلغ 11.02 ملغم والتي لاتختلف معنويا عن التركيز 0.1 ملغم الذي بلغ 11.07 ملغم مقارنـة مع اقل معدل كان عند معاملة المقارنة والذي بلغ 8.44 ملغم. اما عن تاثير التداخل مابين تراكيز الاوكسين والسايتوكانين في معدل الوزن الجاف للكالس فقد حقق التركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$2,4-D عند التركيز 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ اعلى معدل بلغ 18.70 ملغم في حين لم تحقق معاملة المقارنة للاوكسـين وعند التراكيز المختلفة من السـايتوكانين اي اسـتجابة تذكر. على ضوء نتائج الجداول (21 و 22) فقد تم الاعتماد على التركيزين 2 ملغم.لتر$^{-1}$2,4-D و 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ في تنفيذ تجربة التحفيز اللاحقة.

جدول (22) تاثير تراكيز 2,4- D و BA في معدل الوزن الجاف للكالس (ملغم) المستحث من القمة النامية بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS.

تركيز 2,4-D (ملغم.لتر$^{-1}$)	تركيز BA (ملغم.لتر$^{-1}$)				المعدل
	0.0	0.1	0.2	0.4	
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	4.60	13.70	14.20	13.70	11.55
2	11.50	15.50	18.70	15.55	15.31
3	13.10	13.50	15.45	13.10	13.78
4	13.00	12.65	12.78	12.78	12.80
L.S.D(0.05)	0.93				0.46
المعدل	8.44	11.07	12.22	11.02	
L.S.D(0.05)	0.42				

تفسر عملية استحداث الكالس على الجزء النباتي على أساس أن الاجزاء النباتية تمر بتغيرات معينة عند استحداث الكالس مثل التغير في الحجم والتركيب، فضلاً عن الزيادة في بعض العمليات البنائية المهمة، مثل بناء البروتين والحوامض النووية ففي مرحلة التحفيز تحدث تغيرات مهمة وأساسية في الخلايا لتعدها لعملية الانقسام، وتحدث فيها العمليات البنائية مثل بناء البروتين وانقسام الحامض النووي DNA، ومدة انجاز هذه المرحلة يعتمد بصورة رئيسة على عوامل عدة منها نوع النسيج للاجزاء النباتية ، الوسط الغذائي، الظروف البيئية، يتبع هذه المرحلة تغير متتابع في الفعاليات الحيوية لهذه الخلايا تنتهي بانقسامها، وتكوين كتلة من خلايا الكالس تغطي معظم ألاجزاء النباتية (Huda واخرون، 2020). ربما يعزى سبب استحثاث الكالس على سطح الاجزاء النباتية الى دور منظم النمو 2,4-D الذي يشجع تكوين الكالس وزيادة نموه كونه احد الاوكسينات التي لها دورٌ مهمٌ في تكوين ونمو الكالس، وأن زيادة التركيز تؤدي إلى تكوين الكالس وصولا للتركيز الأمثل وإن زيادة التركيز عن الحد الأمثل تؤدي إلى تأثيرات عكسية إذ أن إضافة منظمات النمو للوسط الغذائي تحفز استمرار الانقسام لنسيج الكالس، وان النسيج الخلوي بعد زراعته على الوسط الغذائي سوف يكون قادرا على تأسيس نظام هرموني داخلي، هذا النظام يحدد اتجاه التطور اللاحق بالتداخل مع منظمات النمو المضافة للوسط التي تكون بعد ذلك مسؤولة عن المحافظة على استمرار نشاط الانقسام الخلوي (الحديدي، 2002 و Neumann وآخرون، 2009). وربما يعود سبب نقصان الوزن بزيادة تركيز منظم النمو إلى حدوث حالة توازن ما بين المنظمات المضافة خارجيا مع الهرمونات الداخلية للحصول على أفضل انقسام للخلايا او قد يرجع إلى دور الأوكسين في تحفيز إنتاج غاز الإيثيلين ، مما يقلل من انقسام الخلايا ومعدل النمو (Mur، 1982) ، أو ربما إلى كمية الأوكسين التي تدخل الخلايا وكذلك معدل ايض الأوكسين داخل الأنسجة ، بالإضافة إلى كمية الأوكسين التي تفقدها الخلايا في الوسط (الحاتمي ، 2001).

إن فشل تكوين الكالس عند معاملة المقارنة قد يعود إلى أن محتوى الأجزاء النباتية من الهرمونات النباتية كانت قليلة لا تساعد على استمرارية انقسام الخلايا واستحداث الكالس، وقد يعود سبب تكوين الكالس عند المعاملة المجهزة بالتركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$ و 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ BA إلى حصول حالة توازن هرموني ما بين المنظمات المضافة إلى الوسط مع الهرمونات الداخلية الموجودة داخل الجزء النباتي، وأن هذا المنظم ساعد على بدء انقسام الخلايا في منطقة تلامس الاجزاء النباتية مع الوسط الغذائي، ولاسيما الخارجية منها مع توافر العناصر الغذائية والأوكسجين الذي يساعد على عملية التنفس وتوفير الطاقة اللازمة لعملية الانقسام، إذ تعد هذه العوامل الرئيسة لإستحداث الكالس (Sandoval واخرون،2010 و Park واخرون،2020).

كما اشار العديد من الباحثين الى أهمية التحضين بالظلام ومنهم (Hedden وStephen، 2006و Trigianو 2005, Gray وShlahi واخرون ، 2013) وهذا يعود الى دور الظلام في منع اكسدة بعض المركبات الحساسة للضوء مثل الاوكسينات إذ يعمل الضوء على تنشيط انزيم IAA-Oxidase كذلك إن التحضين في الظلام ربما يؤدي الى تثبيط أكسدة المواد الفينولية بواسطة انزيمات الاكسدة التي يحفزها الضوء ، كما يعتقد بأن تحضين الاجزاء النباتية في الظلام يؤدي الى زيادة رقة الجدران الخلوية وقلة سمكها مما يؤدي الى زيادة نفاذية المواد

لاســـيما منظمات النمو الى داخل الانســـجة المزروعة وبالتالي إســـتجابة هذه الأجزاء لاســـتحثاث الكالس (Trigiano و Gray ، 2005).

اتفقت هذه النتيجة مع ماتوصلت اليه Almukhtar،(2018) عند استحثاث الكالس من القمم النامية لنبات العنب *Vitis Vinifera* L. كما اتفقت مع كل من Altabtabaal واخرون، (2019) وحسين، (2021) الذي اشاروا ان التركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D كان الافضل في معدل الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من نبات الحلبة *Trigonellafoenum-graecumL*. (حسين، 2021).

4- 19- تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل الوزن الطري للكالس.

تبين نتائج الجدول (23) وجود فرق معنوي في معدل الوزن الطري للكالس المزروع على الوسط الغذائي MS المجهز بتركيزثابت 2 ملغم.لتر$^{-1}$ من 2,4-D و 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ من BA، بزيادة تراكيز التربتوفان المضافة للوسط، إذ تفوق التركيز 15 ملغم.لتر$^{-1}$ وأعطى أعلى معدل وزن طري للكالس بلغ 299.49 ملغم والذي أختلف معنوياً عن بقية المعاملات ثم قلت الاستجابة بزيادة تركيز الحامض الاميني الى 20 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي اعطى معدل بلغ 217.34 ملغم، مقارنة بمعاملة المقارنة التي حققت اقل معدل بلغ 143.60 ملغم، كما تشير نتائج الجدول نفسه إلى وجود فروق معنوية في معدل وزن الكالس باختلاف مدد التعرض للاشعة فوق البنفسجية اذ حققت المدة الزمنية 20 دقيقة اعلى معدل بلغ 265.14 ملغم مقارنة مع اقل معدل كان عند معاملة المقارنة والذي بلغ 214.03 ملغم. اما عن تاثير التداخل التداخل الثنائي فقد تفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 10 ملغم.لتر$^{-1}$ تربتوفان عند الدقيقة 20 من الاشعة فوق البنفسجية في تحقيق اعلى معدل للوزن الطري للكالس بلغ 340.00 ملغم مقارنة مع معاملة المقارنة التي اعطت اقل معدل بلغ 100.00 ملغم.

جدول (23)تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل الوزن الطري للكالس (ملغم) بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS.

المدة الزمنية لاشعة UV(دقيقة)	تركيز التربتوفان (ملغم.لتر$^{-1}$)					المعدل
	0	5	10	15	20	
0	100.00	230.00	252.18	275.20	212.80	214.03
10	150.50	266.15	240.00	295.10	218.18	233.98
20	180.30	256.18	340.00	328.17	221.06	265.14
L.S.D(0.05)	38.46					18.13
المعدل	143.60	250.77	277.39	299.49	217.34	
L.S.D(0.05)	20.33					

4- 20- تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل الوزن الجاف للكالس.

تبين نتائج الجدول (24) وجود فرق معنوي في معدل الوزن الجاف للكالس المزروع على الوسط الغذائي MS المجهز بتركيزثابت 2 ملغم.لتر$^{-1}$ من 2,4-D و 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ من BA، بزيادة تراكيز التربتوفان المضافة للوسط، إذ تفوق التركيز 15 ملغم.لتر$^{-1}$ وأعطى أعلى معدل وزن جاف للكالس بلغ 27.23 ملغم والذي أختلف معنوياً عن بقية المعاملات ثم قلت الاستجابة بزيادة تركيز الحامض الاميني الى 20 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي اعطى معدل وزن بلغ 20.96 ملغم، مقارنة بمعاملة المقارنة التي حققت اقل معدل بلغ 13.80 ملغم، كما تشير نتائج الجدول نفسه إلى وجود فروق معنوية في معدل وزن الكالس باختلاف مدد التعرض للاشعة فوق البنفسجية اذ حققت المدة الزمنية 20 دقيقة اعلى معدل بلغ 24.08 ملغم مقارنة مع اقل معدل كان عند معاملة المقارنة والذي بلغ 20.02 ملغم. اما عن تاثير التداخل التداخل الثنائي فقد تفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 15 ملغم.لتر$^{-1}$ تربتوفان عند الدقيقة 20 من الاشعة فوق البنفسجية في تحقيق اعلى معدل للوزن الطري للكالس بلغ 30.00 ملغم مقارنة مع معاملة المقارنة التي اعطت معدل بلغ 10.70.

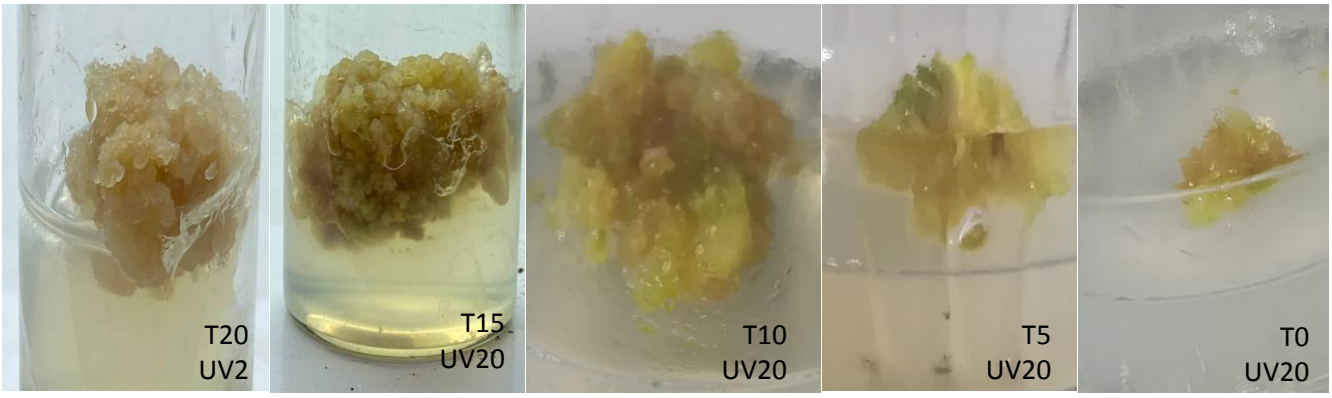
جدول (24)تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل الوزن الجاف للكالس (ملغم) بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS.

المدة الزمنية لاشعة UV(دقيقة)	تركيز التربتوفان (ملغم.لتر$^{-1}$)					المعدل
	0	5	10	15	20	
0	10.70	21.50	22.78	24.50	20.65	20.02
10	13.70	23.85	22.20	27.20	21.08	21.60
20	17.00	22.70	29.59	30.00	21.15	24.08
L.S.D(0.05)	0.06					0.02
المعدل	13.80	22.68	24.85	27.23	20.96	
L.S.D(0.05)	0.04					

استنادا الى ما تقدم عرضه من نتائج الجداول (23 و 24) يلاحظ ان للحامض الاميني التربتوفان تاثيرا معنويا في معدل الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من القمة النامية والمزروع على الوسط الغذائي MS وقد يعزى السبب ان استخدام الاحماض الامينية تؤدي الى انخفاض الجهد الازموزي وبدوره يقلل من الجهد المائي للخلية ومن ثم يزداد قابلية الخلية على سحب الماء والعناصر المغذية من وسط النمو ومن ثم زيادة حجم الخلايا كما تؤدي الى زيادة مدة وعدد الانقسامات الخلوية وتوسيعها (Khalifa واخرون، 2020 و Amini و Ehsanpour ، 2005و Erland و Saxena، 2019)

اوقد يعود الى كونه البادئ المسؤول عن البناء الحيويIAA، اذ توجد في النبات اربعة مسارت حيوية لتصنيعه ثلاثة منها معتمدة على الحامض الاميني التربتوفان ومايثبت الدور المهم لهذا الهرمون وبادئه في نمو وتطور النبات هو هذا التعدد في مسارات التخليق الحيوي IAA، سيما من الحامض الاميني التربتوفان IAA (Khalifa واخرون، 2020).

