عزل الأليسين كناتج من الأيض الثانوي من مزارع كالس البراعم الورقية لنبات الثوم *Allium sativum*♦

عبير عبد الغني محمد الجميلي
قسم التحليلات المرضية/ المعهد الفني بالموصل

مزاحم قاسم الملاح
قسم علوم الحياة /كلية التربية
جامعة الموصل

Abstract

This study successed in isolating the secondary metabolic product named allicin .

This compound was isolated from various callus cultures & garlic plants produced from seeds as well .

The isolated material was identified using thin layer chromatography (T.L.C.) , UV Spectrophotometer & infra red techniques .

The results revealed that a single compound was isolated from all alcoholic plant extracts . the unique compound isolated from all samples has the same flow – rate and possess identical chemical structure when matched with standard allicin .

The finding that callus culture contains high level of allicin up to 200 mg / 10g fresh weight , while garlic cloves contain 20 mg / 10g fresh weight which is known to be rich with allicin .

This study described the effect of different photoperiod including continuous light or continuous dark and culture medium type on the accumulation of allicin .The results confirmed that callus tissue grown on MS medium enhanced the allicin quantity that reached up to 200 mg / 10g fresh weight of callus incubated in continuous light for two weeks .

الخلاصـــــــــة

تمكنت الدراسة الحالية من عزل الأليسين ، احد النواتـــج الأيضيـــة المهمة المعروفة من المزارع النسيجية لنبات الثوم متضمنة مزارع مختلفة من الكالس فضلا عن عزلـــه مـــن نباتات الثوم الناتجة من بذوره .

وقد شخص هذا الناتج الأيضي باعتماد تقانات كروموتوكرافيا الطبقـــة الرقيقـــة (T.L.C.)، المطياف الفوتومتري .UV spect ، مطياف الاشعة تحت الحمراء (IR) واظهرت النتـــائج انفصال بقعة واحدة من كافة المستخلصات النباتية الكحولية وتأكد ان المركب الوحيد المعزول

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4 – 5 أيلول 2007

من كافة العينات كان له نفس معدل الجريان . واوضحت النتائج احتواء الكالس على مستويات عالية من الأأليسين بلغت 200ملغم / 10غرام وزن طري من الكالس بينما فصوص الثوم احتوت على 20ملغم/ 10غرام وزن طري .

واظهرت نتائج هذه الدراسة ان المزارع النامية في ظروف الاضاءة المستمرة في الاسبوع الثاني على وسط الادامة MS المدعم باضافة منظمات النمو ساعدت على تراكم الأليسين بشكل ملحوظ .

المقدمة

ان النواتج الايضية الثانوية تبنى بايولوجياً من النواتج الايضية الاولية للنبات (1) . وحديثا هدفت العديد من الدراسات و البحوث الى عزل هذه النواتج من مصادرها النباتية ، فقد تمكنت احدى هذه الدراسات من عزل الدايوسجينين وتقديره كمياً في انواع مختلفة من مزارع كالس نبات الحلبة ***Trigonella foenum graecum***، ومن الوسط السائل المستخدم في تنمية مزارع المعلقات الخلوية، والوسط السائل المستخدم في تنمية الجذور الشعرية (2) واشارت دراسة اخرى (3) إلى احتواء فصوص الثوم الطري او المجفف او مستخلصاته على مجموعة من المركبات الكيمياوية وتاثر تواجدها بشكل كبير بعوامل درجة الحرارة ، وفترة حفظ الفصوص الجافة و بنوع المذيبات القطبية أوغير القطبية المستخدمة في استخلاصها ايضاً. و يتاثر وجودها بدرجة كبيرة على نشاط انزيم alliinase الفعال الموجود في فصوص الثوم (4) . وقد برهنت احدى الدراسات نشوء هذه المركبات الكيمياوية اساساً من مركبات كبريتية ومركبات غير كبريتية (5). واضافت دراسة اخرى احتواء الثوم على 0.1 – 0.36% من الزيوت الطيارة الحاوية على مركبات الكبريت(6) .

