جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى ـ كلية الزراعة

الاكثار الدقيق لنبات الستيفيا وزيادة محتواه من الستيفيوسايد باستخدام الوسط الصلب ومُفاعلات الغمُر المُؤقت وبعض المُحفزات

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية الزراعة – جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية
(البستنة وهندسة الحدائق)

من قبل

مصطفى رائف أمير النعيمي

بإشراف

أ.د.اياد عاصي عبيد

1445 هـ　　　　2023 م

بِسۡمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحۡمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

نَرْفَعُ دَرَجَاتٍ مَنْ نَشَاءُ

وَفَوْقَ كُلِّ

ذِي عِلْمٍ عَلِيمٌ ﴿٧٦﴾

صدق الله العظيم

سورة يوسف الآية 76

الاهداء

الى الذي وهبني كُل ما يملك حتى احقق له آماله..
الى من كان يدفعني قدما نحو الامام لنيل المبتغى..
الى الانسان الذي امتلك الانسانية بكل معانيها..
والدي المحترم اطال الله في عمره.

إلى نبع العطاء و الكرم و السخاء..
الى التي وهبت فلذه كبدها العطاء والحنان بلا كلل..
وكانت دعواتها لي بالتوفيق تتبعني خطوة خطوة..
أمي الموقَّرة اطال الله في عمرها.

الى النجوم التي تزين حياتي..
اخوتي الاعزاء.

إلى رفيقة دربي الابدي في الحياة ..
زرعتِ الامل في كل لحظة يأس..
زوجتي المحبة والاصيلة..
اطال الله في عمرها.

إلى روحي و نبضي و سر فرحتي ..
بنتاي الغاليتان.

إلى جميع من تلقَّيتُ منهم النصح والدعم و المساعدة

أهديكم خلاصة الجهد و التعب

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين الذي انار لنا طريق المعرفة وهدانا اليه .. والصلاة والسلام على سيدنا محمد واله وصحبه اجمعين. الشكر لله عز وجل الذي امدني بالقوة والارادة حتى اتممت هذه الرسالة.

اتقدم بالشكر والامتنان الى استاذي الدكتور **اياد عاصي عبيد** لما بذله من جهود كبيرة والذي كان له الفضل في انارة طريق البحث لي من خلال توجيهاته وارشاداته الدائمة والقيمة فلا يسعني الى ان ادعو له بكل محبة واخلاص ان يعطيه الله الصحة والعافية واطال الله في عمره وجزاه الله خير الجزاء.

اتقدم بالشكر الى صديقي واخي الدكتور **محمد ظاهرعبد الهادي** الذي رافقني طيلة مسيرة البحث وساعدني بكل صغيرة وكبيرة منها وكان عونا لا يجزع من المساعدة في اعطاء النصح والمعلومة القيمة.

شكري الى عائلتي .. أبي وأمي واخواني وزوجتي الحبيبة لما قدموه من دعم نفسي ومعنوي لاكمال الرسالة على اكمل وجه.

شكر وامتنان ومحبة لكل الاصدقاء الذين ساندوني ودعموني بالنصح والمساعدة.

الملخص

نُفذت عدة تجارب على نبات الستيفيا في مُختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لكُلية الزراعة جامعة ديالى للفترة من تشرين الثاني/ 2021 – اذار/ 2023، تضمنت تعقيم الأجزاء النباتية و إكثار النبات نسيجياً خارج الجسم الحي، إضافة إلى محاولة إستحثاث الكالس من أوراق النبات، و تجارب زيادة محتوى النبات من الستيفيوسايد باستخدام نوعين من مُفاعلات الغمر المؤقت ودور بعض المُحفزات في زيادة المحتوى. ففي تجارب التعقيم استخدمت تراكيز من هيبوكلورات الصوديوم (5 و10 %) و لثلاث مدد زمنية (10 و15 و20 دقيقة)، وأظهرت نتائج التعقيم فروقاً معنوية بين المعاملات، إذ تفوق التركيز 10% للمدد الزمنية الثلاث، بإعطاء أعلى نسبة مئوية للتعقيم بلغت 100%، متفوقاً على التركيز 5% وللمدد الزمنية الثلاث، فيما لم تختلف المدد الزمنية معنوياً فيما بينها للتركيز نفسه. في تجارب الإكثار الدقيق للعقد المفردة أُستخدم BA بالتراكيز 0.0 و0.5 و 1.0 و 1.5 و 2.0 ملغم لتر$^{-1}$، أَشارت نتائج التضاعف في الوسط الصلب إلى تفوق معاملة المقارنة (0.0) معنوياً على جميع المعاملات إذ أعطت أعلى متوسط لارتفاع النبات بلغ 5.4 سم ، أما نتائج التضاعف لصفة عدد الأفرع فتُشير النتائج إلى تفوق التركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ من BA معنوياً على معاملة المقارنة فقط بنسبة بلغت 3.5 فرع نبات$^{-1}$ أما بقية المعاملات فلم تختلف معنوياً، وتجربة استخدام تراكيز من Kin بالتراكيز 0.0 و 1.0 و 2.0 و 3.0 و 4.0 ملغم لتر$^{-1}$، اذ اشارت النتائج الى تفوق معاملة المقارنة معنوياً على جميع المعاملات باعطاء اعلى متوسط لطول الاوراق بلغ 5.4 سم ملغم لتر$^{-1}$ وتفوق التركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ معنوياً على معاملة المقارنة ومعاملة 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ باعطاء اعلى متوسط لعدد الافرع بلغ 2.2 فرع نبات$^{-1}$ وايضاً اعطى التركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ اعلى متوسط لعدد الاوراق بلغ 9.6 ورقة فرع$^{-1}$ متفوقاً بذلك معنوياً فقط على معاملة 2.0 ملغم لتر$^{-1}$.

في تجارب استحثاث الكالس فتم استخدم الأوكسين NAA بالتراكيز0.0 و 1.0 و 2.0 و 3.0 ملغم لتر^{1} وايضا استخدام تراكيز من 2,4-D هي0.0 و 1.0 و 2.0 ملغم لتر$^{-1}$. أَشارت نتائج استحثاث الكالس إلى تفوق التركيزين 2.0 و3.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA بإعطاء أعلى نسبة مئوية للكالس بلغت 100% ،في حين أن 2,4-D بالتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ أعطى أعلى نسبة للكالس بلغت 50%.

أما في تجارب المُفاعلات الحيوية فتضمنت عدة تجارب أولها كان تجربة اضافة نوعين من السايتوكاينين (BA و Kin) في المفاعل المُصنع مختبرياً باضافة تركيزين من البنزل ادنين هي 1.0 و2.0 ملغم لتر$^{-1}$ مع تركيزين من Kin هي 2.0 و 4.0 ملغم لتر$^{-1}$ مع معاملة المقارنة (0.0)، واظهرت النتائج تفوق معاملة المقارنة معنوياً باعطاء اعلى متوسط لارتفاع النبات بلغ 4.8 سم، في حين تفوقت جميع المعاملات معنوياً في صفة عدد الافرع على معاملة المقارنة واعطى التركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ من BA اعلى عدد افرع بلغ 3.2 فرع نبات$^{-1}$، في حين تفوق التركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ من BA معنوياً فقط على معاملة 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ من BA باعطاء اعلى متوسط للاوراق بلغ 17.1 ورقة فرع$^{-1}$. كذلك تجربة إضافة تراكيز من السكروز هي 30 و 60 و 90 غم لتر$^{-1}$ متداخلاً مع BA بالتركيز 0.0 و 1.0 ملغم لتر$^{-1}$، وأيضاً تجارب استخدام حامض السالسلك بالتراكيز 10 و 20 و 30 ملغم لتر$^{-1}$ في مُفاعلات الغمر المؤقت المستورد والمُصنع مختبرياً.