اتفقت هذه النتيجة مع ماتوصل اليه (Almukhtar، 2018) عند اضافة الحامض الاميني التربتوفان للوسط الغذائي المزروع بكالس نبات الخشخاش *Papaver somniferum*ومع ماتوصلت اليه (حسين، 2021) عند اضافة الحامض الاميني التربتوفان الى مزارع كالس نبات الحلبة *Trigonella foenum graecum* L.



شكل (12) تاثير التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في كالس نبات الحلبة

4- 21- تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل تركيز Trigonelline (مايكروغرام.غم$^{-1}$) في كالس نبات الحلبة .

تشـير البيانات المدرجة في الجدول (25) الى وجود فروق معنوية بين المعاملات في معدل تركيز قلويد الـ Trigonelline بزيادة تراكيز التربتوفان المضافة للوسط الغذائي MS، اذ تفوق التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ في تحقيق اعلى معدل بلغ 239.89 مايكروغرام. غم$^{-1}$ في حين حققت معاملة المقارنة اقل معدل بلغ 85.20 مايكروغرام .غم$^{-1}$، كما كان لاشـعة UV تاثير معنوي في معدل تركيز قلويد الـــــ Trigonelline اذ اعطت معاملة UV عند الدقيقة 20 اعلى معدل بلغ 248.06 مايكروغرام. غم$^{-1}$ثم تلتها معاملة الـــــ 10 دقائق والي بلغت 176.31 مايكروغرام.غم$^{-1}$ واقلها كان عند معاملة المقارنة والتي حققت اقل معدل بلغ 102.90 مايكروغرام.غم$^{-1}$. اما عن تاثير معاملات التداخل فقد تفوق التركيز 15 ملغم.لتر$^{-1}$ تربتوفان عند الدقيقة 20 من اشـــعة UV في تحقيق اعلى معـدل بلغ 308.05 مـايكروغرام.غم$^{-1}$ مقـارنـة مع معـاملـة المقـارنـة التي اعطـت اقـل معـدل بلغ 30.00 مايكروغرام.غم$^{-1}$.

جدول (25) تاثير تراكيز التربتوفان و الاشـــعة فوق البنفســـجية في معدل تركيز قلويد الـــــ Trigonelline (مايكروغرام.غم$^{-1}$) في كالس نبات الحلبة بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS.

المدة الزمنية لاشعة UV(دقيقة)	تركيز التربتوفان (ملغم.لتر$^{-1}$)					المعدل
	0	5	10	15	20	
0	30.00	61.12	96.80	154.16	172.45	102.90
10	67.10	142.15	175.77	235.17	261.38	176.31
20	158.50	218.92	269.00	308.05	285.85	248.06
L.S.D(0.05)	0.07					0.03
المعدل	85.20	140.73	180.52	232.46	239.89	
L.S.D(0.05)	0.04					

4- 22- تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل تركيز Diosgenine (مايكروغرام.غم$^{-1}$) في كالس نبات الحلبة .

وعن تاثير تراكيز التربتوفان واشعة UV في معدل تركيز مركب الـ Diosgenine المقدر في كالس نبات الحلبة المزروعة على الوسط الغذائي MS فقد اشارت البيانات الموضحة في الجدول (26) الى وجود تفوق معنوي بزيادة تراكيز التربتوفان المضافة للوسط الغذائي اذ تفوق التركيز 15 ملغم.لتر$^{-1}$ في تحقيق اعلى معدل تركيز بلغ 190.34 مايكروغرام.غم$^{-1}$ ثم قلت الاستجابة عند التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ محقق معدل بلغ 187.39 مايكروغرام.غم$^{-1}$ ، في حين حققت معاملة المقارنة اقل معدل بلغ 63.89 مايكروغرام.غم$^{-1}$، كما كان لاشعة UV تاثير معنوي في معدل تركيز مركب الـ Diosgenine اذ اعطت معاملة UV بالدقيقة 20 اعلى معدل بلغ 192.21 مايكروغرام.غم$^{-1}$ ثم تلتها معاملة الـ 10 دقائق والي بلغت 147.88 مايكروغرام.غم$^{-1}$ واقلها كان عند معاملة المقارنة والتي حققت اقل معدل بلغ 84.64 مايكروغرام.غم$^{-1}$. اما عن تاثير التداخل فقد تفوق التركيز 15 ملغم.لتر$^{-1}$ تربتوفان عند الدقيقة 20 من اشعة UV في تحقيق اعلى معدل بلغ 254.95 مايكروغرام.غم$^{-1}$ مقارنة مع معاملة المقارنة التي اعطت اقل معدل بلغ 18.75 مايكروغرام.غم$^{-1}$.

جدول (26) تاثير تراكيز التربتوفان و الاشعة فوق البنفسجية في معدل تركيز مركب الـ Diosgenine (مايكروغرام.غم$^{-1}$) بعد 4 اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS.

المدة الزمنية لاشعة UV(دقيقة)	تركيز التربتوفان (ملغم.لتر$^{-1}$)					المعدل
	0	5	10	15	20	
0	18.75	48.05	90.15	114.22	152.03	84.64
10	60.22	116.10	167.08	201.87	185.13	147.88
20	112.71	160.11	208.27	254.95	225.03	192.21
L.S.D(0.05)	0.03					0.01
المعدل	63.89	108.08	155.16	190.34	187.39	
L.S.D(0.05)	0.02					

إستنادا لما سبق عرضة من نتائج الجداول (23 و 24 و25 و26) بشكل عام يظهر هناك تفوق معنوي بتراكيز المركبات الايضية بزيادة تركيز التربتوفان المضاف للوسط الغذائي MS وقد يعزى السبب الى دور الحامض الاميني الذي يؤدي الى تغلب خلايا النبات على النقص الحاصل في التغذية اثناء النمو فضلا عن تزويد النبات بمواد تعمل على زيادة تصنيع بعض المركبات المهمة للنبات والانسان على حد سواء اذ تسهم في تخليق حامض Cinnamic والذي يعد المواد الاولية لتخليق الفينولات والكلايكوسيدات (Salwa واخرون ،2014) ، او قد يعزى السبب الى كون الاحماض الامينية مصدرا للهرمونات النباتية ومواد النمو الاخرى وتعمل على تحسين كفاءة الايض في النبات وتسهيل عملية اخذ المغذيات وانتقالها واستخدامها (Claussen، 2004).

او قد يعزى سبب زيادة المركبات الايضية بزيادة تراكيز التربتوفان الى مايحتويه من نيتروجين،إذ ان زيادة تركيز النتروجين بكميات مناسبة تزيد من كمية المركبات، وكذلك اهميته في تحسين العمليات الحيوية الخاصة بتخليق هذه المركبات عن طريق دوره في زيادة الاحماض الامينية كمواد تدخل في البناء الحيوي للمركبات ، كما ان زيادة الاحماض الامينية تؤدي الى انخفاض الجهد الازموزي فتزداد قابلية الخلية على سحب الماء والمغذيات الذائبة فيه بسبب انخفاض الجهد المائي للخلية (Amini و Ehsanpour،2005).

اتفقت هذه النتائج مع ماتوصل اليه طاهر (2017) عند رش التربتوفان على اوراق نبات الجرجير *Eruca sativa* Mill. وحصل على زيادة معنويه في تركيز المركبات الفينولية والكلايكوسيدت مقارنة مع معاملة المقارنة، ومع حسين،(2021) اذ وجدت هناك تفوق معنوي في معدل تركيزtrigonelline و diosgenin عند اضافة التربتوفان بتراكيز مختلفة الى وسط مزارع كالس نبات الحلبة *TrigonellaFoenum-groecum*L.

كما يتضح مماسبق عرضة في الجداول ذاتها الدور الفاعل للاشعة فوق البنفسجية (UV) في زيادة تركيز المركبات الايضية في النموات الخضرية وكالس نبات الحلبة وربما يعود السبب في ذلك إلى التأثير التحفيزي للأشعة فوق البنفسجية و استنادا إلى حالات عدة تشير إلى انتقال هذا التأثير التنشيطي للإشعاع عبر الأجيال، إضافة إلى إن الجرع التحفيزية للأشعة تعمل على تعطيل عمل بعض الأنزيمات المثبطة لبعض العمليات الحياتية في النبات، ويعتقد أيضا إن ظاهرة التنشيط الإشعاعي تؤدي إلى تغير في الخصائص الفسلجية في السايتوبلازم وهذا مايتسبب زيادة في العمليات الفسلجية والتفاعلات الحياتية فيه (Rukmanskiو Fedin،1969).كما يعتقد أن الأشعة UV تعمل على تحفيز التعبير الجيني مما يؤدى إلى زيادة في تصنيع وتراكم المركبات او قد تعمل هذه الاشعة على تنشيط الانزيمات المرتبطة بتصنيع المركبات الايضية داخل الخلايا، اتفقت هذه النتائج مع ماتوصل اليهFonseca وآخرون (2006) أن معاملة نبات *T. parthenium* L بالأشعة فوق البنفسجية أدت إلى زيادة تركيز Parthenolide بمعدل ثلاثة أضعاف قياسا بالنباتات غير المعاملة. واستثمرت هذه الخاصية في زيادة انتاج نبات عين البزون المزروع خارج الجسم الحي من مركبي Vinblastine وVincristine(Ramani واخرون،2007). كما لوحظ زيادة تراكم صبغة الانثوسيانين في التفاح والورد الشجيري وكان تأثير الأشعة عن طريق زيادة تعبير الجينات المتحكمة للأنزيمات الداخلة في المسالك التصنيعية للانثوسيانين (Mahdavian واخرون، 2008).

5- الاستنتاجات والتوصيات

5-1- الاستنتاجات

في ضوء النتائج التي تم الحصول عليها من الدراسة الحالية يمكن استنتاج مايأتي :-

- حددت طريقة التعقيم بهايبوكلورات الصوديوم بالتركيز 2% ولمدة 15 دقيقة كافضل توليفة لتعقيم بذور نبات الحلبة واستئصال الاجزاء النباتية واعتمادها منطلقا في برنامج تموين مزارع النموات الخضرية واستحثاث الكالس.
- تفوقت العقد معنويا على القمم النامية باستجابتها العالية واعطائها اعلى نسبة استجابة للنمو الخضري في مرحلة النشوء، في حين تفوقت القمة النامية باستجابتها العالية لاستحثاث الكالس مقارنة مع الورقة.
- لوحظ عند إضافة منظمات نمو إلى الوسط الغذائي في الزراعة خارج الجسم الحي،وإيجاد التوازن فيما بينهما وصولا إلى أعلى تأثير ايجابي لتحقيق الهدف المنشود، فقد وجد أن التداخل بين BA وNAA أعطى أعلى معدل في عدد الأفرع الخضرية وعدد الاوراق والوزن طري والجاف، كما وجد ان التداخل بين 2,4-D و BA اعطى اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس.
- وجد ان تعزيز الوسط الغذائي المستعمل في زراعة الأنسجة النباتية بالتربتوفان وبتراكيز مختلفة لدورها في زيادة مؤشرات النمو الخضري والكالس ومركبات الايض الثانوي.
- استنتج للأشعة فوق البنفسجية (UV) دور كبير في تحسين مؤشرات النمو الخضري والكالس والذي انعكس بدوره في محتوى النبات من المركبات الثانوية.

5-2- التوصيات

- ❖ المعاملة بالاشعة فوق البنفسجية وبمدد زمنية اعلى لما لها تاثير في نمو النبات والكالس وانتاج مركبات الايض الثانوي.
- ❖ تعريض كالس والمزارع الخضرية لنبات الحلبة لمدد زمنية اعلى من 20 دقيقة من الاشعة فوق البنفسجية لما لها من تاثير واضح في زيادة انتاج المركبات الايضية .
- ❖ المعاملة بانواع اخرى من المحفزات والبوادئ الكيميائية وبمستويات مختلفة لما لها تاثير فعال في انتاج المركبات الايضية الثانوية.
- ❖ اجراء دراسات موسعة حول تاثير عوامل فيزيائية اخرى مثل المغنطة واشعة كاما والليزر.
- ❖ توظيف تقانة زراعة الانسجة النباتية في زيادة وانتاج مركبات الايض الثانوي واكثار نباتات طبية اخرى يصعب اكثارها بالحقل ومهمة صيدلانيا.
- ❖ دراسة تاثير المطفرات الفيزيائية والكيميائية في محتوى وتراكم المنتجات الايضية الثانوية في نسيج الكالس او النموات الخضرية لنبات الحلبة.