ان الهدف الأساسي لهذه الدراسة يكمن في عزل وتشخيص الأليسين وتقدير محتواه في مزارع الكالس،وتاثيرعوامل الضوء والظلام على هذا المحتوى للتعرف على مدى اعتماد المزارع النسيجية كمزارع الكالس مصدرا للحصول على الأليسين بدلا من اعتماد فصوص الثوم .

المواد وطرائق العمل

تكوين مزارع كالس أوراق البراعم

استخدمت بادرات الثوم ***Allium sativum*** (garlic) الفتية المعقمة بعد 10ايام من انبات الفصوص المعقمة سطحيا (7) والنامية في وسط MS (8) الصلب . استؤصلت الاوراق التي تحيط بالبراعم ونقلت قطع اوراق البراعم المستأصلة الى اوساط استحداث الكالس المنتخبة (9) وقد اشير اليها بالرموز MS1, MS2:

MS1: MS + BA 1.0 + 2,4-D 0.3 + NAA 0.5 mg/L
MS2: MS + BA 3.0 + 2,4-D 0.1 + NAA 2.0 mg/L

وقد اعتمدت هذه الاوساط في ادامة مزارع الكالس وحفظت هذه المزارع في غرفة الزرع في ظروف درجة حرارة 25 ± 2م و نظام أضاءة تعاقبي (16 ساعة ضوء / 8 ساعات ظلام) وشدة اضاءة 2000 لوكس .

نمو مزارع الكالس في الضوء و الظلام

نقلت مجموعة من مزارع كالس أوراق البراعم تضم عشرة مزارع نامية في اوساط الاستحداث المذكورة سابقا MS1,MS2 . من النظام الضوئي المتعاقب الى الظلام المستمر بدرجة حرارة 25 ± 2م، وحفظت في هذه الظروف لمدة اسبوع، اسبوعين، ثلاثة اسابيع . و نقلت مجموعة مماثلة من مزارع كالس اوراق البراعم النامية في الاوساط المذكورة أعلاه من النظام الضوئي المتعاقب الى ظروف الضوء المستمر وحفظت فيها لمدة اسبوع، اسبوعين، ثلاثة اسابيع . وحفظت مجموعة ثالثة من مزارع كالس اوراق البراعم نامية في ظروف الضوء و الظلام المتعاقب المشار اليها سابقا .

عزل مركب الاليسين من العينات النباتية

اعتمدت طريقة العالم Cavallito وآخرون (10) اذ حضرت المستخلصات الكحولية بأخذ 10 غم من فصوص الثوم، وغسلت جيداً بالماء، وازيلت قشرتها، واخذ وزن 10 غم من كالس اوراق البراعم ايضاً . قطعت الفصوص المقشرة ، وكذلك كالس اوراق البراعم الى قطع صغيرة بوساطة سكين معقمة . نقلت عينات الكالس، وقطع الفصوص كل على انفراد الى دورق زجاجي حجم 100 مل يحتوي على 50 مل محلول 99% من الكحول المثيلي Methanol وسدت فوهة الدورق برقائق الالمنيوم ، تركت العينات النباتية مغمورة في الكحول لمدة 2– 3 أيام، محفوظة في درجة – 15م في المجمدة. رشحت عينات الفصوص باستخدام قمع بخنر ، اما مستخلص الكالس فاستخدمت اوراق ترشيح Whatman No.1. لترشيحه في ظروف خلخلة الضغط . ركز الراشح بوضعه في جهاز التبخير تحت ضغط مخلخل Rotary evaporator عند درجة حرارة 50م لمدة 35 – 40 دقيقة، حتى الحصول على مركز ذو قوام زيتي اصفر اللون له رائحة الثوم المعروفة.حضر 40 مل من المحلول المكون من 32 مل من محلول 85% الكحول الاثيلي ethanol، 8 مل من الماء المقطر و اضيف الى عينة الفصوص. وحضر المحلول ذاته لاستخدامه مع عينة الكالس، ووضع هذا المحلول في سحاحة زجاجية حجم 100 مل. اضيف هذا المحلول تدريجياً قطرة – قطرة ، الى العينة ذي القوام الزيتي المتبقية من عملية تركيز الراشح، ثم وضع هذا المزيج في الثلاجة لمدة 24 ساعة. رشح المزيج من خلال ورقة ترشيح Whatman No.1 واعيد

الراشح الناتج الى ظروف التبخير تحت الضغط المخلخل عند درجة حرارة 50م حتى الحصول على الراشح المركز. اضيف 5 مل من الكحول المثيلي الثلجي Ice-cold-Methanol الى الراشح المركز. وحفظ في درجة حرارة – 15م لمدة ساعتين .