بينت نتائج تحليل الستيفيوسايد إلى تفوق معاملة الوسط الصلب الحاوِ على BA بمقدار 84.21 مايكروغم غم$^{-1}$ على معاملات المقارنة (Free)، ولم تتفوق على النبات الحقلي المؤقلم. وأَشارت نتائج تحليل HPLC لمعاملات السكروز إلى تفوق التركيز 90 غم لتر$^{-1}$ من السكروز متداخلاً مع BA في إعطاء أعلى تركيز للستيفيوسايد بلغ 171.02 مايكروغم غم$^{-1}$. بَينت نتائج إضافة حامض السالسلك إلى تفوق التركيز 30 ملغم لتر$^{-1}$ في زيادة محتوى الستيفيوسايد خارج الجسم الحي إذ بلغ 599.78 مايكروغم غم$^{-1}$ وزن جاف في مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً و387.10 مايكروغم غم$^{-1}$ وزن جاف في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد.

قائمة المحتويات

رقم الفقرة	الموضوع	الصفحة
-	الخلاصة	-
1	المقدمة	1
2	مراجعة المصادر	3
1-2	الوصف النباتي لنبات الستيفيا	3
2-2	تصنيف النبات علميا	3
3-2	الأهمية الطبية لنبات الستيفيا	4
4-2	المركبات الكيميائية في النباتات	4
5-2	التعقيم السطحي للأجزاء النباتية	5
6-2	الإكثار الدقيق لنبات الستيفيا	6
7-2	تأثير السايتوكاينيات في تضاعف أفرع نبات الستيفيا	7
8-2	دور الأوكسينات في تجذير أفرع نبات الستيفيا	9
9-2	استحثاث الكالس	10
10-2	دور المُحفزات الأحيائية وغير الأحيائية في زيادة مُركبات الأيض الثانوي خارج الجسم الحي	11
11-2	مركب الستيفيوسايد	13
12-2	أيض الستيفيوسايد في جسم الإنسان	14
13-2	دور حامض السالسلك في زيادة الستيفيوسايد خارج الجسم الحي	14
14-2	دور السكروز في زيادة الستيفيوسايد	15
15-2	المُفاعلات الحيوية	16
16-2	دور المُفاعلات الحيوية في إكثار نبات الستيفيا	18
3	المواد وطرائق العمل	20
1-3	مكان تنفيذ التجربة	20
2-3	تحضير الأوساط الزراعية وتعقيمها	21
3-3	تجارب الاكثار الدقيق	22
1-3-3	تجربة تعقيم الاجزاء النباتية	22
2-3-3	تاثير تراكيز البنزل ادنين في تضاعف نبات الستيفيا	23
3-3-3	تاثير تراكيز الكاينيتين في تضاعف نبات الستيفيا	23
4-3-3	دور نفثالين حامض الخليك في تجذير أفرع الستيفيا	23
5-3-3	تجربة الأقلمة لنبات الستيفيا	23
4-3	تجربة استحثاث الكالس	24
1-4-3	دور NAA في استحثاث الكالس	24
2-4-3	دور 2,4-D في استحثاث الكالس	24

5-3	استخلاص الستيفيوسايد و تقديره في مزارع الوسط الصلب	25
6-3	تحضير عينات المركب القياسي للستيفيوسايد	26
7-3	المُفاعلات الحيوية المستخدمة في التجربة	26
1-7-3	مُفاعل الغمر المؤقت المستورد	26
2-7-3	طريقة عمل المُفاعل	27
3-7-3	المُفاعل المُصنع في المختبر(LMB)	28
4-7-3	كيفية عمل المُفاعل	29
8-3	تجارب المُفاعلات الحيوية	29
1-8-3	تجربة اختبار اضافة BA و Kin في تضاعف نبات الستيفيا باستخدام مفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً	30
2-8-3	تجربة اختبار إضافة BA و السكروز في تضاعف نبات الستيفيا باستخدام مفاعل الغمر المؤقت المستورد	30
3-8-3	اختبار دور حامض السالسلك في زيادة الستيفيوسايد	30
9-3	التصميم التجريبي و التحليل الإحصائي	31
4	النتائج والمناقشة	32
1-4	مرحلة التعقيم	32
1-1-4	تأثير تراكيز من هايبوكلورات الصوديوم والمدد الزمنية في تعقيم العقد المفردة	32
2-1-4	تأثير تراكيز مختلفة من هايبوكلورات الصوديوم والمدد الزمنية في نسبة الإستجابة للعقد المفردة	33
2-4	تجارب الإكثار الدقيق	34
1-2-4	تأثير تراكيز من البنزل ادنين في تضاعف العقد المفردة	34
1-1-2-4	ارتفاع النبات	34
2-1-2-4	عدد الافرع	34
3-1-2-4	عدد الاوراق	34
2-2-4	تأثير تراكيز من الكاينتين في تضاعف العقد المفردة	36
1-2-2-4	ارتفاع النبات	36
2-2-2-4	عدد الافرع	36
3-2-2-4	عدد الاوراق	36
3-4	تأثير نفثالين حامض الخليك في تجذير الأفرع	37
1-3-4	متوسط عدد الجذور (جذر فرع$^{-1}$)	37
2-3-4	متوسط طول الجذور (سم)	38
4-4	أقلمة النبيتات الناتجة من مرحلة التجذير	39
5-4	تجارب استحثاث الكالس	40
1-5-4	استحثاث الكالس بإضافة تراكيز من نفثالين حامض الخليك	40

1-1-5-4	النسبة المئوية لتكون الكالس	40
2-1-5-4	لون الكالس	40
3-1-5-4	قوام الكالس	40
4-1-5-4	حجم الكالس	40
2-5-4	استحثاث الكالس بإضافة تراكيز من 2,4-D	41
1-2-5-4	النسبة المئوية لتكون الكالس	41
2-2-5-4	لون الكالس	41
3-2-5-4	قوام الكالس	41
4-2-5-4	حجم الكالس	42
6-4	تجارب اختبار نمو الزروعات في مُفاعل الغمر المؤقت	43
1-6-4	تجربة إضافة نوعين من السايتوكاينين في تضاعف نبات الستيفيا في المُفاعل المُصنع مختبرياً	43
1-1-6-4	ارتفاع الافرع	43
2-1-6-4	عددالافرع	43
3-1-6-4	عددالاوراق	44
2-6-4	تجربة التداخل بين السكروز و BA في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد	46
1-2-6-4	ارتفاع النبات	46
2-2-6-4	عدد الافرع	47
3-2-6-4	عدد الاوراق	48
7-4	تأثير حامض السالسلك في نمو نبات الستيفيا في مزارع الغمر المؤقت للمُفاعل المُصنع والمستورد	50
1-7-4	ارتفاع النبات	50
2-7-4	عدد الافرع	51
3-7-4	عدد الاوراق	51
8-4	تقدير محتوى الستيفيوسايد في نباتات الستيفيا النامية على الوسط الصلب والسائل والمؤقلمة في الحقل	53
1-8-4	تقدير محتوى الستيفيوسايد في نباتات الستيفيا النامية في الوسط الصلب والمؤقلمة في الحقل	53
2-8-4	تقدير محتوى الستيفيوسايد في نباتات الستيفيا النامية على الوسط السائل	60
1-2-8-4	تأثير إضافة BA مع السكروز وتداخلهما في محتوى النبات من الستيفيوسايد في مزارع مُفاعل الغمر المؤقت المستورد	60
2-2-8-4	تأثير حامض السالسلك عند اضافته إلى الوسط الغذائي لنوعين من مُفاعلات الغمر المؤقت	69
5	الاستنتاجات والتوصيات	77
1-5	الإستنتاجات	77