6- المصادر

6-1- المصادر العربية

- ابراهيم ،انتصار رزاق. 2017. الاكثار الدقيق وانتاج بعض المركبات الكيميائية لنبات شجرة الحياة *Moringa oleifera* Lam. خارج الجسم الحي. أطروحة دكتوراه - كلية الزراعة - جامعة بغداد .
- ابراهيم، كاظم محمد. 2017. تطبيقات في التقانات الاحيائيه. جامعة النهرين، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، بغداد - العراق.
- أبو ضاحي، يوسف محمد واليونس، مؤيد أحمد. 1988. دليل تغذية النبات. جامعة بغداد. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق.
- أحمد، رضية علي حسن .2013.الاكثار الدقيق لثلاثة اصناف من الشليك (*Fragaria ananassa*،Duch) مع تحديد الثبات الوراثي باستخدام مؤشرات الدنا الجزيئية، رسالة ماجستير، كلية الزراعة – جامعة بغداد.
- البرزنجي، أقبال محمد غريب طاهر. 2007. تأثير الأشعة فوق البنفسجية والتيار الكهربائي والتربتوفان في النمو والحاصل والقابلية الخزنية للبطاطا .*Solanum tuberosum* L صنف ديزري. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد – العراق.
- الجابر، حيدر صبيح شنو. 2008. أستجابة نبات الحلبة لموعد الزراعة ونقع البذور وتاثيرهما في النمو وحاصل البذور وبعض مكوناته الفعالة. رسالة ماجستير، كلية البصرة. جامعة البصرة- العراق.
- جندية، حسن .2003. فسيولوجيا أشجار الفاكهة (احدث الطرائق في علاج مشاكل الزراعة والتربية والإنتاج لأشجار الفاكهة في الأراضي المختلفة) - الدار العربية للنشر والتوزيع - القاهرة - مصر.
- الحاتمي، كريم طالب. 2001. استجابة اربعة هجن من الطماطة لتحمل الاجهادا لملحي باستخدام تقنية زراعة الانسجة النباتية، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الكوفة - العراق.
- الحجيمي، احسان جالي اذبيب. 2010. استعمال تقنية زراعة الانسجة في انتاج الفنكرستين والفنبلاستين في كالس نبات عين البزون.*Catharanthus roseus* L المتحمل للاجهاد الملحي، رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة الكوفة - العراق.
- الحديدي، محمد علي حسين 2002. تجارب في زراعة الأنسجة. دار الفكر للطباعة والنشر والتوزيع، عمان، الأردن.
- حسين، نور حسن علي . 2021. تاثير Tryptophan والاجهاد المائي في استحثاث وانتاج Diosgenine و Trigonelline في كالس .*Trigonella foenum graecum* L ، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بابل.

- حمزة، عمرعصام خضير .2020. تأثير بعض منظمات النمو ونوع الجزء النباتي في تحفيز وانتاج مركبات الأيض الثانوي في كالس نبات القرع الطبي *Cucurbita pepo*L. var styriaca، رسالة ماجستير، كلية الزراعة. جامعة الانبار – العراق.
- حمود، علي خلف .2017. تأثيرالبنزل ادنين وحامض السالسليك في إنتاج بعض المركبات الفعالة لنبات سم الفراخ .*Withania somnifera* L داخل وخارج الجسم الحي، أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة. جامعة بغداد – العراق.
- حميداوي، حوراء كاظم عنيد. 2016. تأثير الطيف الضوئي وبعض منظمات النمو في الاكثار الدقيق للجيربرا *Gerbera jamesonii Bolus* خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير. كلية الزراعة، جامعة بغداد. العراق.
- خضر، سهام .2007. معجم الاعشاب والنباتات الطبية، مجموعة النيل العربية، الطبعة الاولى، مصر.
- الخفاجي، مكي علوان. 2014. منظمات النمو النباتية - تطبيقاتها واستعمالاتها البستنية - وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - كلية الزراعة - جامعة بغداد.
- دفلن، م، روبرت وفرنسيس، هـ. ويذام. 1998. فسيولوجيا النبات، ترجمة (شراقي ، محمد محمود وخضر، عبد الهادي وسلامة علي سعد الدين وكامل ، نادية)، الدار العربية للنشر والتوزيع، الطبعة الثانية، 673-671.
- الرفاعي، عبد الرحمن توفيق وسمير عبد الرزاق الشوبكي. 2002. تقنيات القرن 21 لتحسين النبات باستخدام زراعة الانسجة. دار الفكر العربي للطباعة والنشر، الطبعة الاولى، القاهرة- مصر.
- الساهوكي، مدحت ووهيب و كريمة احمد. 1990 تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - العراق.
- شاكر، نوريحي منير. 2016. تأثير الأسمدة العضوية في نمو وإنتاج الصبار .*Aloe vera* L ومحتواه من مركبات الأيض الثانوي، رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامة بغداد.
- شكري ، وفاء محمد و ريم محمد ، المعيقلد. 2013. زراعة الخلايا والأنسجة النباتية. مكتبة المتنبي . الدمام – المملكة العربية السعودية .
- طـاهر،محمـد صبـاح. 2017. تأثير حامض التربتوفان والسماد النتروجيني في نمو وإنتاج نبات الجرجيرومحتوى الاوراق منبعض المركبات الفينولية. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة –جامعة بغداد.
- عبد الحسين، طيف ماجد وسعد علي والجبوري .2013. استجابة نبات الحلبة *Trigonella foenum graecum* .L لمعدلات البذار و مستويات مختلفة من السماد النتروجيني وتأثيرها على المادة الفعالة،مجلة الفرات للعلوم الزراعية ،المجلد4 ،العدد5.
- عبد الله ، ميساء عصام .2011. دراسة فعالية المضاد البكتيري لمستخلص بذور الحلبة ، المجلة العراقية لبحوث السوق و حماية المستهلك – جامعة بغداد ، المجلد3، العدد 6.

- عبدول، كريم صالح. (1987). منظمات النموالنباتية. الجزءالاول. جامعة صلاح الدين. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق.
- العبيدي، ميساء حامد أحمد. 2014. تأثير بعض المحفزات في إنتاج بعض المركبات الثانوية لنبات الترنجان *Melissa officinalis* L. خارج الجسم الحي، رسالة ماجستير. جامعة بغداد – العراق.
- العطار، إستبرق سامي عباس .2012. تحفيز إنتاج بعض مركبات الايض الثانوي ذات الاهمية الطبية في نبات الحلبة *Trigonella foenum- graecum* L.خارج الجسم الحي، رسالة ماجستير.علوم حياة. جامعة المستنصرية – العراق.
- علي، وسام جاسم محمد .2018. تأثير استخدام مستويات مختلفة من بذور الحلبة في علائق الماعز الشامي على إنتاج الحليب ومكوناته ونمو المواليد، مجلة زراعة الرافدين، المجلد 46، العدد 2.
- المختار، سراب عبد الهادي .2008 . أنتاج بعض القلويدات المورفينية من نبات الخشخاش *Papaver somniferum* L. خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير - كلية الزراعة - جامعة بغداد .
- المهداوي، مثنى محمد إبراهيم. 2013. التلاعب الوراثي والكهربائي لنباتات الحلبة مع عزل الدايوسجنين والترايكونيلين من المزارع النسيجية المختلفة، أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة والغابات. جامعة الموصل – العراق.
- الموسوي، زينب جـارالله نعمة. 2017. تأثير بعض العوامل الفيزيائية والكيميائية في إنتاج المواد الثانوية من نبات *Tanacetum parthenium* L. المزروع حقلياً ومختبرياً. اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد.
- النعيمي ، جبار حسن .2010.العلاج باشجار وشجيرات الفاكهة والغابات .دار الحوراء. بغداد. العراق. ع .ص.541.
- ياسين، بسام طه .2001. " أساسيات فسيولوجيا النبات " . جامعة قطر، كلية العلوم، الدوحة ـ قطر ـ مطابع دارالشرق.

6-2- المصادر الاجنبية

- Abbas, I.S. 2012. Effect of jasmonic acid in the production of some secondary metabolites in the ex vivo calculus of *Trigonella foenum-graecum L. Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 23 (7).
- Ahmed, M.A.; A. Mawla and H.E.H. Osman .2011. Elicitation of Trigonelline and 4-hydroxyisoleucine with hypoglycemic activity in cell suspension cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. The open Conference Proceeding J., 2: 80-87.
- AI-Hakemi, A.A.N.2002. Isolation of Trigonelline from Iraqi Fenugreek seeds and studying its effects on blood glucose level and lipid profile in normal and alloxnan diabetic rabbits. M. Sc. Thesis. College of Pharmacy. Univ. of Bagjdad.
- Aitken, G. R.; Henderson, J. R., Chang, S. C., McNeiL, C. J., and Birch-Machin, M. A. 2007. Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes. Clinical and experimenta dermato. 32(6), 722-727.
- Al- Khayri, J. M. and Al- Bahrany, A. M. 2001. In vitro micropropagation of (Citrus aurontifolia Lime). Current Sci., (9):1242-1246.
- Almukhtar, S.A. 2018. Influence of polyethylene glycol and tyrosine on morphine alkaloids production from callus of *Papaver somniferum* in vitro. J. Pharm. Sci. & Res. Vol. 10(2), 282-287.
- Almukhtar, S.A. and A. A. Muslim. 2019. Effect of growth regulator in micropropagation of *Catharanthus roses* in vitro. IOP Conference. Series Journal of physics: Conf.Series 1294(2019)092031.
- Altabtabaal, T. A.; Basheer. A. A. and I. S. Abbas. 2019. HPLC ANALYSIS OF Trigonelline and Diosgenin in the Callus ofFenugreek *Trigonella foenum Graecum* L. Seeds.
- Amini, F. andA.A. Ehsanpour.2005. Soluble Proteins, Proline, Carbohydrates and Na+\ K+ Changes in Tow Tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) Cultivars under in vitro Salt Stress. Am. J. of Biochemistry and Biotechn. 1(4):204 – 208.

- Aniszewski, T. 2015. Alkaloids, Chemistry, Biology, Ecology, and Applications. Second edition. Amsterdam, Netherlands. PP 481.
- Asma, G. O. 2017. Investigation on the Effects of UV Radiation on Physiological Characteristics of *Moringa oleifera* L am. in vitro and in situ, Oraibi; BJI, 19(4): 1-8.
- Aurelia, S.; J.Lusarkiewicz; P.Aleksandro and K. Zygmunt. 2007. Influence of cultivar, explants source on in vitro growth of *Cannabis sativa* L. Plant Genet, 47:145- 151.
- Baldi, B.G; B. Maher; J. Slovin and J. Cohen .1991. Stable isotope labeling, in Vivo, of d- and L-tryptophan pools in Lemnagibba and the low incorporation of label into Indole-3-acetic acid. Plant Physiol. 95(4):1203–1208.
- Ballare, C.L.; P.W. Barnes; S.D. Flint and S. Price. 1995. Inhibition of hypocotyl elongation by ultraviolet-B radiation in de-etiolating tomato seedlings. I. The photoreceptor. Physiol. Plant. 93:584-592.
- Carmila, R.C. and J. C. Cardoso. 2018. Effect of plant extracts and sodium hypochlorite on lettuce germination and inhibition of *Cercospora longissima* in vitro. Scientia Horticulturae. Vol.234, pp: 245-249.
- Casati, P. and V. Walbot. 2004. Rapid transcriptome responses of maize (Zea mays) to UV-B in irradiated and shielded tissues. Genome Biology (5):R16.
- Chaudhary, S.; Chaudhary, P. S.; Chikara, S. K.; Sharma, M. C. and Iriti, M. 2018. Review on fenugreek *Trigonella foenum-graecum* L. and its important secondary metabolite diosgenin. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 46(1):22-31.
- Chhibba, I. M.; Nayyar, V. K. and Kanwar, J. S. 2007. Influence of mode and source of applied Iran of fenugreek in a typical ustochrept in Punjab, Int. J. Agric. Biol., 19:254-256.
- Christen, P. 2002. *Trigonella* species: In vitro cultre and production of secondary metabolites. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 51 Medicinal and

Aromatic Plants XII (Ed. By T .Nagata and Y. Fbizuka) Springer – Verlag Berlin Heidelberg.

- Claussen, W. 2004. Proline as a measure of stress tomato plants .Plant science 168 p 241 248.Avilable online at www. Science direct. Com.
- Delloloio, R. 2007. Cytokininus determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. Curr. Biol., 17: 678-682.
- Devasena, T. and Menon, V. P.2003. Fenugreek affects the activity of β-glucuronidase and mucinase in the colon, Phytother. Res, 9:1088-1091.
- Devlin. R.M. and F.H. Withman 1983 .plant physiology 4th .ed. Wadsworth publishing company. Belmont California.
- Erland, L. A.E. and Saxena, P. 2019. Auxin driven indoleamine biosynthesis and the role of tryptophan as an inductive signal in *Hypericum perforatum* L. PloS one, 14(10): e0223878.
- Facchini, PJ; A.D. Bird and B. St-Pierre. 2004. Can Arabidopsis make complex alkaloids? Trends Plant Sci 9: 116-112.
- Fonseca, J. M., Rushing, J. W., Rajapakse, N. C., Thomas, R. L., & RiLey, M. B.2006. Potential implications of medicinal plant production in controlled environments: the case of feverfew *Tanacetum parthenium*L. Hort Science, 41(3), 531-535.
- Frohnmeyer H, Staiger D.2003.Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. Plant Physiol. 133:1420-1428.
- George, E. F., Hall, M. A. and Klerk, G. D. 2008. Plant propagation by tissueculture 3rd edition. Published by spring. pp: 1- 479.
- Georgiev, M. I., J. Weber and A. Maciuk. 2009. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. Applied microbiology and biotechnology, 83(5): 809-823.
- Gerhardt, K.E.; M.I. Wolson and B.M. Greenberg. 1999. Tryptophan photolysis leads to UV-B induced 66kDa photoproduct of ribulose-1, 5-bisphosphate

carboxylase /oxygenase (Rubisco) in vitro and in vivo. Photochemistry and Photobiology. 70 (1): 49-56.