رشح المزيج من خلال ورقة ترشيح Whatman No.1. غسل الراسب المتبقي على ورقة الترشيح باضافة 15 مل من الايثر المبرد ليتكون راسب اصفر اللون ذو رائحة مميزة، جفف هذا الراسب عند درجة حرارة 50م لمدة 30 دقيقة.

الكشف عن الاليسين باستخدام كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة – Thin Layar chromatography

أعتمدت تقانة كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (T.L.C) التصاعدي ، باخذ لوح زجاجي جاهز بسمك 0.25 ملم مطلية بمادة السيليكاجيل وبابعاد 20×20 سم (Merck, W.G) . وحملت العينات المراد فصلها على احد طرفي اللوح بهيئة بقع على امتداد خط البداية باستخدام الانبوبة الشعرية، وضع اللوح الزجاجي في الحاوية الخاصة عمودياً بحيث تكون نهاية اللوح التي تم تحميل العينات عندها في الاسفل وتلامس محلول الفصل المتكون من [n-Butanol:n-propanol:Glacial acetic acid:water] وبنسبة [1 : 1 : 1 : 3] حجم : حجم الموجود في الحاوية. غطيت الحاوية بغطائها وتركت في درجة حرارة المختبر 25م حتى صعود محلول الفصل الى النهاية الاخرى من اللوح. بعدئذ ازيل اللوح من الحاوية، وثبت افقياً في ظروف المختبر ليجف. وبعد جفافه رش بمحلول الاظهار المكون من [Chromiumtrioxide-Glacical acetic acid] لتحديد مواقع مركبات sulfoxide (11) ومقارنتها مع بقع معاملات المقارنة ، اعقبه وضع اللوح في الفرن عند درجة 40م لمدة 15 – 30 دقيقة، بعدئذ حددت مواقع المركب. وحسبت سرعة الجريان Rf (Rate flow) باستخدام الصيغة الرياضية الاتية:

$$Rf = \frac{\text{المسافة التي يقطعها المركب المفصول}}{\text{المسافة التي يقطعها السائل المذيب}}$$

التشخيص النوعي للاليسين

أجريت مجموعة من الاختبارات التشخيصية للتأكد من ان المادة المعزولة هو مركب الاليسين تضمنت :

قياس معدل مسافة الجريان

قيست المسافة التي قطعتها البقع من نقطة البداية والى النقطة التي توقفت فيها، ومقارنتها مع معدل مسافة جريان عينة الأليسين القياسي (المقارنة) ، باعتماد الصيغة

الرياضية المشار اليها وحددت Rf لمركب الاليسين المعزول من عينات الفصوص، الجذور، الكالس .

تقـدير الامتصـاصـية بالمطيـاف الفوتـومتري

اخذ 1سم^3 من محلول كل عينة نباتية لتشخيص الأليسين فيهـا ومحلـول الأليـسين القياسي (المقارنة). وضعت العينة في خلية الجهاز Silica Quartz cell ووضع مقابلها عينة من محلول 75%الكحول الاثيلي وقيست الامتصاصية بالمطياف الفوتـوميتري (Shimadzu UV 160A) .

تحديد التركيب الكيميائي بمطياف الاشعة تحت الحمراء (I.R.)

اخذ 0.5 ملغم مـن الاليسيـن المعزول مـن كـل عينـة فضلا عـن الأليـسين القياسي (المقارنة) واذابته في رابع كلوريد الكربـون CCL4 وقيـست العينـات بجهـاز (Tensor I.R. 27,Bruker,W.Germany) .