2-5	التوصيات	77
6	المراجع	78
1-6	المراجع العربية	78
2-6	المراجع الأجنبية	79
7	الملاحق	98

قائمة الجداول

الرقم	عنوان الجدول	الصفحة
1	المكونات الكيميائية للوسط MS (في لتر واحد) الجاهز من شركة Hi-Media	21
2	المقياس النظري لشدة الإستجابة النباتية لاستحثاث الكالس	24
3	ظروف الفصل المتبعة في تقدير الستيفيوسايد عن طريق جهاز HPLC	25
4	تأثير تراكيز هيبوكلورات الصوديوم والمدة الزمنية في النسبة المئوية للتعقيم لعقد نبات الستيفيا بعد مرور اسبوعين من الزراعة على وسط MS	32
5	تأثير تراكيز هيبوكلورات الصوديوم والمدة الزمنية في نسبة الإستجابة لنبات الستيفيا بعد مرور اسبوعين من الزراعة على وسط MS	33
6	تأثير تراكيز من BA في صفة ارتفاع النبات، وعدد الأفرع، وعدد الأوراق بعد اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS	35
7	تأثير تراكيز من Kin في صفة ارتفاع النبات، وعدد الأفرع، وعدد الأوراق بعد اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS	36
8	تأثير تراكيز من NAA في صفة عدد للجذور، وطول الجذور بعد اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS	38
9	تأثير الأوكسين NAA في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس ولون وقوام وحجم الكالس من ورقة نبات الستيفيا بعد مرور اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS	40
10	تأثير الأوكسين 2,4-D في النسبة المئوية لتكون الكالس ولون وقوام وحجم الكالس بعد اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS	42
11	تأثير استخدام تراكيز من BA و Kin في صفة ارتفاع الافرع، و عدد الأفرع، وعدد الأوراق في المُفاعل المُصنع مختبرياً بعد اربعة أسابيع من الزراعة	44
12	تاثير اضافة السكروز والبنزل ادنين والتداخل بينهما في صفة ارتفاع الافرع بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS باستخدام مفاعل الغمر المؤقت المستورد	46
13	تاثير اضافة السكروز والبنزل ادنين والتداخل بينهما في صفة عدد الافرع بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS باستخدام مفاعل الغمر المؤقت المستورد	47
14	تاثير اضافة السكروز والبنزل ادنين والتداخل بينهما في صفة عدد الاوراق بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS باستخدام مفاعل الغمر المؤقت المستورد	48
15	تاثير نوع المفاعل الحيوي وحامض السالسلك والتداخل بينهما في صفة ارتفاع الافرع بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS الحاوي على تركيز 90 غم من السكروز و1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA	50

16	تاثير نوع المفاعل الحيوي وحامض السالسلك والتداخل بينهما في صفة عدد الافرع بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS الحاوي على تركيز 90 غم من السكروز و1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA	51
17	تاثير نوع المفاعل الحيوي وحامض السالسلك والتداخل بينهما في صفة عدد الاوراق بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS الحاوي على تركيز 90 غم من السكروز و1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA	52
18	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات الحقلي المؤقلم	56
19	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق الوسط الصلب مضاف له BA	57
20	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من الوسط الصلب الخالي من الإضافة	58
21	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من الكالس المزروع على وسط MS مضاف له NAA من تركيز 3 ملغم لتر$^{-1}$	59
22	تأثير BA والسكروز وتداخلهما في محتوى الأفرع من الستيفيوسايد (مايكروغم غم$^{-1}$) عند الزراعة في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد بعد مرور اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS	60
23	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له السكروز 30 مع وسط خالٍ من منظمات النمو	63
24	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له السكروز 60 مع وسط خالٍ من منظمات النمو	64
25	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف السكروز 90 مع وسط خالٍ من منظمات النمو	65
26	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف السكروز 30 مع وسط مضاف له BA	66
27	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له السكروز 60 مع وسط مضاف له BA	67
28	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له السكروز 90 مع وسط مضاف له BA	68
29	تأثير حامض السالسلك المضاف له 90 غم سكروز مع 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA لنوعين من مُفاعلات الغمر المؤقت في زيادة محتوى الأوراق من الستيفيوسايد	69

30	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له 90 غم السكروز مع وسط BA مع تركيز 10 ملغم لتر$^{-1}$ SA	71
31	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له 90 غم سكروز مع BA مع تركيز 20 ملغم لتر$^{-1}$ SA	72
32	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له 90 غم سكروز مع وسط BA مع تركيز 30 ملغم لتر$^{-1}$ SA	73
33	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً المضاف له 90 غم السكروز مع وسط BA مع تركيز 10 ملغم لتر$^{-1}$ SA	74
34	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً المضاف له 90 غم السكروز مع وسط BA مع تركيز 20 ملغم لتر$^{-1}$ SA	75
35	زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً المضاف له 90 غم السكروز مع وسط BA مع تركيز 30 ملغم لتر$^{-1}$ SA	76

قائمة الأشكال

1	تصنيف المُحفزات اللاأحيائية	12
2	الطرائق المُختلفة لتحقيق الإنتاج المثالي لمركبات الأيض الثانوي	13
3	نبات الستيفيا المستخدم في التجربة	20
4	تقطيع الأجزاء النباتية قبل إجراء عملية التعقيم	22
5	منحنى المحلول القياسي للستيفيوسايد يتوضح فيهِ زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة	26
6	أجزاء مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المُصنع من شركة Margareta Welander	27
7	طريقة صعود السائل في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد ونزوله	27
8	مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع في مختبرالأنسجة النباتية / قسم البستنة وهندسة الحدائق/ جامعة ديالى	28
9	الأجزاء النباتية داخل مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً في مختبر الأنسجة النباتية التابع لكلية الزراعة / جامعة ديالى	29
10	نبات الستيفيا A، بعد مرور أسبوعين من التعقيم ، B بعد مرور اربعة أسابيع من التعقيم	33
11	تأثير تراكيز BA (ملغم لتر$^{-1}$) في تضاعف نبات الستيفيا بعد مرور اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS	35
12	نمو الجذور بعد اربعة أسابيع من الزراعة على تراكيز من NAA على وسط MS	38

13	مرحلة الأقلمة: A مرحلة التقسية، B نبات الستيفيا بعد المرور بمرحلة التقسية وصولاً إلى مرحلة النبات المؤقلم بعد مرور اربعة أسابيع	39
14	الكالس المتكون من استخدام تراكيز مختلفة من NAA ملغم لتر $^{-1}$ بعد مرور اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS	41
15	الكالس المتكون بعد اربعة أسابيع من الزراعة نتيجة استخدام تراكيز من 2,4-D على وسط MS	42
16	عدد افرع نبات الستيفا المتضاعف في المُفاعل المُصنع مختبرياً بعد مرور اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS السائل	44
17	عدد الافرع لنبات الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المزروع على وسط MS السائل	49
18	محتوى عينات النبات من الستيفيوسايد (مايكروغم غم $^{-1}$)	54
19	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق النبات الحقلي المؤقلم	56
20	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا المجهز بتركيز 1.0 ملغم لتر $^{-1}$ BA	57
21	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا المرزوع في الوسط الصلب الخالي من الإضافة	58
22	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة كالس الوسط الصلب	59
23	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق نبات الستيفيا في وسط MS حاوٍ على تركيز 30 غم سكروز	63
24	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق نبات الستيفيا في وسط MS حاوٍ على تركيز 60 غم سكروز	64
25	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في وسط MS حاوٍ على سكروز 90 غم	65
26	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في وسط حاوٍ على سكروز 30 غم مع تركيز 1.0 ملغم لتر $^{-1}$ BA	66
27	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في وسط حاوٍ على 60 غم سكروز مع تركيز 1.0 ملغم لتر $^{-1}$ BA	67
28	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في وسط حاوٍ على 90 غم سكروز مع تركيز 1.0 ملغم لتر $^{-1}$ BA	68
29	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المجهز بحامض السالسلك بالتركيز 10 ملغم لتر $^{-1}$	71
30	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المجهز بحامض السالسلك بالتركيز 20 ملغم لتر $^{-1}$	72
31	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المجهز بحامض السالسلك بالتركيز 30 ملغم لتر $^{-1}$	73