- Ghule, A. E, S. S. Jadhav and S. L. Bodhanker. 2012. Trigonelline ameliorates
- Goodwin, T.W. 1976. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment.2nd Academic. Press. Landon, New Yourk. San Francisco: 373.
- Goyal. A. 2011. Plant Physiology & Bio Chemistry. Think Tanks, Biyani Group of Colleges. Jaipur. pp 146.
- Gupta, S. and Y.Ibarakl. 2006. Plant Tissue Culture Engineering. Vol.6.The Background. Springer. 469 pages.
- Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine 27; 1–93.
- Haberer, G. and J. J. Kieber .2002. Cytokinins. New Insights into a Classic Phytohormone. Plant Physiology. 128: 354-362.
- Hader, D.P.Kumar, H.D.Smith, R.C.and Worrest, R.C.2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. Photochemical and Photobiological Sci. 6(3), 267-285.
- Hajnos ML, Zobel AM, Glowniak Kl. 2001.Phytomedicine; 8:139.
- Hamza, N; B. Berke ; C. cheze ; R. Le Garrec ; A. umar ; A. N. Agli ; R. Lassalle; J. Jove, H. Gin, N. Moore. 2012. prereutive and curative effect of *Trigonella feonum gracum* L. seeds in C57B/61 models of type 2 diabetes induced by high-fat diet. J. Ethnopharmacol, 142: 516-522.
- Havlin, J.L.; J.D. Beaton; S.L. Tsdale and W.L. Nelson. 2005. Soilfertility and fertilizer. 7th edt. Upper Saddle River, New Jersey.
- Hedden.P and G. Stephen. 2006. Plant Hormone signaling.
- Herbert, D.P.; J. Philips and R.E.Stange. 1971. Method in microbiology. Narri,J.R. and D.W.Robbin (eds.). Acad. Press., London, New York, chap.3, pp.513.

- Holley, S.R.; R.D. Yalamanchili; D.S. Moura; C.A. Ryan and J.W. Stratmann. 2003. Convergence of signaling pathways induced by systemin, oligosaccharide elicitors, and ultraviolet-B radiation at the level of mitogen-activated protein kinases in Lycopersicon peruvianum suspension cultured cells. Plant Physiol. 132: 1728-1738.
- Hopkins, W. G. and N.P. Huner. 2009. Introduction to Plant physiology. Fourth Edition. John Wiley and Sons, Inc.
- 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 Volume, 166, Issue 6, P. 1443-1449.
- Huda, M. F.; Indriyani, S. and Widoretno, W. 2020. Effect of Benzyl Adenine Concentration on Callus Induction of Geranium Plants *Pelargonium graveolens* L.'Her from tips and Leaf Explants. The Journal of Experimental Life Science, 10(1): 20-23.
- Hussain, A., I. A. Qarshi, H. Nazir and I. Ullah. 2012. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. Recent advances in plant in vitro culture, 1-28.
- J. Raju and R.P.Bird; et al. 2006. "Alleviation of hepatic steatosis accompanied by modulation of plasma and liver TNF-alpha levels by *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seed in Zucker obese (fa/fa) rats". International Journal of Obesity. 30(8):1298-1307.
- Jala, A. 2012. Effects of NAA, BA and Sucrose on Shoot Induction and Rapid Micropropagation by Trimming Shoot of *Curcuma Longa* L. Int. Trans. J. Eng. Manag. Sci. and Tech. 3(2): 101-109.
- Kaviarasan ,S., Ramamurty, N., Gunasekaran. P., Varalakshmi, E., and Anuradha, C.V. Fenugreek. 2006. "Fenugreek *Trigonella foenum graecum* L. seed extract prevents ethanol-induced toxicity and apoptosis in chang liver cells". *Alcohol Alcohol*. 41 (3):267-273.

- Khalifa, Y. A.; El-Naem, A.; Gamal, F. and Mahmoud, M. A. 2020. Effect of Tryptophan and Ascorbic Acid on Yield and Some Chemical Constituents of Lupine *Lupines termis* L. Plants. Egyptian Journal of Agronomy, 42(1): 47-61.
- Kokubo, Y. ;Nishizaka, M. ; Ube, N. ; Yabuta, Y. ; Tebayashi, S. I.; Ueno, K., ... and Ishihara, A. 2017. Distribution of the tryptophan pathway-derived defensive secondary metabolites gramine and benzoxazinones in Poaceae. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 81(3): 431-440.
- Korogodin,H. ; M. Korogodina; A. Myasnik and R. Sokurova.1969. Radiation induced damages to cells. Stud. Biophys. 15-16: 127-144.
- Kumar, D.P.; A. Chaturvedi; M. Sreedhar; M. Aparna and P. Venu-Babu. (2013). Physiological responses of Lactuca sativa to gamma irradiation. Asian J. Plant Sci. Res. 3(1), 54-68.
- Kumar, N. and M. P. Reddy. 2011. In vitro plant propagation: a review. Journal of forest and environmental science, 27(2): 61-72.
- Kummar, S. and Singh, M. P. 2009. Plant Tissue Cultures. Published by S.B. Nangla for APH Publishing Corporation, New Delhi, India, P: 10.
- Luis JC, Perez RM, GonzaLez FV. Food Chem 2007; 101:1211.
- Maeda, H. and Dudareva, N. 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. Annual review of plant biology, 63:73 105.
- Mahdavian, K., Ghorbanli, M., & KALANTARI, K. M. 2008. The Effects of Ultraviolet Radiation on the Contents of Chlorophyll, Flavonoid, Anthocyanin and Proline in *Capsicum annuum* L. Turkish J. of Botany, 32(1), 25-33.
- Makai, P. S.; Makai, S. and Kismanyoky, A. 2004. Comparative test of fenugreek *Trigonella foenum-graecum* L. varieties. J. of Central European Agric., 5 (4):259-262.
- Mano, Y.And K. Nemoto. 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. Exp Bot. 2012 May; 63(8):2853-72.

- Mazid, M. K.; T. A. Khan and F. Mohammad. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Biology and Medicine. 3 (2): 232-249.
- Mello,J. P. F. D. 2015. Amino Acids in Higher Plants. Formerly of SAC, University of Edinburgh King's Buildings Campus, Edinburgh, UK. pp 633. Methods. 157-160.
- Mohamad, N. M.; Pournamdari, F. Sharififar, and M. Ansari. 2020. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Trigonelline, Diosgenin and Nicotinic Acid in Dosage Forms Prepared from Fenugreek Seed Extract.
- Monokesh, K.; M.H. Jamal and N. shamima. 2013. Sterilization factors affect seed germination and proliferation of *Achyranthes aspera* cultured in vitro. Environmental and Experimental Biology. Vol.3, N. 11, PP: 119-123.
- Mulabagal, V. and H. S. Tsay. 2004. Plant Cell Cultures: An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. International Journal of Applied Sciences and Engineering, 2(1): 29-48.
- Mur, S. T. 1982. Plants Hormones, it's Physiology and its Biochemistry, Ministry of Higher Education and Scientific Research, University of Mosul.
- Murashige, T.and F.Skooge.1962.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. PhysioL. Plant. 15:473-497.
- Nathiya, S., Durga, M., and Devasena, T. 2014. Therapeutic role of *Trigonella foenum-grraecum*L. [fenugreek] – a review. Lnt. J.Pharm. Scl. Rev.Res, 27(2), 74 – 80.
- Neumann, K.H.; A. Kumar and J. Imani .2009. PLant Cell and Tissue Culture. A tool in Biotechnology, Basic and Application, Springer .p: 181-225.
- Paek, K.; H. Murthy and J. Zhong. 2014. Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology. Springer publishers, New York.

- Park, J. S.; Seong, Z. K.; Kim, M. S.; Ha, J. H.; Moon, K. B.; Lee, H. J. and Kim, H. S. 2020. Production of Flavonoids in Callus Cultures of Sophora flavescens Aiton. Plants, 9(6):688.
- Park, S.U.; M.R.Uddin; H.Xu; Y.K.Kim and S.Y.Lee. 2008. Biotechnology applications for rosmarinic acid production in plant. African jornal of biotechnology, Vol. 7(25), pp: 4959- 4965.
- Perez-Alonso, N.; D. Wilken; A. Gerth; A. Jahn and G. Kerns. 2009. Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. Cultured in temporary immersion systems. Plant Cell Tissue. Organ Culture. 99:151–156.
- Peteropoulos, G. A. 2002. Fenugreek-the Genus Trigonella, PP: 1- 127. 1st Ed.Taylor and Francis group, London and New York.
- Pickens, L. B.; Y. Tang and Y. H. Chooi. 2011. Metabolic engineering for the production of natural products. Annual review of chemical and biomolecular engineering, 2: 211-236.
- Piri, E.; Babaeian, M., TavassoLi, A., & Esmaeilian, Y. 2011. Effects of UV irradiation on plants. African J. of Microbiology Research, 5(14), 1710-1716. acuminata seedlings. Acta Ecol. Sin., 24: 869-875.
- Ramani S; Chelliah J. BMC Plant Biol 2007; 7:61.
- Ramawat, K. G. 2004. Plant Biotechnology. S. Chand and Company LTD, Ram Nagar, New Delhi. India. Pp: 50-62.
- Ramawat, K.G. and J.M.Merillon. 2008. Bioactive molecules and medicinal plants. Springer- verlag. Berlin.
- Rani, G. and Grover, I.S. 1999 .In vitro callus induction and plant regeneration studies in Withania somnifera .Plant Cell Tissue and Organ culture. 57:23-27.
- Rani, G.;Virk,G.S.and Nagpal,A. 2003 .Callus induction and plant let regenerationin. In vitro Cellular and developmental Biology – plant. 39:468-474.
- Rukmanski, G. and P.Fedin. 1969. Radiation and plant. Iz sveto na rastenia, zimizdat, Sofia.

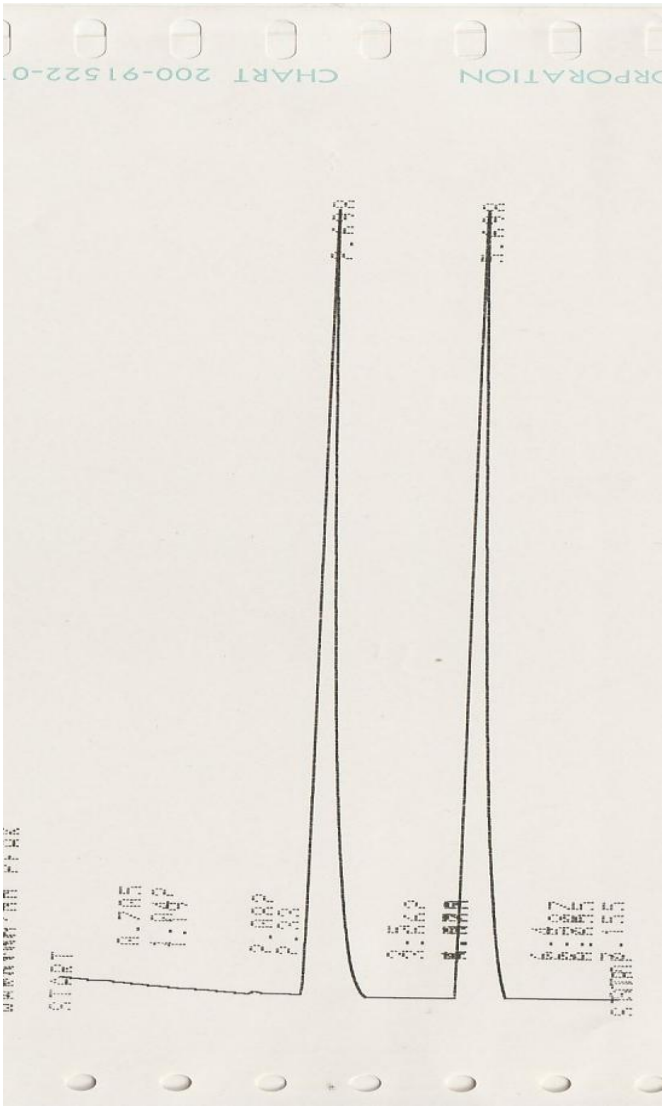
- Saewan, N., and Jimtaisong, A. 2013. Photoprotection of naturaL flavonoids. 3 41–129 :(9). doi:10.7324/JAPS.2013.3923.
- Salwa, A. O; M. T. Iman and K. B. Laila.2014. Physiological and biochemical responses of thyme plants to some Antioxidants. Botany Department, National Research Centre, Giza, Egypt. Vol. 6, No. 2, pp. 118-125.
- Sandoval, F., Méndez, C., and Cardador, A. 2010. Preliminary study of the indican production in tissue cultures of Indigofera suffruticosa mill. E-gnosis, 8: 1-7.
- Sangwan R S , Chaurasiya N D , Lalp , Misra L , Uniyal GC, Tuli R and Sangwan NS .2007.withanolid A biogeneration in in vitro shoot cnltures of Ashwaghanda *withania somnifera* L. a main mdicinal plant in AurveA,Chem pharvm Bull.55 , 1371.
- Sarin,R. 2005.Useful metabolites from plant tissue culture. Biotechnology, 4(2):79-93.
- Sateesh, M.K. 2003. Biotechnology-5. New Age International Publishers.
- Schmulling, T. 2004. Cytokinins in Encyclopedia of Biological Chemistry. Academic Press/ Elsevier Science.
- Servpro. 2010. Effect of Amino Acids on Plants. Malaysio http://www.servpro.com.my/folio intro.pdf.
- Shafeek, M. R.; Y. I. Helmy, Magda, A. F. Shalaby and N. M. Omer. 2012. Response of onion plants to foliar application of sources and levels of some amino acid under sandy soil conditions. Journal of Applied Sciences Research 8(11): 5521-5527.
- Shailajan, S.; Sayed, N.; Menon, S.; Singh, A. and Mhatre, M. (2011). A validated RP-HPLC method for quantitation of trigonelline from herbal formulations containing *Trigonella foenum-graecum* L. seeds. Pharmaceutical methods, 2(3): 157-160.