التقدير الكمي للاليسين

تم حساب التقدير الكمي للاليسين المعزول من العينـات المختبرة،بالاعتمـاد علـى الامتصاصية التي سجلت بوساطة المطياف الفوتومتري لكل عينة.وباعتماد المعادلة الأتية :

$A_1/A_2=S_1/S_2$

A_1= درجة امتصاص الاليسين القياسي (المقارنة) .

A_2= درجة امتصاص الاليسين المعزول من العينات المختبرة .

S_1= وزن الاليسين القياسي (المقارنة) .

S_2= وزن الاليسين المعزول من العينات المختبرة .

النتائـــــــــج

فصل الاليسين من المستخلصات النباتية الكحولية

اوضحت النتائج ان المركب المعزول من الفصوص ، عند استخدام الاسيتون المبرد، اتصف بطبيعته اللزجة ولونه البني او الابيض المائل الى الاصفرار، وبرائحته المماثلة لرائحة الثوم المعروفة و عند استخدام الايثر المبرد فصل الاليسين بصورة راسب بني اللـون. كمـا أظهرت النتائج الحصول على الاليسين بهيئة راسب عند عزله من الجـذور وكـالس اوراق البراعم. وامتاز هذا الراسب بنفس الصفات المشار اليها من حيث لونه وطبيعته ورائحته التي اتصف بها المركب المعزول من فصوص الثوم، مـع تبايـن كميـة الاليـسين المترسـب (الجدول1) من العينات المختلفة .

الجدول(1): كميات الاليسين المترسب المعزول من المستخلصات الكحولية للفصوص والجذور وكالس اوراق براعم الثوم *Allium sativum* L.

المستخلصات	كمية الاليسين المترسب ملغم/10 غم (وزن طري)
الفصوص	20
الجذور	12
كالس اوراق البراعم	200

واظهرت النتائج ان نمو مجموعة من مزارع كالس اوراق البراعم في ظروف الاضاءة المستمرة لمدة 3 أسابيع متواصلة ونمو مجموعة اخرى منها في ظروف الظلام المستمر لمدة 3 أسابيع متواصلة ايضاً وعلى نوعين مختلفين من وسط الادامة اظهر وجود فروقات في كمية الاليسين (الجدول 2) المعزول من هذا الكالس .

الجدول(2) : تباين كميات الأليسين المعزول من كالس اوراق براعم الثوم *Allium sativum* L. النامي في نوعين مختلفين من وسطي الادامة في ظروف الضوء والظلام ولفترة ثلاثة أسابيع

نوع الكالس	وسط الادامة	كمية الاليسين ملغم/10غم (وزن طري) الفترة الزمنية (اسبوع) الاسبوع الاول	الاسبوع الثاني	الاسبوع الثالث
كالس نامي في اضاءة مستمرة	MS_1	170	200	160
	MS_2	140	200	190
كالس نامي في ظلام مستمر	MS_1	170	140	150
	MS_2	190	150	170
كالس نامي في نظام ضوئي متعاقب	MS_1	180	190	190
	MS_2	190	170	200

MS_1: (MS+1.0BA+0.3 2,4-D+0.5NAA)mg/L .

MS_2: (MS+3.0BA+0.1 2,4-D+2.0NAA)mg/L .

وتشير النتائج في الجدول اعلاه تفوق في محتوى الأليسين الكالس النامي في ظروف الاضاءة المستمرة وفي وسطي الادامة حيث بلغت كميته 200 ملغم لكل 10 غم وزن طري كالس في الاسبوع الثاني. بينما الكالس النامي في ظروف الظلام المستمر ثبت احتوائه على 190 ملغم من الأليسين لكل 10 غم وزن طري كالس في وسط الادامة MS_2 في الاسبوع الاول ولوحظ ان نمو كالس اوراق البراعم في ظروف الاضاءة المتعاقبة

في الوسط MS2 اظهر احتوائه 200 ملغم من الأليسبن لكل 10 غم وزن طري كالس في الاسبوع الثالث .