32	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً المجهز بحامض السالسلك بالتركيز 10 ملغم لتر $^{-1}$	74
33	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المصنع مختبرياً المجهز بحامض السالسلك بالتركيز 20 ملغم لتر $^{-1}$	75
34	منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المصنع مختبرياً المجهز بحامض السالسلك بالتركيز 30 ملغم لتر $^{-1}$	76

قائمة المختصرات

الاسم العربي	الاسم الانكليزي	المختصر
البنزل ادنين	6 - Benzyl Adenine	BA
الكاينتين	Kinetin	Kin
نفثالين حامض الخليك	Naphthalene Acetic Acid	NAA
ثنائي كلوريد فينوكسي	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D
هايبوكلورات الصوديوم	Sodium Hypochlorite	NaOCl
حامض السالسلك	Salicylic Acid	SA
وسط موراشيج وسكوج	Murashige and Skoog medium	MS
مسار مثيل ايرثيتول فوسفات المسار غير الميفالوناتي	Methylerythritol Phosphate	MEP
دورة حامض الستريك	Tricarboxylic acid cycle	TCA
اصناف الاوكسجين النشطة	Reactive oxygen species	ROS
نظام الغمر الموقت	Temprory Immersion System	TIS
المفاعل المصنع مختبريا	Lab-Made Bioreactor	LMB

1 : المقدمة

يعد الستيفيا نبات طبي للجوانب الاقتصادية و الطبية في النبات (Lemus-Mondaca وآخرون، 2012)، نظرا لاحتوائه على مادة كلايكوسيدات الستيفول ذات التأثيرات الطبية، إذ تعمل على خفض مستوى سكر الدم، وأيضاً خافض لضغط الدم ومادة مُضادة للسرطان وتحمي الأسنان من التسوس، لذا ازاد الاهتمام بدراسة النبات على مستوى عالمي، والإكثار الخضري للنبات ومحاولة زيادة وتحسين نوعية وكمية الكلايكوسيدات في النبات (Karimi وآخرون، 2016)، وبالرغم من الإنتاج الزراعي لهذا المحصول إلاّ أنهُ يعد غير كافٍ للطلب العالمي في الأسواق. بصورة عامة يتم إكثار النبات عن طريق العُقل أو البذور (نسبة الإنبات لا تتجاوز 10%) (Tadhani وRema، 2006)، لذا تم اعتماد تقانة الزراعة النسيجية كوسيلة لإكثار النبات خضرياً (Sahu وSahu، 2013).

يُشير مصطلح المُظهر(elicitor) بصورة عامة إلى أيَّ عامل فيزيائي أو كيميائي قادر على تحفيز أو حث الدفاعات النباتية للخلية أو النسيج عن طريق إنتاج مُركبات الأيض الثانوي (Ramirez-Estrada وآخرون، 2016 ؛ Thakur و Sohal، 2013)

يعد حامض السالسلك أحد منظمات النمو النباتية والذي ينتج بصورة طبيعية في النبات لحماية النبات ضد الاجهادات، وأيضاً يعد أحد المظهرات التي يتم إضافتها للنبات خارجياً أو إلى الوسط لحث و تحسين النبات على إنتاج مركبات الأيض الثانوي (Mahdi وآخرون، 2021).

يستخدم السكروز في الزراعة النسيجية كمصدر للكاربون، لأنّ السكروز هو أكثر الكاربوهيدرات الموجودة في عصارة اللحاء وكذلك يزود النبات بالطاقة وبناء الخلايا ومنظم للجهد الازموزي في الوسط الغذائي (Cui وآخرون، 2010)،

استخدام طريقة الوسط السائل في المُفاعلات الحيوية أحدى الاستراتيجيات المتبعة في اكثار الأنواع النباتية متجاوزاً بذلك الحدود والمشاكل الموجودة في الوسط شبه الصلب (Semi-Solid Media) عن طريق اختصار الوقت والجهد في العمل اليدوي في نقل الزروعات وتحضير الأوساط (De Carlo و آخرون،2021)، مما يساهم في تحسين متوسط النمو للمزارع وزيادة إنتاج مركبات الأيض الثانوي عن طريق التحكم في مغذيات الوسط، والتحكم في فترات الغمر(Steingroewer وآخرون، 2013 ؛ Yancheva وآخرون، 2019). لذا تهدف الدراسة إلى

1 - الإكثار الدقيق لنبات الستيفيا

2 - استحثاث الكالس باستخدام منظمات النمو.

3- نمو الستيفيا باستخدام نوعين من مفاعلات الغمر المؤقت (المستورد والمُصنع مختبرياً)

4 - دور الزراعة في الوسط الصلب و الوسط السائل وتقدير الستيفيوسايد في اوراق النبات

5 - دور إضافة حامض السالسلك والسكروز في زيادة محتوى الستيفيوسايد باستخدام نوعين من مفاعلات الغمر المؤقت

2 : مراجعة المصادر

2- 1: الوصف النباتي لنبات الستيفيا

الاسم العلمي لنبات الستيفيا *Stevia rebaudiana* Bertoni، أما الاسم الإنكليزي للنبات فهو Sugar Bush أي شجيرة السكر وهو نبات عشبي مُعمَّر ينتمي إلى العائلة النجمية Asteraceae (Tanaka، 1982)، موطنه الأصلي امريكا الجنوبية في الباراغواي والبرازيل، وأيضاً يُزرع في الصين و جنوب غرب آسيا (Anbazhagan واخرون، 2010). يُوجد في العالم حوالي 200 نوعاً ولكن النوع Rebaudiana هو النوع الوحيد الذي تكون أوراقه حُلوة المذاق (Shivanna وآخرون، 2013)، ويُعرف النبات بأوراق العسل (honey leaves)، الأوراق الحلوة (Sweet Leaves) لوجود مادة كلايكوسيدات الستيفول (Steviol glycoside) التي تكون حلاوتها أكثر من السكر 100 إلى 300 مرة (Maiti و Purohi، 2008 ؛ Lemus-Mondaca وآخرون، 2012). الأوراق ذات شكل بيضوي ذات حافة مسننة طولها 3-5 سم، وعرضها 1-2 سم، وموقعها على الساق بشكل متقابل، وتحتوي من الأسفل على زغب. يحتوي الساق على الزغب والجذور ليفية قريبة من سطح التربة (Dwivedi، 1999).