- 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. Plantarum. 51: 161–164.
- Shlahi, S. A.; D. M. Majeed and S. M. Hasan .2013. in vitro propagaton of Gerbara . Biot. Rose. Center. 7 (1): 50- 58.
- Siddique, N.A., Bari, M.A., Shahnewaz, S., Rahman, M.H., Hasan, M.R., Khan, M.S.I. & Islam, M.S. 2004. Plant regeneration of *Withania somnifera* L. (Ashwaghanda) from nodal segments derived callus an endangered medicinal plant in Bangladesh. Journal of Biological Sciences. 4:219-223.
- Sivanesan, I. 2007. Direct regeneration from apical bud explants of *Withania somnifera* L. Indian Journal of Biotechnology, 6: 125-127.
- Smith, R.H. 2000. Plant tissue culture and experiments academic press. Inc. San Diego.
- Srinivasan, K .2005. Plant foods in the management of diabetesMellitus: Spices as beneficial ant diabetic food adjuncts. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 56(6):399-414.
- Sunita, S., M. Sasikumar, S. Ashish, M. Maudar and S. Neelam. 2011. Avalidated Rp- HPLC Method for quantitation of trigoneline from Herbad.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2006. Plant Physiology 4th. Sinaure Assciates, Inc. Publishers. Sunderland.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2010. Plant physiology. 4th. ed. Sinauer Associates, Inc. publisher Sunderland, Massachus- AHS. U.S.A.
- Trigiano, R. N. and D. J. Gray. 2005. Plant Development and Biotechnology. CRC. Press. Inc- PP. 11-71.
- Trigiano, R.N. and D .J. Gray. (1996). Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC. Press. Inc-PP. 11-17.

- Umamaheswari,A. and V. Lalitha. 2007. In vitro effect of various growth hormones in *Capsicum annum* L. on the callus induction and production of capsaicin. J. of Plant Science 2(5): 545-551.
- Valizadeh, J. M. 2011. Development of efficient micropropagation protocol for Withania coagulance (Stocks) Dunal. Afican Journal of Biotechnology, 10(39): 7611-7616.
- Valizadeh, J., M. 2009. Callus induction and plant regeneration from :Avaluable medicinal Plant. 12:1415-1419.
- Verma, M. and Bansal, X. K. 2014. Effect of apotent Cytokinim Thidiazuron (TDZ) on in viro Regenreation of Hydychium coronarium J. Koeming-Avaluable Medicinal Plant. Int. J. Rec. Biotech. 2(1): 28-44.
- Vijayasree, V. (2010). Advancements in the production of secondary metabolites. Journal of Natural Products, 3.
- Vos, J. 1995. The effects of nitrogen supply and stem density on leaf attributers and stem branching in potato *Solanum tuberosum* L. Potato Res. 38(3): 271-279.
- Wakhlu, A.S;B. Bhau. 2000. Callus formation and Plant regeneration from tubercles of *Coryphantha eleplantidens* L. In Vitro Cellular and Development Biology- Plang , Volume 36, N.3, PP. 211-214(4) .
- Weaver, R. 2013. Molecular Biology. 5th edition. Oxford, England.Pp 914.
- Yong, J.; Z.C.Gong and X.Tan. 2008. Induction of callus and extraction of alkaloid from *Leonurus heterophylus* L. Culture. African Jornal of Biotechnology. Vol.7(8).pp.1157-1162.
- Younesikelaki, F.D.; M.H. Ebrahim and M.K.Desfardi.2016. Optimization of seed surface sterilization method and in vitro seed germination in *Althaea oicinalis* L. An important medicinal herp. Indian Journal of Science and Technology, Vol.9 (28), pp. 328-331.
- Zhou, W.; ZCheng; M.Fan and L.Wang. 2013. JAV1 ControLs Jasmonate-Regulated Plant Defense, Molecular Cell, Vol.50, Issue 4, PP: 515- 23.

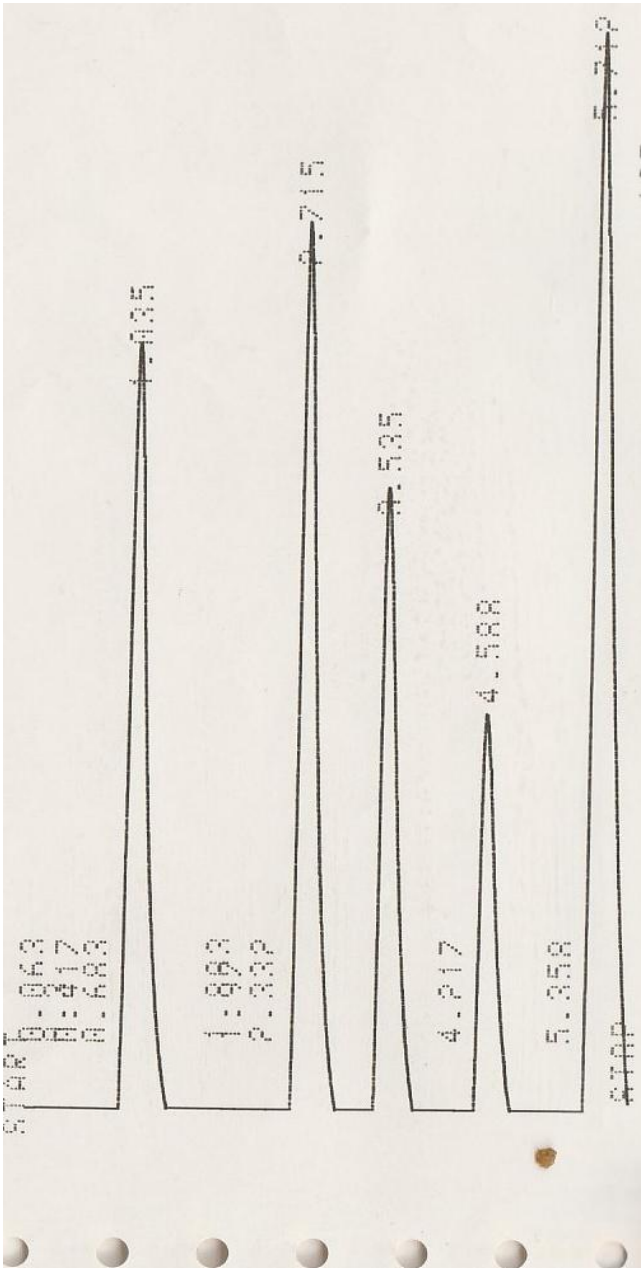
- Zlatev, Z. S.; Lidon, F. J. and Kaimakanova, M. 2012. Plant physiological responses to UV-B radiation. Emirates J. of Food and Agriculture, 24(6), 481.

7- الملاحق



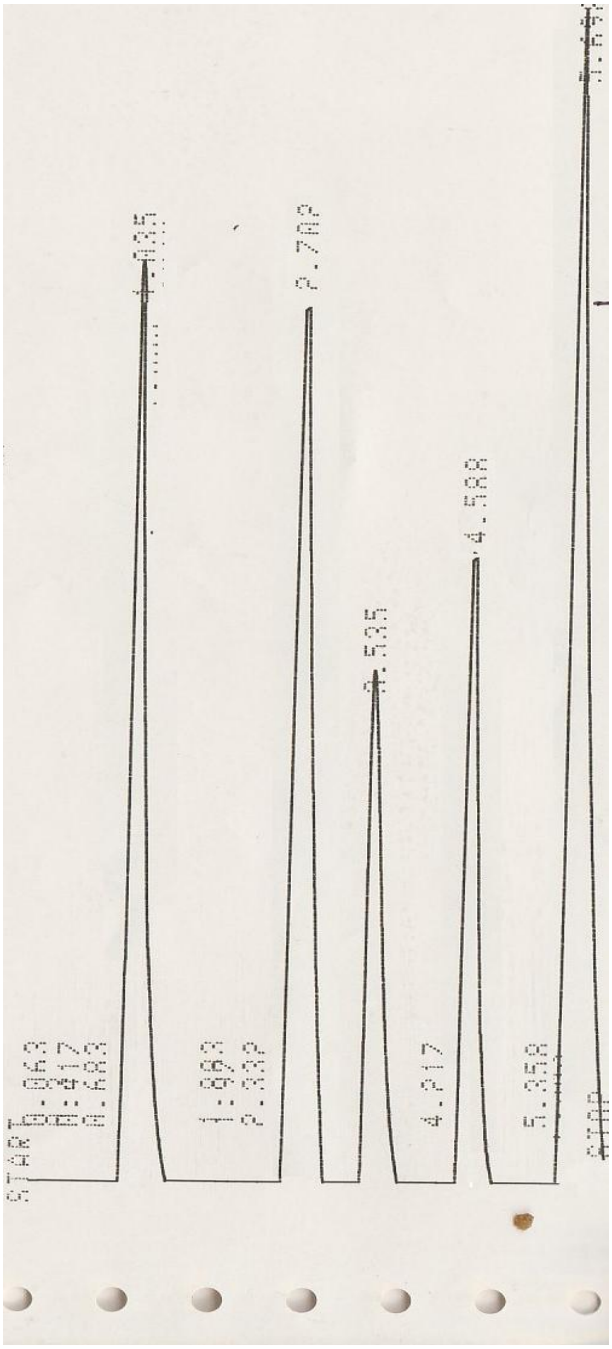
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (1) المحاليل القياسية للكلايكوسيد الصابوني Diosgenine وقلويد Trigonelline



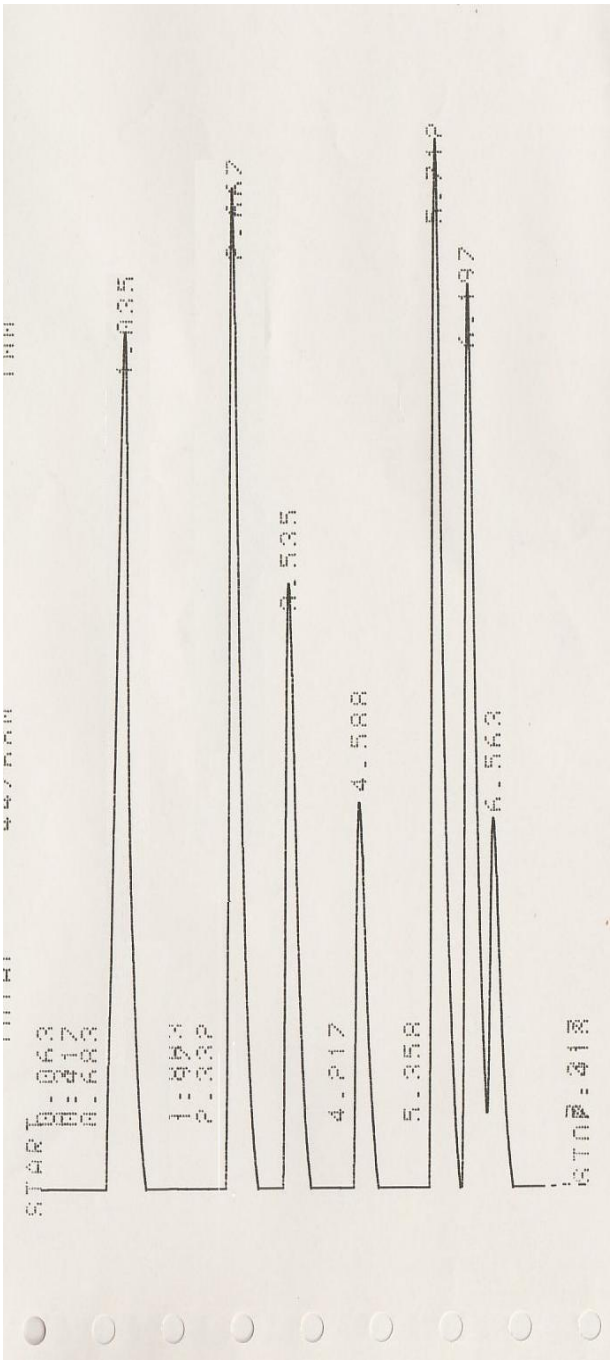
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (2) تاثير التربتوفان بتركيز5 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