لتشخيص النوعي لمركب الأليسين المعزول من الفصوص وجذور نباتات الثوم بقياس مسافة الجريان R.F

اكدت النتائج انفصال بقعة واحدة منفردة من المستخلصات الكحولية لكل من عينة الفصوص والجذور. و بلغت معدلات مسافة جريان هذه البقع 0.06 سم وهي مطابقة لقيم معدلات مسافة الجريان التي قطعتها بقع الأليسين القياسي (الجدول 3).

الجدول(3): معدلات قيم مسافة جريان بقع الأليسين المنفصلة من المستخلصات الكحولية فصوص و جذور نباتات الثوم *Allium sativum* L.

مصدر بقع الاليسين	معدل مسافة الجريان سم (± SD)
محلول الاليسين القياسي (المقارنة)	0.007 ± 0.06
الفصوص	0.002 ± 0.06
الجذور	0.002 ± 0.06

SD :الانحراف القياسي (Standard deviation).

واظهرت النتائج ان البقع المنفردة المنفصلة من المستخلصات الكحولية لكالس اوراق البراعم النامي في نوعين مختلفين من وسط الادامة في ظروف الاضاءة المستمرة او تلك النامية في الظلام المستمر لفترة ثلاثة أسابيع متواصلة كانت مماثلة لبقع الأليسين القياسي فضلاً عن تماثل قيم معدلات مسافة الجريان لكل منهما مع قيم معدلات مسافة جريان بقع الأليسين القياسي ايضاً (الجدول 4).

الجدول(4): معدلات قيم مسافة جريان بقع الأليسين المنفصلة من كالس اوراق براعم نباتات الثوم *Allium sativum* L. النامي في نوعين مختلفين من اوساط الادامة، تحت ظروف اضاءة مختلفة

العينات	وسط الادامة	معدل مسافة الجريان سم (± SD)
محلول الاليسين القياسي (المقارنة)		0.007 ± 0.06
كالس نامي في اضاءة مستمرة	MS_1	0.007 ± 0.06
	MS_2	0.007 ± 0.06
كالس نامي في ظلام مستمر	MS_1	0.002 ± 0.06
	MS_2	0.002 ± 0.06

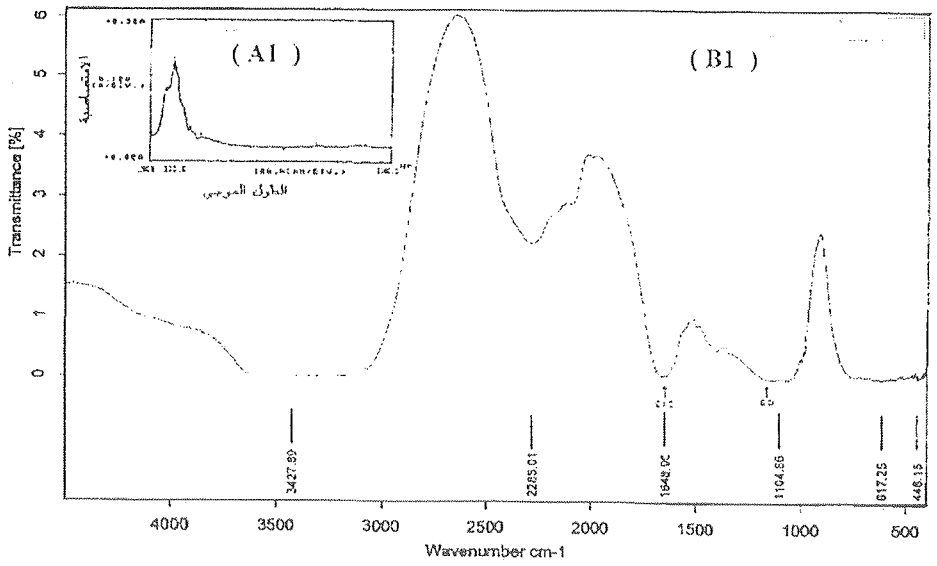
SD : الانحراف القياسي (Standard deviation)

قياس الامتصاصية.