2 - 2 : تصنيف النبات علمياً (yadav وآخرون، 2011)

Kingdom - Plantae (Plants)

Sub Kingdom - *Tracheobionta (Vascular plant)*

Super division - Seed plant.*(Spermatophyta)*

Division - *Angiospermae (Flowering plant)*

Class - *Magnoliophyta (Dicotyledons)*

Sub class - *Asteridae*

Order - *Asterales*

Family - *Asteraceae (composetae)*

Genus- *Stevia*

Species - *Rebaudiana* Bertoni

2- 3 : الأهمية الطبية لنبات الستيفيا

استخدم الإنسان قديماً النباتات ليس كمصدر غذاء فقط، وإنمّا للحصول على المنافع الطبية أيضاً، وتعد النباتات بشكل عام مصدراً فريداً لبعض المُركبات التي يَصعب تحضيرها في المختبر، وإذا أمكن تصنعيها فكُلفتها تكون باهظة (Dixon و Gonzales، 1994)، وأَشارت العديد من الدراسات إلى زيادة الطلب على النباتات الطبية بسبب زيادة الوعي الصحي كونها أكثر أماناً من العقاقير المُصنعة (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 1988)،

أُستخدمت أوراق الستيفيا في تغذية الإنسان إذ أنَّ حلاوة السكر في النبات تكون بحدود 100 - 300 مرة بقدر السكر العادي مع سُعرات قليلة بحدود 2.7 سعرة حرارية (koubaa و آخرون، 2015). إنَّ استهلاك السكر بكميات كثيرة أدى إلى مشاكل صحية كبيرة، لذا زاد الطلب على استهلاك مواد ذات سعرات حرارية قليلة (Lemus-Mondaca وآخرون، 2012). يُستخدم سكر الستيفيا كبديل للسكر للسيطرة والحفاظ على نسبة السكر في الدم لدى مرضى السكري والسمنة وارتفاع ضغط الدم، وتأثير وقائي للكلى وتعزيز صحة الفم (Abou-arab و آخرون، 2010).

يُعد مرض السكري من النوع الثاني من أكبر الاهتمامات التي تُواجه العالم والتي تتعلق بمقاومة الإنسولين، وزيادة مستوى سكر الدم، و يمكن السيطرة على مستوى سكر الدم عن طريق أخذ كميات قليلة من السكريات، وبسبب احتواء نبات الستيفيا على سعرات حرارية قليلة، فإنّه أثبت فعاليته لدى مرضى السكري النوع الثاني (Gregersen وآخرون، 2004).

2- 4 : المركبات الكيميائية في النباتات

تحتوي الخلايا النباتية على نواتج الأيض الأولي (Primary Metabolites)، وتنتج من عملية التمثيل الضوئي والتنفس، وهي مُهمة في بناء مكونات الخلايا مثل الكاربوهيدرات والبروتينات واللبيدات (Ramawat، 2004 ؛ Taiz و Zeiger، 2006)، و تدخل هذه المواد كمواد أولية في غذاء الإنسان والحيوان، وفي الصناعة مثل صناعة الزيوت والصابون والمنظفات وغيرها (Vanisree وآخرون، 2004).

أيضاً تحتوي الخلايا على نواتج الأيض الثانوية (Secondary Metabolites) والتي هي مُركبات غير أساسية ولا تدخل في بناء الخلايا، وتشمل مواداً مثل القلويدات والكلايكوسيدات والكلايكوسيدات السكرية والأصباغ والتانينات و الزيوت وغيرها (Memelink، 2005). قَسم Taiz و Zeiger (2010) مُركبات الأيض الثانوي إلى ثلاث مجموعات رئيسية وهي التربينات والفينولات والمركبات التي تحتوي على النتروجين، وتنطوي تحت هذه المجموعات آلاف من المركبات الأيضية الثانوية، التي يمكن أنّ تزداد تحت تأثير المُحفزات الأحيائية واللاأحيائية. بَين Ramawat (2004) أنَّ مركبات الأيض الثانوي تنتج في النبات بكميات أقل من مركبات الأيض الأولي، ويستفاد منها النبات في حماية نفسهُ من الحيوانات والفطريات والحشرات والبكتريا والفايروسات، إذ تعمل كوسيلة دفاعية ضد المسببات المرضية.

مُركبات الأيض الثانوي هي نواتج لمركبات الأيض الأولي، إذ لها أوزان جُزيئية مُنخفضة وتُنتَج من مسارات الأيض الأولي مثل مسار MEP، ومسار حامض الميفالونك، ودورة حامض الستريك TCA، ومسار حامض الشيكميك (Taiz و Zeiger، 2010)، وإن هذهِ المُركبات لا تلعب دوراً حيوياً في بِناء الخلايا، وإنما تعمل على حماية النبات من جهة ودور وسيط كيميائي مثل الروائح الجاذبة للحشرات في عملية التلقيح والوان الأزهار من جهة أُخرى (Razdan، 2003). يُمكن الاستفادة من مركبات الأيض الثانوي اقتصادياً كمواد صيدلانية وطبية مثل مُضادات الجراثيم والعطور والسُموم، ومواد مُنشّطة، وحماية وظائف جسم الإنسان عن طريق تعزيز الجهاز المناعي، وحماية الجسم من الجُذور الحُرة، وقتل الجراثيم وبالتالي المحافظة على صحة الإنسان (Anulika وآخرون، 2016).

2 - 5 : التعقيم السطحي للأجزاء النباتية

يُعد التعقيم السطحي للأجزاء النباتية أمراً حيوياً لنجاح الزراعة النسيجية، إذ يتم استخدام هذه التقانة لتطهير النباتات الأم من الجراثيم (البكتريا و الفطريات) قبل الشروع في عملية الإكثار. عملية التعقيم تتم عن طريق غسل النباتات الأم وتطهيرها بوساطة مواد كيميائية خاصة تقتل الجراثيم الموجودة على السطح الخارجي للنباتات وهذا يؤمن بقاء النباتات الأم خالية من الجراثيم التي يمكن أن تؤثر على عملية النمو والتطوير للأنسجة النباتية (Smith، 2013).

يُساعد التعقيم السطحي أيضاً على منع نمو الفطريات على الأنسجة النباتية المُستخدمة في الزراعة النسيجية، وبالتالي يحد من مخاطر العدوى والإصابة بالأمراض ويُساعد على توفير نمو وتطور أنسجة نباتية سليمة وصحية، وبشكل عام يُعد التعقيم السطحي جزءاً أساسياً من عملية الزراعة النسيجية، إذ يُساعد على زيادة فرص نجاح الأنسجة النباتية المتضاعفة ذات الجودة العالية والمعافاة من الأمراض والعدوى (Caponetti وآخرون، 2005).

بَين Zara وآخرون (2014) امكانية تعقيم العُقد لنبات الستيفيا عن طريق استخدام تركيز 1% من هايبوكلورات الصوديوم لمدة 10 دقائق يتبعها تعقيم بمادة كلوريد الزئبق بتركيز 0.01 %(w: v) لمدة 1 دقيقة، إذ أعطى نسبة نجاح بلغت 100 %. أجرى Ahmed وآخرون (2018) تجربة تعقيم لبيان تأثير كل من كلوريد الزئبق والايثانول، وهايبوكلورات الصوديوم في مدى نجاح تعقيم العُقد النباتية وأظهرت النتائج أنَّ تعريض الأجزاء النباتية إلى كلوريد الزئبق بتركيز 0.1 %(w : v) لمدة دقيقتين متبوعاً بغمر العُقد بالايثانول 70% لمدة دقيقة واحدة، وهايبوكلورات الصوديوم بتركيز 15% لمدة 15 دقيقة كان له الأثر في نجاح عملية التعقيم وحصوله على أجزاء نباتية خالية من الملوثات.