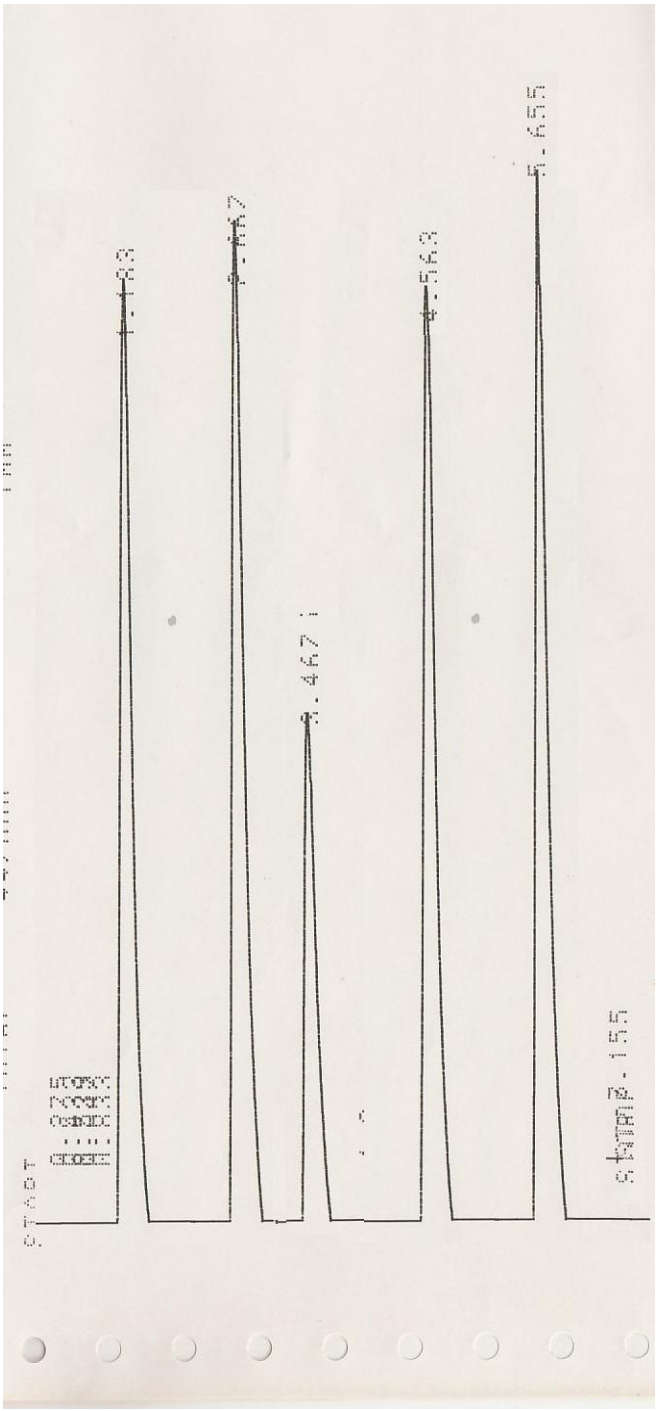
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (3) تاثير التربتوفان بتركيز15 ملغم.لتر$^{-1}$ و اشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



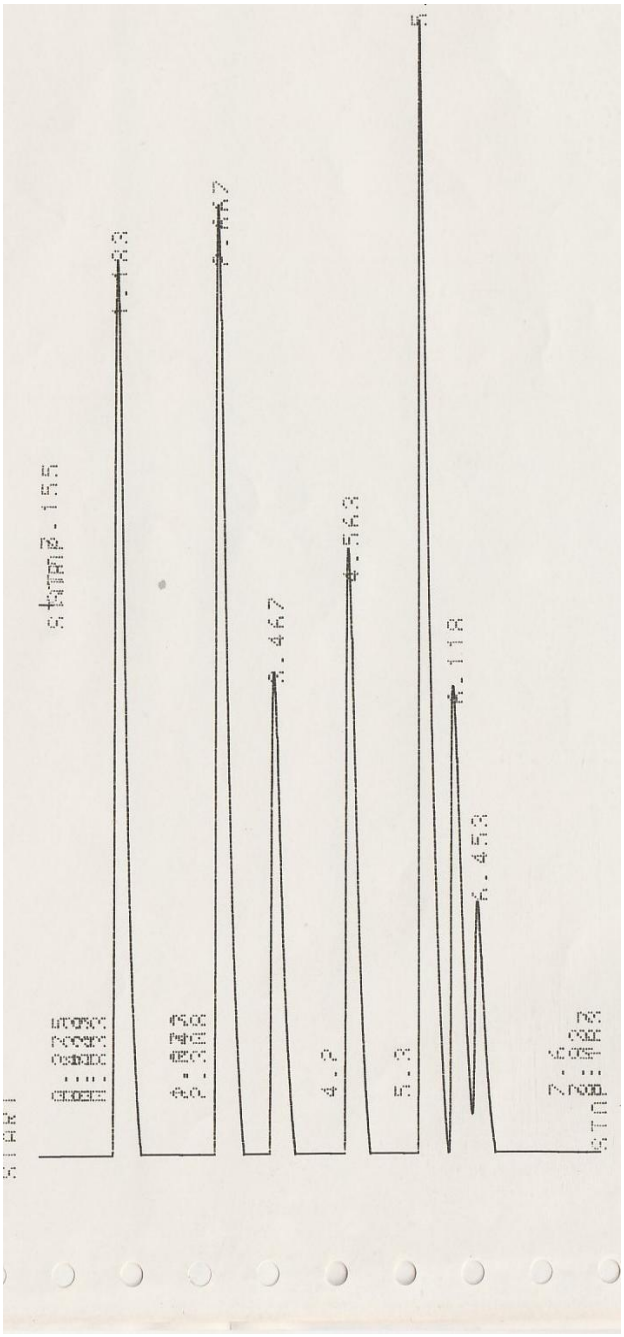
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (4) تاثير التربتوفان بتركيز10 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



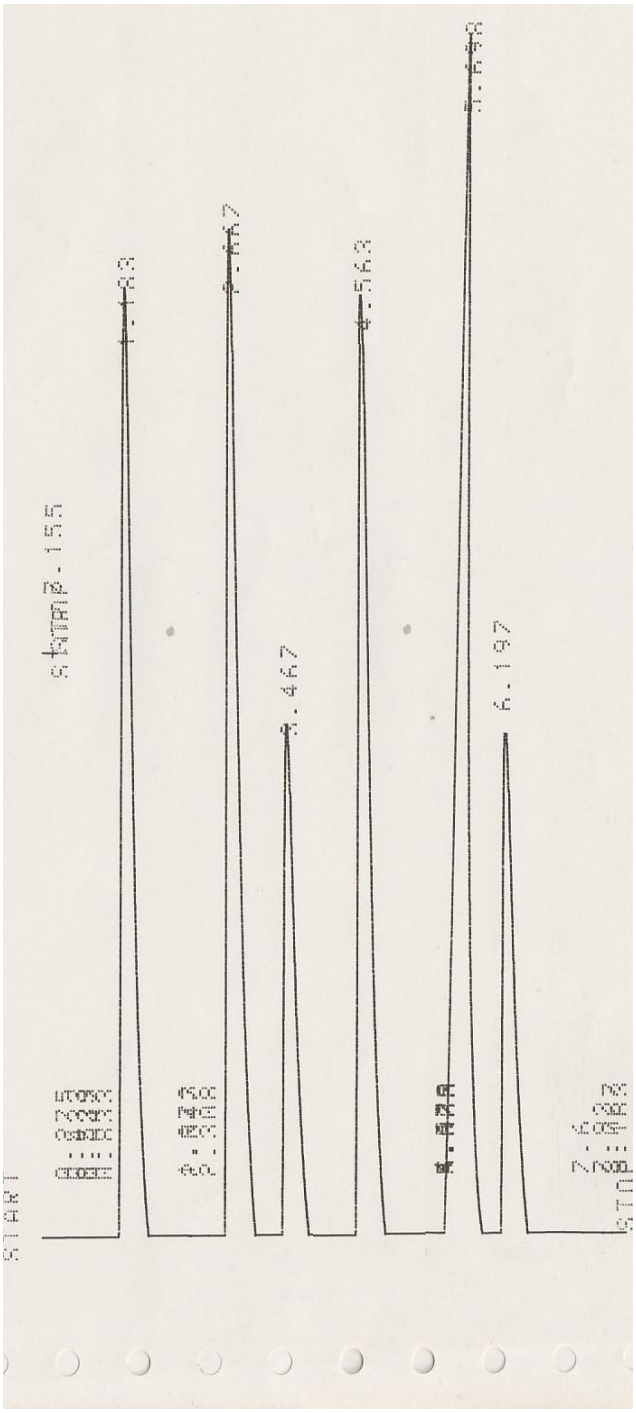
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (5) تاثير التربتوفان بتركيز20 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



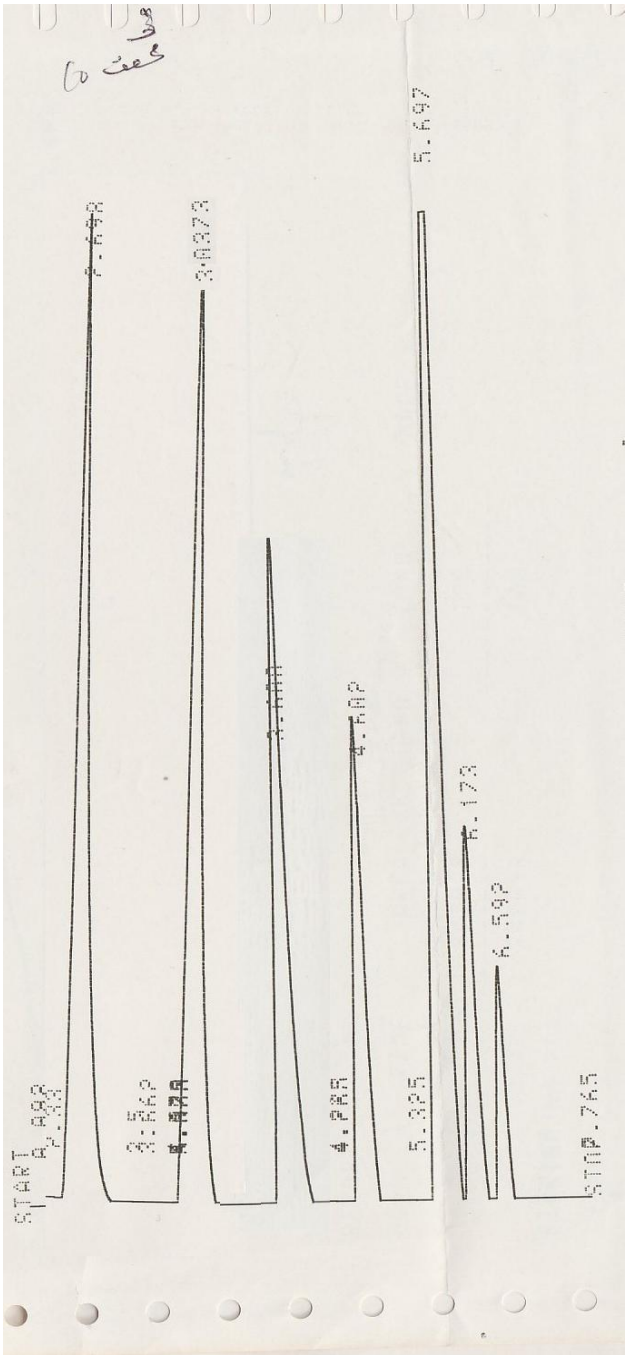
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (6) تاثير التربتوفان بتركيز10 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



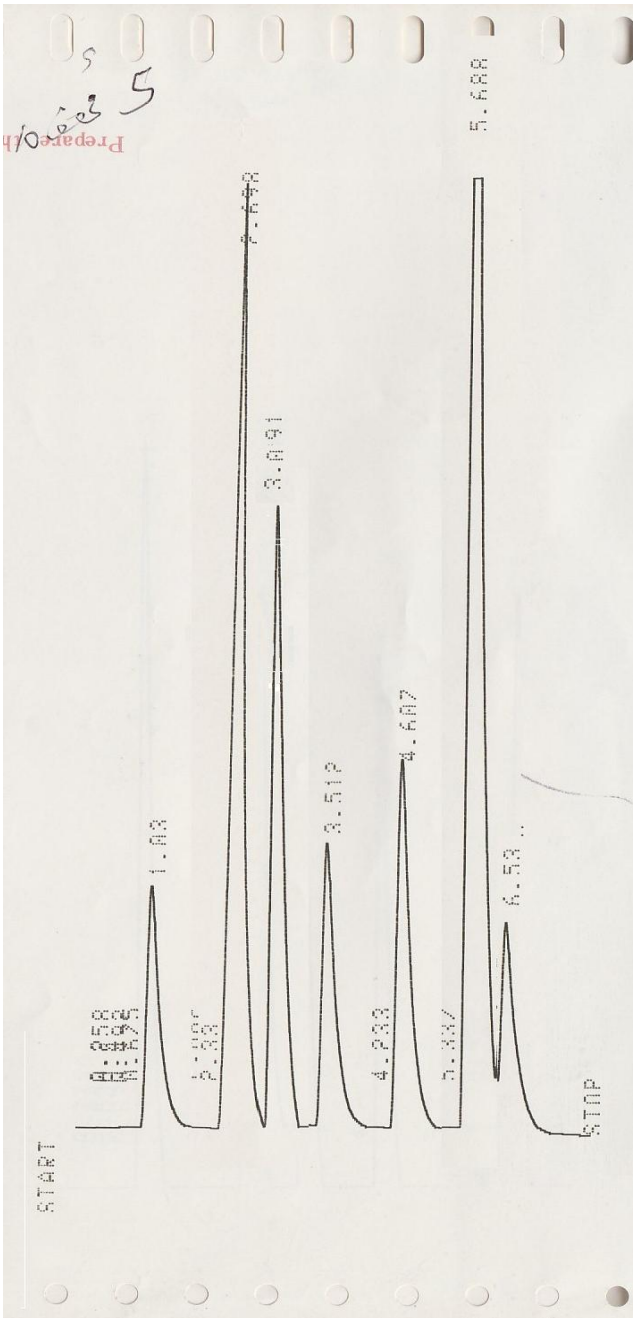
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (7) تاثير التربتوفان بتركيز20 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