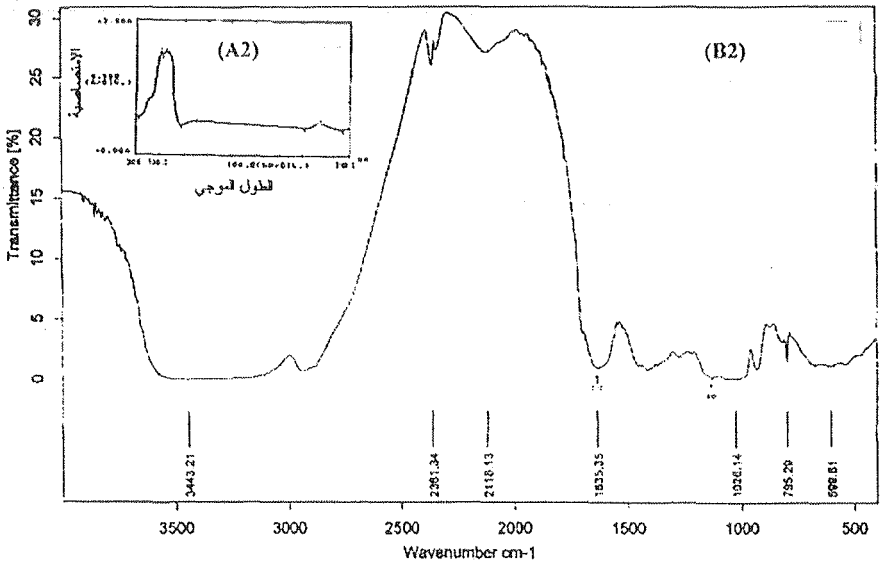
اظهرت القياسات ان درجات الامتصاص للعينات المختبرة عند الاطوال الموجية من 300 – 370 نانسشيوميتر، كانت مماثلة لدرجة الامتصاص لاعلى طول موجي لمحلول الأليسين بالقياسي (المقارنة).(الشكل A.1) . وقد اكدت هذه النتائج ان المركب المعزول من عينات فصوص الثوم (الشكل A.2) والجذور لها نفس الامتصاصية لاعلى طول موجي λ_{max} والتي بلغت 300 نانوميتر.واشارت النتائج مرة اخرى ان درجات امتصاص الأليسين المعزول من كالس اوراق البراعم النامي في وسطي الادامة MS2,MS1 في ظروف الضوء المستمر او الظلام المستمر والنظام المتعاقب كانت مماثلة لدرجات امتصاص الأليسين القياسي اذ سجلت اعلى طول موجي 300 نانوميتر . (الشكل A.3)

تحديد التركيب الكيميائي للاليسين بوساطة I.R.

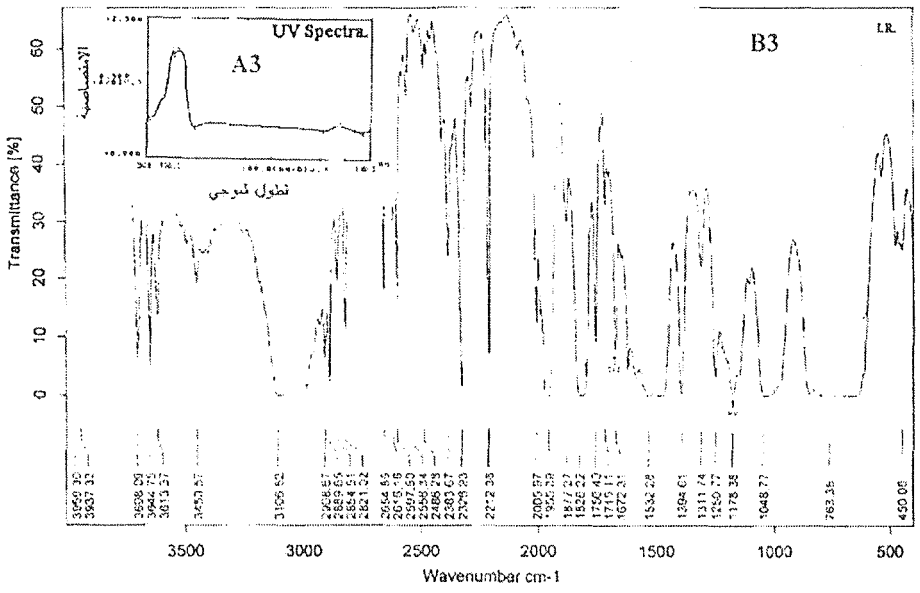
أظهرت نتائج تحديد التركيب الكيميائي للمركب المعزول من فصوص الثوم (الشكل B.2) انه مركب الأليسين لتطابق تركيبه مع التركيب الكيميائي للاليسين القياسي (الشكل B.1) ، وتؤكد هذه النتائج مرة اخرى ان الأليسين هو المركب المعزول من هذه العينات.وذكرت النتائج ان التركيب الكيميائي للاليسين المعزول ، من كالس اوراق البراعم النامي في وسطي الادامة MS_2,MS_1 في ظروف الاضاءة المستمرة أو ظروف الظلام المستمر أوالنامية في النظام الضوئي المتعاقب يتطابق تماما مع التركيب الكيميائي للاليسين القياسي (المقارنة) ايضا . (الشكل B.3)