2 - 6 : الإكثار الدقيق لنبات الستيفيا

يُعرف الإكثار الدقيق بأنه احد التطبيقات الرئيسة والمُهمة في تقانة الزراعة النسيجية، لإنتاج اعداد كبيرة من النباتات خلال مدة زمنية قصيرة من خلال التضاعف الخُضري والتبرعم الجانبي وتكوين الأجنة الجسمية (Smith، 2013 ؛ Ramawat، 2004).

من المشاكل التي تواجه المُزارعين عند زراعة نبات الستيفيا في الحقل كونه من النباتات المتباينة الأمشاج، فطبيعة عدم التوافق الذاتي للأزهار تؤدي إلى نقص في عملية التلقيح، وبسبب حيوية البذور الضعيفة أدت إلى كون الإكثار بالبذور عملية غير كفوءة (Tadhani و Rema ، 2006 ؛Rathi و Arya، 2009)، أما الإكثار بوساطة البذور (إنْ وجدت) لا يَسمح بإنتاج نباتات متشابهة الأمشاج وبذلك تأثيرها على مستوى الحلاوة في النبات (Tamura وآخرون، 1984). لهذه الأسباب فالزراعة النسيجية الطريقة الوحيدة والسريعة للإكثار السلالي السريع، إذ تُشير الدراسات أنَّ القمم النامية والعُقد الساقية هي الأكثر استعمالاً في تكثير النبات عن طريق الزراعة النسيجية (Noordin و آخرون، 2012).

2 – 7 : تأثير السايتوكاينيات في تضاعف أفرع نبات الستيفيا

السايتوكاينينات هي قواعد نتروجينية ذات أوزان جزيئية عالية، إذ تحتوي على سلسلة جانبية من كاربون وهيدروجين متصلة بذرة نتروجين خارجية في قمة حلقة البيورين (Sakakibara، 2006)، ولها تأثيرات فسيولوجية إذ تعمل على كسر السيادة القمية، وتحفز البراعم وتُحفز انقسام الخلايا (Taiz وZeiger، 2006)، ومن أنواع السايتوكاينينات المستخدمة في الزراعة النسيجية Zeatin و6- benzyladenine و2 – Isopentyladenine و Kinetin و Thidiazuron (TDZ) (Davies، 1995).

اشار Abd El-Motaleb وآخرون (2013) الى تاثير استخدام BA بالتراكيز 0.0 و 0.5 و 0.1 و2.0 و 4.0 ملغم لتر$^{-1}$ ،ان اعلى متوسط للافرع المتضاعفة عند التركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ بمقدار 11.4 فرع واعلى متوسط لارتفاع الافرع بلغ 6.25 سم واعلى عدد اوراق بلغ 12.8 ورقة فرع$^{-1}$.

بَين Razak وآخرون (2014) أنَّ تركيز 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ من BA متداخلاً مع 0.25 ملغم لتر$^{-1}$ من Kin كان له الأثر في إعطاء أعلى عدداً من الأفرع المتكونة على نبات الستيفيا بمتوسط 7.82 فرع نبات$^{-1}$. اشار Mehta و Dadhich (2015) إنّ تركيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ من BA قد أعطى أعلى متوسط من الأفرع بلغ 4.11 فرع نبات$^{-1}$ وأعلى متوسط لارتفاع النبات بلغ 6.54 سم.

توصل Ramírez-Mosqueda وآخرون (2016) الى أنَّ أفضل تركيز لتضاعف الأفرع هو 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ من BA إذ أعطى متوسط أفرع بلغ 4.6 فرع نبات$^{-1}$ في حين كان أعلى متوسط لارتفاع النبات 2.05 سم لتركيز 1 ملغم لتر$^{-1}$ لمنظم النمو نفسه(BA)، في حين أنَّ أقل متوسط لتضاعف الأفرع في الوسط الخالي من الأضافات بلغ 1.5 فرع نبات$^{-1}$. عند دراسته لتأثير كل من BA بالتراكيز 0.1 و0.5 و 1.0 و2.0 ملغم لتر$^{-1}$ و Kin 0.1 و0.5 و 1.0 و2.0 ملغم لتر$^{-1}$ في تضاعف الأفرع بين Yücesan وآخرون (2016) أنَّ إستجابة نبات الستيفيا للتضاعف كانت متساوية إذ أعطى كل تركيز 2 فرع نبات$^{-1}$ وأعطى التركيز1.0 ملغم لتر$^{-1}$ من Kin أعلى متوسط لارتفاع الافرع بلغ 3.1 سم، في حين أعطى التركيز 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ من BA أقل متوسط لارتفاع الافرع بلغ 1.3 سم.

وجد Kumar وآخرون (2017) عند دراستهم تأثير تراكيز مختلفة من BA و Kin و TDZ و G3 على تضاعف أفرع نبات الستيفيا أنَّ تركيز 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ أعطى أعلى متوسطاً للتضاعف بعد 21 يوماً من الزراعة بلغ 17.8 فرع نبات$^{-1}$ للبنزل ادنين و اعطى الكاينتين بالتركيز 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ 27.6 فرع نبات$^{-1}$ واعطى Zeatin بالتركيز 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ معدل افرع بلغ 25.8 فرع نبات$^{-1}$ و اعطى TDZ بالتركيز 0.25 ملغم لتر$^{-1}$ متوسط افرع بلغ 32 فرع نبات$^{-1}$ و اعطى GA_3 بالتركيز 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ متوسط افرع بلغ 29.4 فرع نبات$^{-1}$.

توصل Deshmukh وآخرون (2017) عند المقارنة بين تراكيز مختلفة من BA و Kin هي 0.0 و 1.0 و2.0 و 3.0 و 5.0 ملغم لتر$^{-1}$ ان تركيز 5 ملغم لتر$^{-1}$ من BA له الأثر في إعطاء أعلى عدد افرع لنبات الستيفيا بلغت 9-10 فرع نبات$^{-1}$ عند استخدامه بصورة منفردة، أما عند إضافة تركيز 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ من BA متداخلاً مع Kin بتركيز 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ قد أعطى نسبة أعلى من التضاعف بلغت 20-22 فرع نبات$^{-1}$.

أشار Khierallah و Al-Obaidy (2017) الى أنَّ استخدام تركيز 0.3 ملغم لتر$^{-1}$ من Kin أعطى أعلى متوسطاً للتضاعف بلغ 4.2 فرع نبات$^{-1}$ في حين أنَّ استخدام BA بتركيز 0.1 ملغم لتر$^{-1}$ قد أعطى تضاعفاً بلغ 2.9 فرع نبات$^{-1}$ مقارنة مع المعاملات الأخرى. تمكن Javed وآخرون (2017) من الحصول على تضاعف من العُقد المفردة باستخدام أنواع من السايتوكاينينات BA و Kin وTDZ بتركيز 1 و 2 ملغم لتر$^{-1}$ لكل منظم نمو بالاضافة الى معاملة المقارنة، و بينت النتائج التي حصل عليها الباحث أنَّ أعلى تضاعفاً حصل عند المعاملة بتركيز 1ملغم لتر$^{-1}$ Kin بمتوسط 5.5 فرع نبات$^{-1}$ يليه تركيز 1 ملغم لتر$^{-1}$ من BA بمتوسط 5.2 فرع نبات$^{-1}$.

نجح Yesmin (2019) من التوصل إلى أفضل تركيز لتضاعف القمم النامية عند مستوى 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ من BA بلغ 2.13 فرع نبات$^{-1}$، اما عند استخدام Kin فان اعلى متوسط للتضاعف عند تركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ بلغ 6.53 فرع نبات$^{-1}$ بنسبة إستجابة 89 %. في حين كان تأثير التداخل بين BA و NAA بالتركيز 1.5 و0.5 ملغم لتر$^{-1}$ على التوالي الاثر في تكوين أعلى نسبة من التضاعف بلغت 2.21 فرع نبات $^{-1}$ بنسبة إستجابة 73% مقارنة ببقية التراكيز.