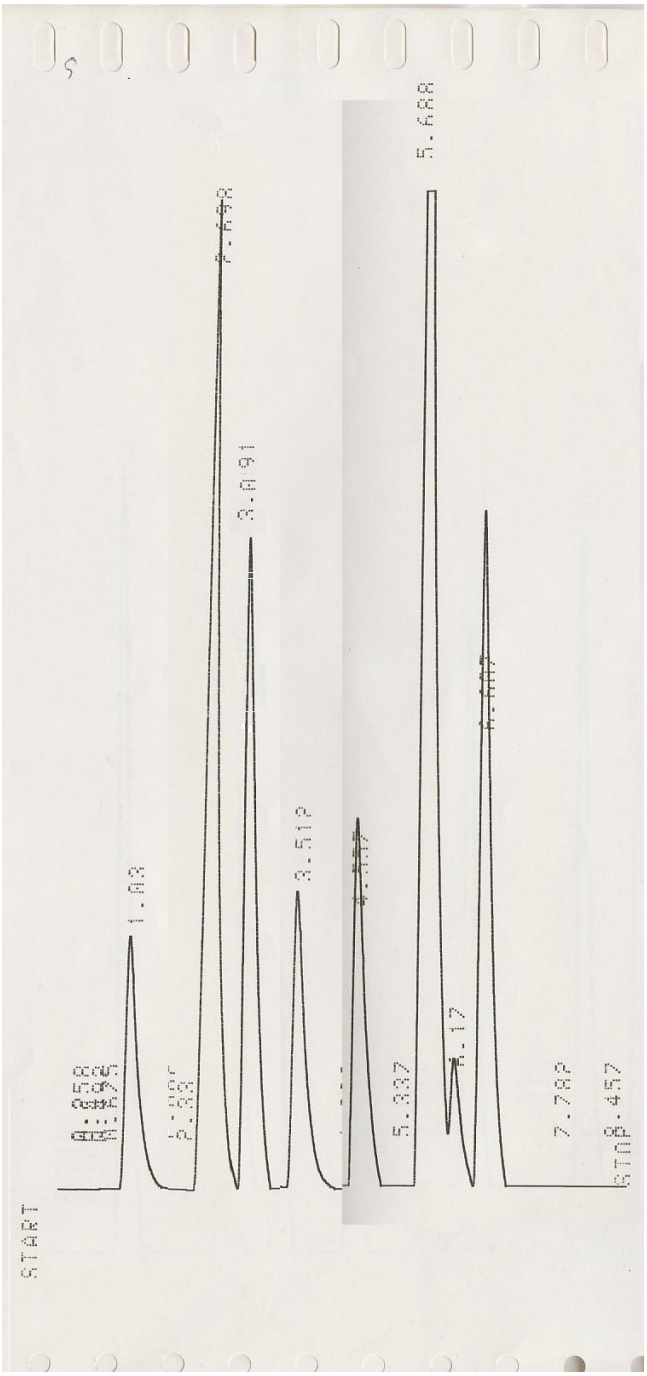
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (8) تاثير التربتوفان بتركيز15 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



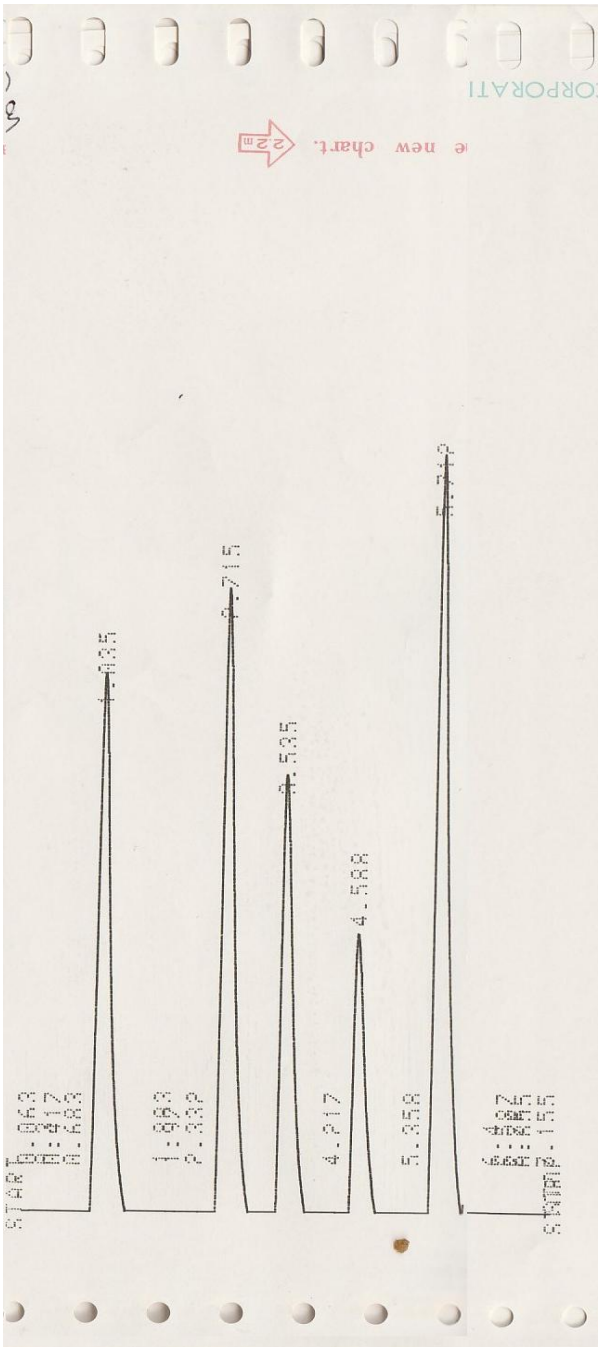
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (9) تاثير التربتوفان بتركيز5 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من الافرع الخضرية لنبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



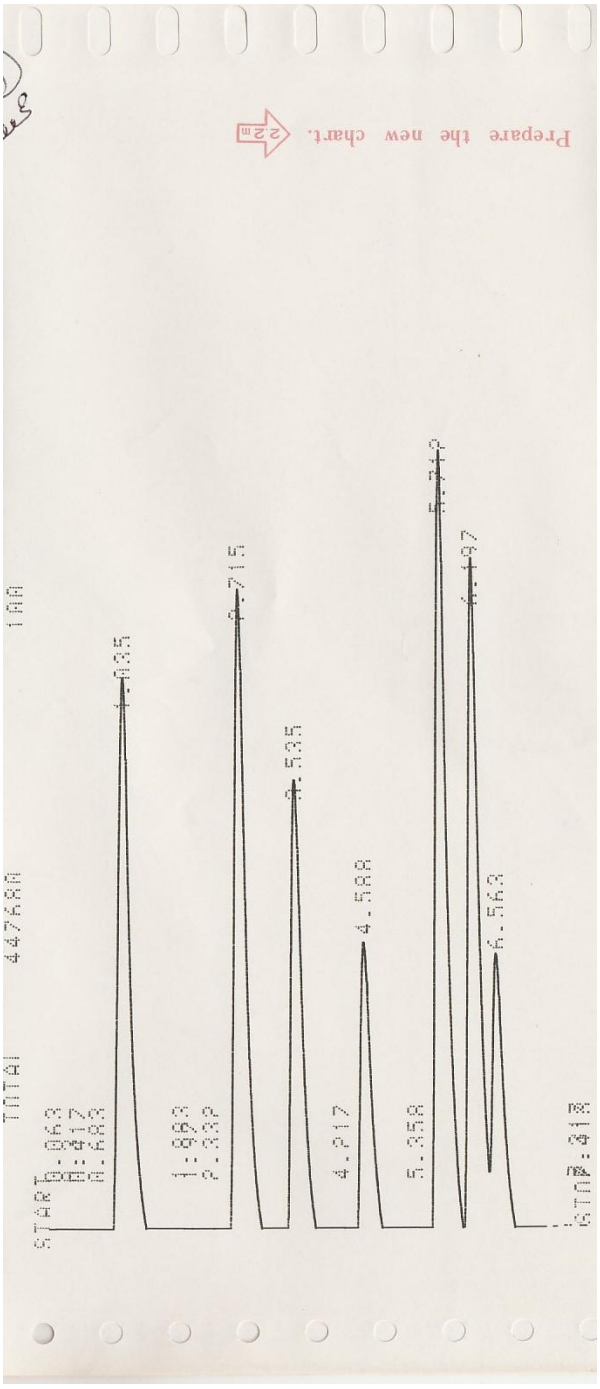
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (10) تاثير التربتوفان بتركيز20 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



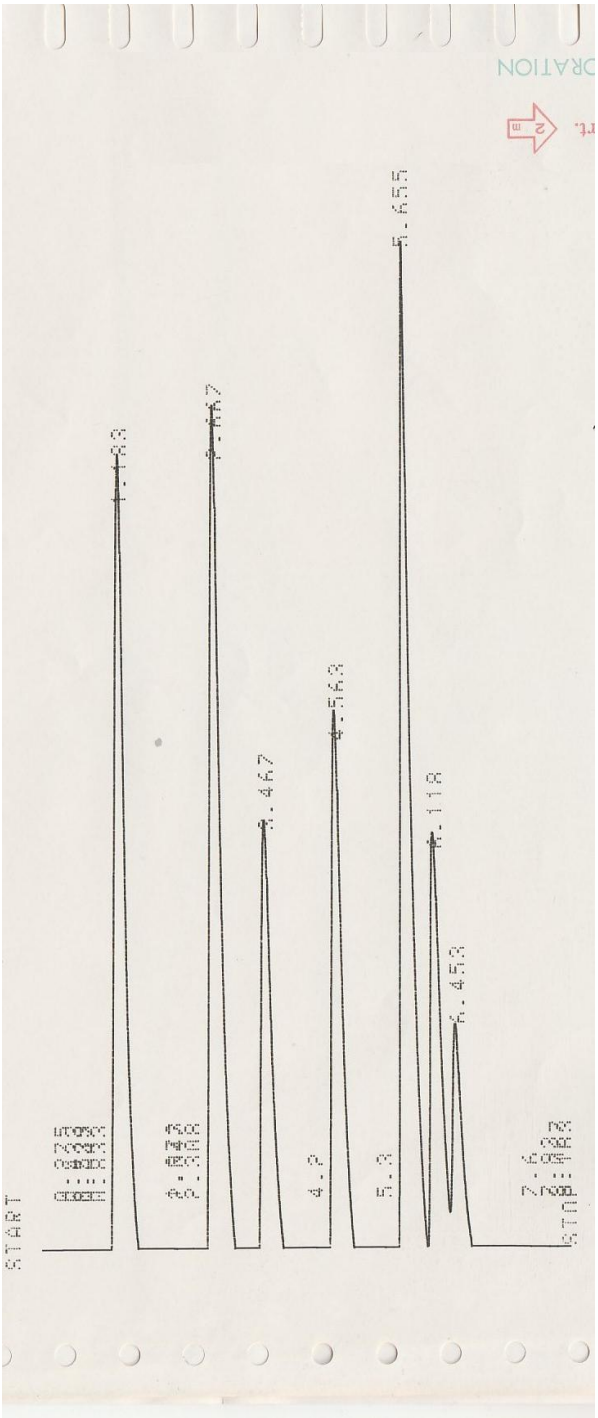
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (11) تاثير التربتوفان بتركيز15 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



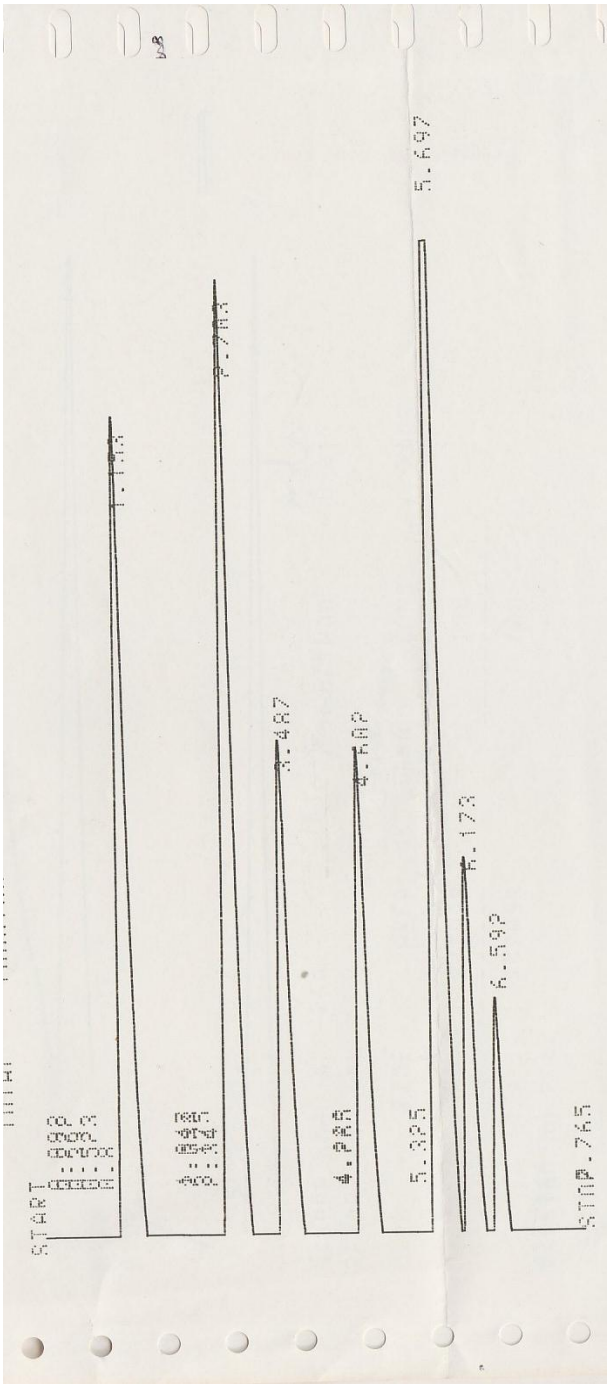
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (12) تاثير التربتوفان بتركيز10 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