الشكل (1) منحنى امتصاص الاليسين القياسي (المقارنة) بالمطياف الفوتومتري .UV Spectro (A1) وتركيبه الكيميائي بمطياف الاشعة تحت الحمراء .I.R (B1)



الشكل (2) منحنى امتصاص الاليسين المعزول من فصوص وجذور الثوم
بالمطياف الفوتومتري .UV Spectro (A2) وتركيبه الكيميائي
بمطياف الاشعة تحت الحمراء .I.R (B2)



الشكل (3) منحنى امتصاص الاليسين المعزول من كالس اوراق براعم الثوم (A3)
النامي في ظروف (اضاءة مستمرة، ظلام مستمر ، نظام ضوئي متعاقب) على وسطي
MS_1 و MS_2 بالمطياف الفوتومتري .UV Spectro وتركيبه الكيميائي (B3)
بمطياف الاشعة تحت الحمراء .I.R

المناقشـــــــــــــة

ذكـرت العديـد مـن المصـادر انـه لـيس الهـدف الوحيـد مـن استحداث مزارع الكالس تكوين النباتات منه وانما الافادة من هذه المزارع في الحصول على النـواتج الايضية التي تضم مجموعة المركبات الكيمياوية المهمـة صناعيـا وطبيـا (12) . وركزت العديد من الدراسات الى الافادة من مزارع الكالس فـي الحـصول علـى بعـض المركبات المهمة خاصة تلك التي لا يمكن تحضيرها مختبريا او لاحتوائه هذه المواد بكميات اكبر وبدرجة نقاوة عالية مقارنة مما يحتويه الجزء النباتي ذاتـه الـذي اشتـق منـه الكالـس (13) . وتمكن العديد من الباحثين من الحصول على مجموعة من النواتج النباتية الصناعية من المزارع النسيجية حيث عزل قلويد الكابسيسين من كالس الفلفل الحـار (14) وستروييدالدايوسجنين من مزارع الكالس والجذور الشعرية المحولة وراثياً من نباتات الحلبـة (2) والترايكونيلليـن مـن كالس نبات البن (15) وحامض Gallic acid مـن نباتـات الحناء (16).والثايوفين من كالس نباتات القديفة (17).