أشار Hilo وآخرون (2020) الى ان أستخدام مُنظم النمو BA بتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ متداخلاً مع IBA بتركيز0.3 ملغم لتر$^{-1}$ قد أعطى أعلى متوسط من الأفرع المتكونة بلغ 3.10 فرع نبات$^{-1}$.

2 – 8 : دور الأوكسينات في تجذير أفرع نبات الستيفيا

الأوكسينات عبارة عن أحماض عضوية ذات أوزان جزيئية عالية، وتكون حاوية على حلقة من الأندول، ولها تأثيرات كبيرة في العمليات الفسلجية عند التراكيز القليلة، ومن الأوكسينات 2,4-D (2,4-Dichloro phenoxyacetic) و NAA (Napthalene acetic acid) و الأوكسين الطبيعي IAA (Indol acetic acid) و IBA (Indol butyric acid) (Davies، 1995 ؛ George و آخرون، 2008).

تُعد الأوكسينات من هرمونات النبات الأساسية التي تتحكم في العديد من عمليات نمو النبات و تلعب الأوكسينات دوراً حيويًا في تجذير النباتات، إذ تساعد في تنشيط وتحفيز نمو الجذور وتنظيم عملية التجذير (Han و آخرون، 2009)، عن طريق تنظيم تكوين الجذور والتي تتضمن ثلاث مراحل أساسية تبدأ بالحث (Induction) وفيها تستعد الخلايا للأنقسام، وبعدها تبدأ عملية النشوء (Initiation) وخلال هذه العملية تباشر الخلايا بالإنقسام وبعدها تبدأ الجذور بالبروز، إذ أنَّ تمايز الخلايا البرنكيمية يؤدي إلى تكوين الأعضاء عن طريق إجبار الخلايا والأنسجة للخضوع إلى تغيرات تؤدي إلى إنتاج تراكيب أحادية القطبية تسمى Primordia إذ ترتبط أوعيتها الناقلة مع الأوعية الناقلة للنسيج الذي تكونت منه (الخفاجي، 2014).

أشارت Yesmin (2019) في تجربة تجذير أفرع الستيفيا تم باستخدام NAA وIBA و IAA بالتراكيز0.2 و0.5 ملغم لتر$^{-1}$، وكانت أعلى نسبة للجذور المتكونة على الفرع بلغت 2.7 جذر فرع$^{-1}$ بالتركيز 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ وأقل عدد جذور متكونة بلغت 1.8 جذر فرع$^{-1}$ عند التركيز0.5 ملغم لتر$^{-1}$ NAA، وأيضاً حصلت على أعلى نسبة لطول الجذر بلغت 3.9 سم عند التركيز 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ ، في حين حصلت على أقل نسبة لطول الجذوربلغت 3.6 سم عند التركيز 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ NAA.

تمكن Javed وآخرون (2017) من تجذير أفرع الستيفيا من خلال استخدام NAA و IAA و IBA بالتراكيز 0.25 و 0.5 و 1.0 ملغم لتر$^{-1}$، وحصل على اعلى طول للجذور بلغ 5.5 سم عند التركيز 0.25 ملغم لتر$^{-1}$ من NAA واقل طول للجذور لنفس الاوكسين (NAA) بالتركيز

0.5 ملغم لتر$^{-1}$ بلغ 2.6 سم.اما بالنسبة لعدد الجذور فان اعلى عدد جذور متحصل عليه كان في المعاملة 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ اذ بلغ 19.1 جذر فرع$^{-1}$ و اقل عدد افرع بلغ 4.8 جذر فرع $^{-1}$ للاوكسين IAA بالتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$.

2 – 9 : استحثاث الكالس

يُمكن تعريف الكالس بأنَّه كُتلة من خلايا برنكيمية غير متخصصة ومفككة وتنتج طبيعياً نتيجة لإصابة النبات ببعض المؤثرات الأحيائية وغير الأحيائية (Ikeuchi و آخرون، 2013)، إذ يمكن تحفيز أنواع عديدة من النباتات على استحثاث الكالس بإضافة نسبة متوازنة من الأوكسينات (Auxins) و السايتوكاينينات (CytoKinins)، وأيضاً بالتلاعب بنسب منظمات النمو المُضافة، ويمكن تكوين الجذور من الكالس بزيادة نسبة الأوكسين إلى السايتوكاينين، وتكوين الأفرع الخضرية بزيادة نسبة السايتوكاينين إلى الأوكسين (Skoog و Miller، 1957). يُعد تكون الكالس خطوة أولى في تجارب زراعة الأنسجة النباتية لذا فمن الضروري حث الكالس من الأجزاء النباتية المختلفة مثل الأوراق والسيقان و الجذور والبذور ... الخ (Smith، 2013).

ذَكر Smith (2013) أنَّ بالإمكان إضافة الأوكسين بصورة منفردة والحصول على نتائج أفضل في بعض الحالات، بسبب أنَّ النبات يحتوي أصلاً على سايتوكاينين بصورة كافية لنشوء الكالس واشار فهمي (2003)، وإنَّ الكالس المتكون يقترن بأهداف الدراسة التي يُراد الوصول إليها، ويختلف الكالس حسب القوام فقد يكون هشاً أو صلباً أعتماداً على الجزء النباتي ألذي أخذ منه وبناءً على ماذُكر فقد توصل عدد من الباحثين إلى نتائج في استحثاث الكالس، إذ أشار فهمي (2003) أنَّ إضافة تراكيز عالية من الأوكسينات تعمل على منع او تثبيط نمو الأفرع الجانبية ويتكون الكالس في التراكيز القليلة من الأوكسين وبَين المُختار وآخرون (2010) أنَّ هناك عدة عوامل تؤثر في استحثاث الكالس ونموه، ومنها مصدر الجزء النباتي المستخدم للأستحثاث وطبيعة مكونات الوسط الغذائي.

نجح Ojha و آخرون (2012) في استحثاث الكالس من اوراق نبات الستيفيا عن طريق إضافة 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ من NAA و0.5 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D بعد 3 أسابيع من الزراعة بنسبة إستجابة بلغت 100% . ذكر كُل من Guruchandran و Sasikumar (2013) حُصول إستجابة لتكون الكالس بلغت 100% على وسط مجهز ب 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D و 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ من BA من ورقة نبات الستيفيا.

استخدم Sharma و آخرون (2015) منظم النمو NAA بالتراكيز 1.0 و 1.5 و2.0 و 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ و 2,4-D بـالتراكيز 1.0 و 2.0 و 3.0 و4.0 و5.0 و6.0 ملغم لتـر$^{-1}$، وحصـل علـى أعلـى نسبة مئوية لتكون الكالس من نبات الستيفيا بلغت 100% عند زراعة الأوراق بالتركيز 1.0 ملغم لتـر$^{-1}$ مـن NAA متـداخلا مـع 2,4-D بـالتركيز 1.0 ملغـم لتـر$^{-1}$، إذ كـان الكـالس ذا لـون أبـيض مخضر قليلاً.

أشار Ahmed وآخرون (2018) إلى امكانية الحصول على نسبة نشوء 96% من الكالس عند استخدام توليفة من NAA و2,4-D على اوراق نبات الستيفيا، إذ تم استخدام 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ لكل من NAA و2,4-D.