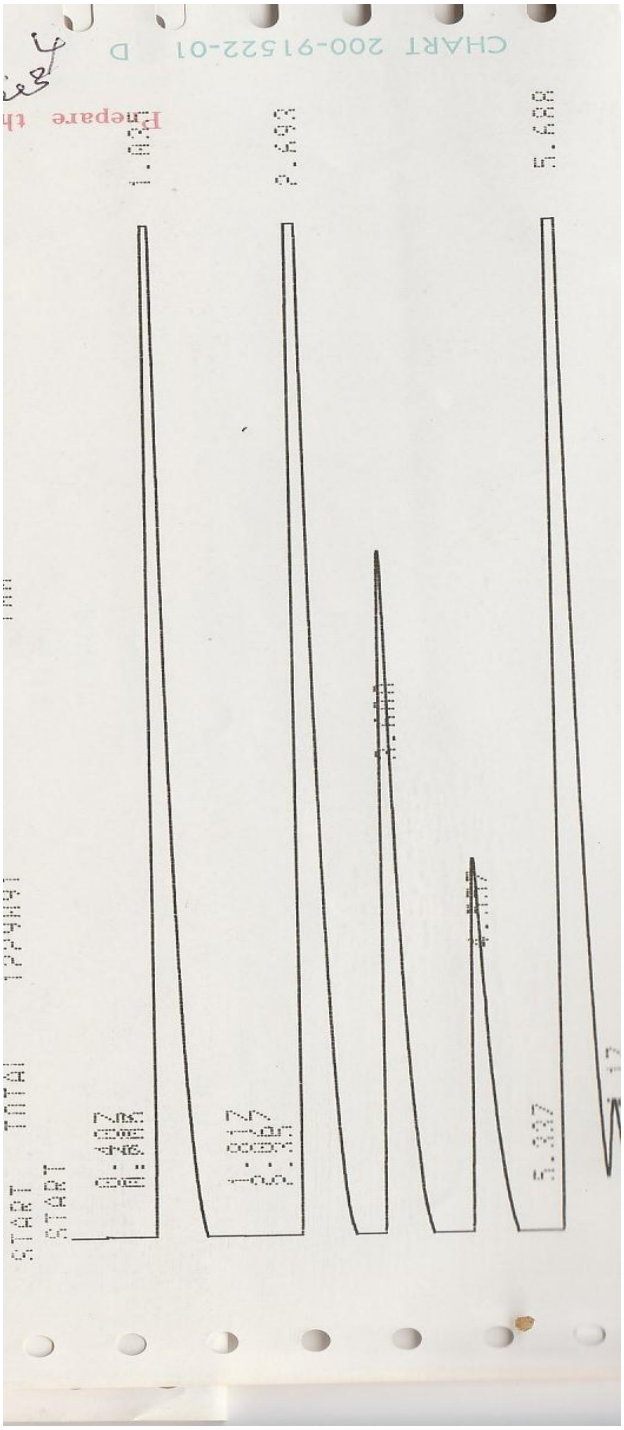
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (13) تاثير التربتوفان بتركيز5 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



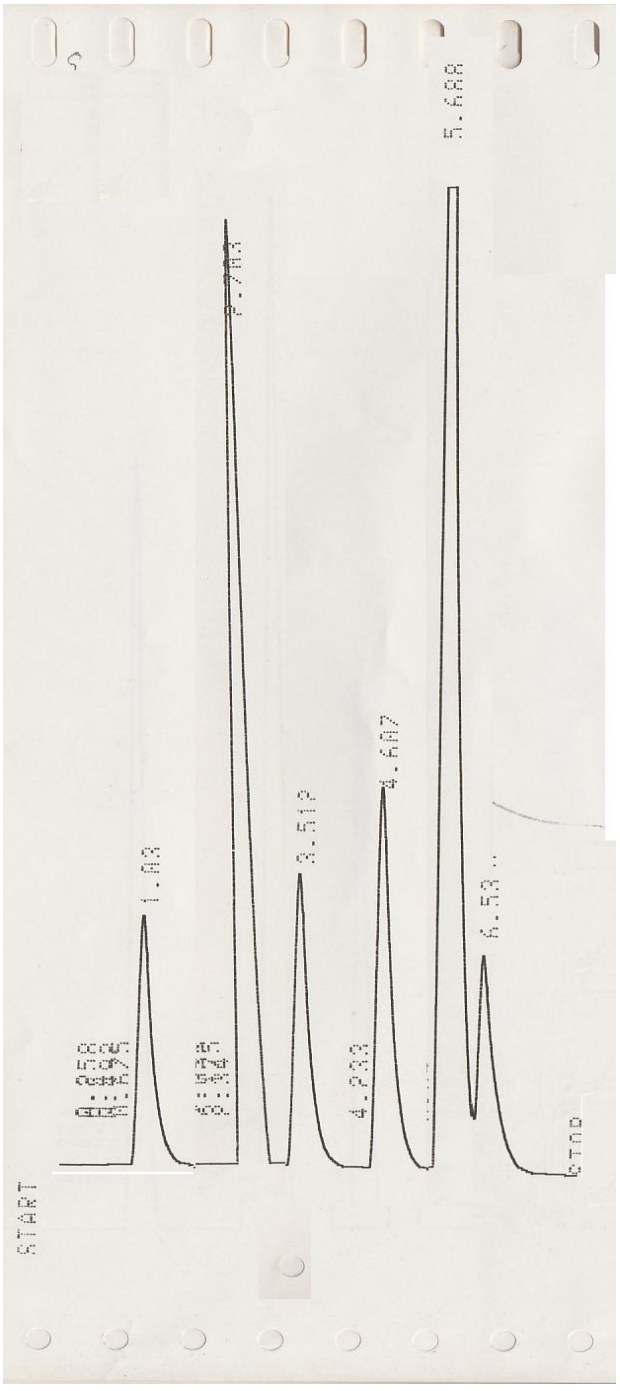
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (14) تاثير التربتوفان بتركيز10 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



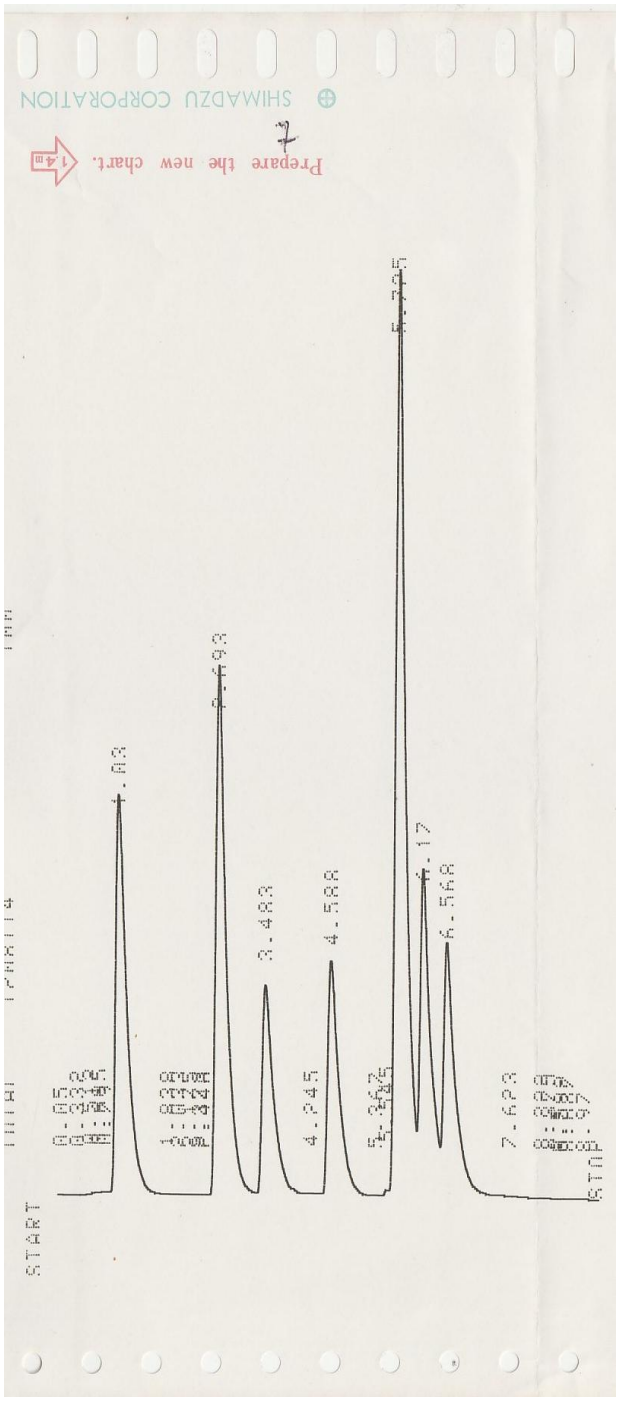
Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (15) تاثير التربتوفان بتركيز20 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (16) تاثير التربتوفان بتركيز15 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 20 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.



Seq	Compound	Retention time
1	Diosgenine	2.690
2	Trigonelline	5.690

ملحق (17) تاثير التربتوفان بتركيز5 ملغم.لتر$^{-1}$ واشعة (UV) 10 دقيقة في انتاج المركبات الايضية من كالس نبات الحلبة بعد شهر من الزراعة على الوسط الغذائي MS.

Abstract

The study was carried out in the plant tissue culture laboratories of the Department of Horticulture and Landscape Engineering / College of Agriculture - University of Karbala for the period from May 2021 until June 2022, with the aim of studying the effect of physical and chemical stimuli on the production of Trigonella and Diosgenine from *Trigonella foenum-graecum* L. In vitro. The results of the study can be summarized as follows:-

1- The best treatment for sterilization of fenugreek seeds was using 2% sodium hypochlorite NaOCl for 15 minutes.
2- The nodes as a explants used in the stimulation stage gave the highest response of 80% at the concentration of 2 mg.L^{-1} BA, while the shoot tips did not give any significant response.
3- - The medium prepared with BA at a concentration of 2 mg.l^{-1} was the best in increasing the number of branches, their length, the number of leaves, and the fresh and dry weight of the vegetative group, reaching (8.65 branches. Plant part-1, 4.00 cm, 26.33 leaves. Plant-1, 4.03 mg, 1.22 mg) respectively.
4- The concentration of 0.2 mg.l^{-1} NAA achieved the highest average of the number of branches and leaves and the fresh and dry weight of the vegetative total amounted to (7.49 branches.$plant^{-1}$, 21.50 leaves.$plant^{-1}$, 3.64 and 0.95 mg) respectively, while the concentration achieved 0.4 mg.l^{-1} The highest average length of branches was 3.92 cm.
5- The treatment of vegetative growths with the amino acid tryptophan led to a higher concentration of 20 mg.l^{-1} of it in achieving the highest rate of trampled characteristics, which included the number and length of vegetative branches, the number of leaves, the fresh and dry weight of the vegetative group, as well as the average concentration of chlorophyll and carbohydrates, which amounted to (34.05

branches., 5.05 cm, 63.33 mg. leaf^{-1}, 3.21 and 1.54 mg, 3.72 and 4.25 mg. g^{-1}) respectively. While the UV irradiation treatment at minute 20 achieved the highest rate for the same traits, which amounted to (32.64 branches. Plant^{-1}, 5.01 cm, 50.26 leaves.plant^{-1}, 2.64 and 1.16 mg, 3.16 and 3.90 mg.gm^{-1}) respectively.

6- When vegetative growths were treated with different concentrations of tryptophan, the concentration of 15 mg.L-1 achieved the highest average concentration of Trigonelline and Diosgenine compounds, which reached (277.23 and 212.73) µg.g^{-1}, respectively. While the irradiation treatment at minute 20 gave the highest rate of the same compounds (286.45 and 210.60) µg.g^{-1}, respectively.

7- The shoot tip significantly outperformed the leaves in achieving a response rate of 100% in all combinations of 2,4-D with BA, while the leaf achieved a response rate of 30% at the 1 mg.l^{-1} 2,4-D concentration and overlapping with all BA concentrations.

8- The concentration of 2 mg.l^{-1} 2,4-D achieved the highest average fresh and dry weight of the induced callus from the growing top, which amounted to (172.75 and 15.31) mg, respectively, while concentration 0.2 mg.l^{-1} BA achieved the highest weight rate for the same traits that reached (141.60 and 12.22) mg, respectively.

9- When the callus induced from the growing top was treated with different concentrations of tryptophan, the concentration of 15 mg.l^{-1} achieved the highest average of the fresh and dry weight of the callus reached (299.49 and 27.23) mg, respectively, and the irradiation treatment at minute 20 achieved the highest rate for the same characteristics amounted to (265.14 and 24.08) mg, respectively.

10- The concentration of 20 mg.l^{-1} of tryptophan gave the highest concentration of Trigonelline compound which was 239.89 µg. g^{-1}, while the highest concentration of Diosgenine compound was in the prepared medium with a concentration of 15 mg.l^{-1} of tryptophan which was 190.34 µg. g^{-1}.

b

11- Regarding the effect of UV rays on the rate of concentration of metabolic compounds in the callus of the fenugreek plant, the 20th minute excelled in giving the highest average concentration of Trigonelline and Diosgenine, which reached (248.06 and 192.21) μg. g^{-1} respectively.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Kerbala -College of Agriculture
Horticulture and Landscape Department

Effect of some physical and chemical stimuli in the production of the metabolic compounds of the Fenugreek *Trigonella foenum – graecum L* In vitro culture

A Thesis Submitted to the Council of the College of Agriculture / University of Kerbala in Partial Fulfilment Requirements for the Master Degree in Agricultural sciences / Horticulture and Landscape

Submitted By

Shurooq Hakim Kadhim

Supervised by

Asst. Prof. Dr. SarabAbdul Hadi Muhammad Al-Mukhtar

2022 December **1444 Jumada al- Awwal**