أضافت الدراسة الحالية عزل احد النواتج الايضية الثانوية الى قائمة تلـك المركبـات المعزولة من المزارع النسيجية للنباتات حيث اشارت الى امكانية اعتماد مزارع كالس الثوم في الحصول على مركب الأليسين الذي يعد من اهم المركبات المتواجدة في فصوص الثوم ، وقد لوحظ بأن كمية الأليسين المعزول من كالـس اوراق البـراعم بلغت عـشرة أضـعاف كميته الموجودة في الفصوص باعتبارها الجزء النباتي الغني بأحتوائـه علـى الأليـسين. أن ارتفاع محتوى الاليسين في كالس اوراق براعم الثوم النامي في وسط MS الصلب المـدعم بأضافة 1.0 ملغم/لتر من البنزايـل ادنيـن BA بوجود 0.5 ملغم/لتـر مـن نفثاليـن حامـض الخليـك NAA و 0.3 ملغم/لتر من 4,2 ثنائي كلوروفينوكسي حامض الخليـك (2,4-D) ، قد يعزى الى تشجيع هذه المزارع بناء الاليسين في الكالس خاصة وان خلايـاه من النوع البرنكيمي المعروفة بأن الخزن احدى وظائفها المهمة حيث ذكرت احدى الدراسات (18) عزل بعض المركبات الكبريتية من كالس الكراث . وعزل مركب Alliin مـن كـالس جـذور نباتات الثوم (19) . ان لعمر مزرعة الكالس دوراً واضحاً في كمية الأليسين وهذا قد يفسر ان تراكم هذا المركب يعتمد على المرحلة العمرية المبكرة من المزرعة بسبب نـشاط بعض الانزيمات مثـل انزيـم Allinase الـذي يعمـل علـى تمثيـل الأليـسين المتـراكـم (20)وقد يفسر انخفاض مستوى الاليسين في الاسبوعين الثاني والثالث من نمو مزرعة الكالس في وسط الادامة الى احتمال تحرر الأليسين من خلايا هذا الكالس الى الوسط الصلب مقترناً بعامل الضوء او الظلام الذي قد يكون له تأثير واضح في كمية الأليسين .

المصـــــادر

(1) Bhalsing, S. R. and Maheshwari, V. L.Scient.Indust.Res.57:703-708, (1998).

(2) الملاح ، مزاحم قاسم والزبيدي، لمى ذنون صالح. مجلة التربية و العلم . 1: 61 – 75 .(2007)

(3) Staba, E.; John, L.L. and Staba,E.T. Nurt. 131: 1118-1119, (2001) .

(4) Kock,H.P.and Lawson,L.D.,2nd Ed .Williams and Wilkins,Baltimore Pp:1-233,(1996) .

(5) Williams,H. and Wilkinas,A. The Am. Bot. Coun. 38: 65-68, (1996) .

(6) Leung ,A. Drugs and Cosmetics.Willsons ,Comp. (1980) .

(7) Barandiarn ,X . Plant -Tissue Culture. Monthly Arch.2: 56-57, (1997)

(8) Murashige,T. and Skoog, F.Physiol.Planta.15:473-497,(1962).

(9) الجميلي ، عبير عبد الغني محمد ، الملاح ، مزاحم قاسم (2007) . (قيد النشر)

(10) Cavallito, C. J. and Bailey, J. H.Am. Chem. Soc. 66: 1950-1951, (1944).

(11) Langler,R.F. Chrom.104:228-230, (1975).

(12) Weathers,P.J.; Fadzillah,N.A.M. and Cheethan,R.D.Plant Med.53:278-279,(1992).

(13) Dixon, R.A. Plant Cell Culture , A Practical Approach.IRL Press Oxford ,Washington Dc .(1985).

(14) الملاح، مزاحم قاسم واليوزبكي، غادة شرف الدين يحيى. مجلة التربية والعلم.4:46 – 59. (2002)

(15) Ky,Cl.;Louarn,J.;Dussert,S.;Guyot,P.;Hamon,S.and Noirot,M.Food Chem.75:223-230,(2001).

(16) Cowan, M. M.Clin. Microbiol. Rev. 41: 564-582, (1999).

(17) الحمداني، قاسم محمود ، الملاح ، مزاحم قاسم ، الاطرقجي ، عمار عمر . مجلة زراعة الرافدين (2007) . (قيد النشر)

(18)Asghari,G.;Lock,W.; Briar,G.and Houshfar,G.Daru.,10:22-25,(2002)

(19) Hayashi, T.; Sano, K. and Ohsumi,C. Biotech. 57: 162-163. (1994).

(20) Lawson , L. D. & Wang , Z. J.Agric. Food Chem.49: 2592 – (2001).