ذَكر Blinstrubienė وآخرون (2020) أنَّ أفضل نتيجـة متحصـلة مـن زراعـة الورقـة كانـت عند التركيز2 مايكرومول (µM) من NAA، إذ بلغت نسبة الإستجابة 83.3 % بعد اسبوع من الدراسة وبلغت 100% بعد أسبوعين مـن الزراعـة، أمـا النتيجـة المتحصـلة مـن زراعـة قطعـة مـن الساق للتراكيز نفسها (1.0 و2.0 و3.0 مايكرومول) كانت 63.8 % بعد أسبوع من الزراعـة عنـد التركيز 3 ملغم لتر$^{-1}$ من NAA وبلغت أعلى نسبة مئوية للكالس عند التركيز 2 مـايكرومول مـن NAA بعد أسبوعين من الزراعة لقطعة الساق بلغت 91 %.

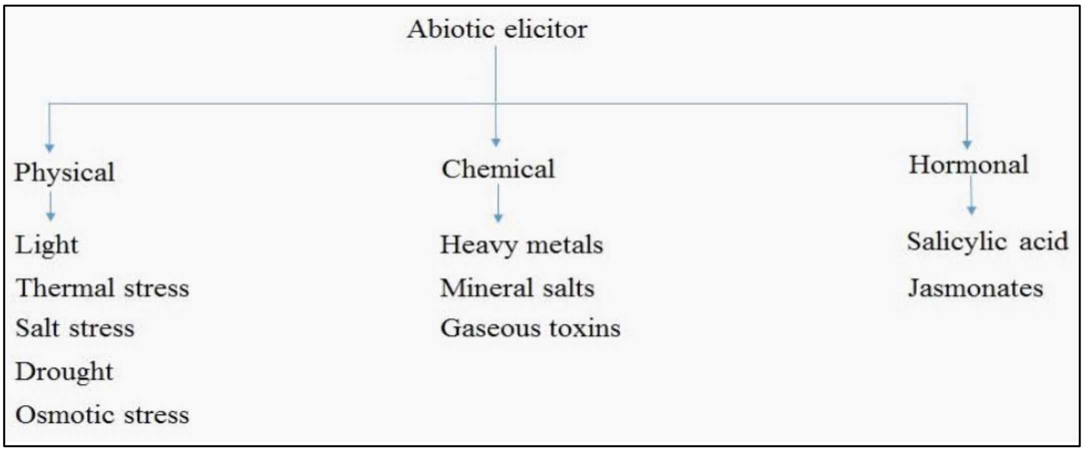
اشار Rahim و Jawad (2021) الـى دور NAA باستحثاث الكـالس بـالتراكيز 0.0 و 1.0 و 2.0 و 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ وحصل على أعلى نسبة لتكون الكالس بلغت 100 % عند التركيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$.

2 - 10 : دور المُحفزات الأحيائية وغير الأحيائية في زيـادة مُركبـات الأيض الثـانوي خارج الجسم الحي

مُركبات الأيض الثـانوي مصـدر فريـد لمُركبـات طبيـة، ومُكمـلات غذائيـة، ومُنتجـات صـناعية، وإنَّ زيادة هذه المُركبات وتراكمُها يعد من ضمن أنظمة الدفاع النباتية وتتحفز بالمُؤثرات الأحيائيـة (Biotic) وغير الأحيائية (Abiotic) (Piasecka وآخرون، 2015 ؛ Namdeo، 2007).

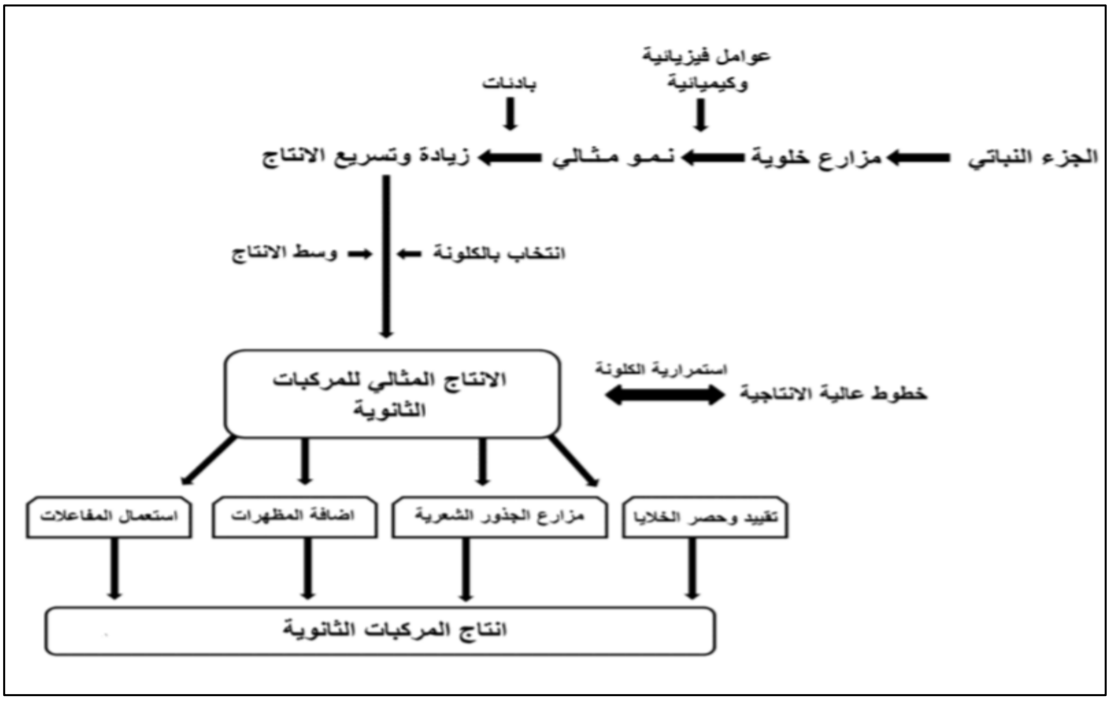
تُقسم المُحفزات الأحيائية إلى مُحفزات بكتيرية (Bacterial)، ومُحفزات فطريـة (fungal)، و مسـتخلص الخميـرة (extract yeast)، والسُـكريات المتعـددة (Polysaccharaids)، (Bajwa وآخرون، 2014)

يُمكن تقسيم المُحفزات اللاأحيائية (Abiotic) كما في الشكل (1) إلى مُحفزات فيزيائية، وتشمل الضوء (Light)، والحرارة (Thermal Stress)، والاملاح (Salt Stress)، والجفاف (Drought)، والجُهد الازموزي (osmotic stress)، أما المُحفزات الكيميائية فتُقسم إلى المعادن الثقيلة (Heavy Metal)، والأملاح المعدنية (Minral salt)، والسموم الغازية (Gasous Toxin)، والمحفزات الهرمونية التي تُقسم بدورها إلى حامض السالسلك (Salicylic acid)، و حامض الجاسمونيك (Jasmonic acid)(Naika و Al-Khayri، 2016).



شكل (1) تصنيف المُحفزات اللاأحيائية (Naik و Al-Khayri، 2016)

ذكر الصُميدعي (2017) إمكانية زيادة مُحتوى النبات من مُركبات الأيض الثانوي عن طريق تنظيم العوامل الفيزيائية والكيميائية عند زراعة النبات خارج الجسم الحي *in vitro* داخل المختبرعن طريق إتباع بعض التقنيات المُختلفة كما في الشكل (2).



شكل (2) الطرائق المُختلفة لتحقيق الإنتاج المثالي لمركبات الأيض الثانوي (الصميدعي، 2017)

2- 11 : مركب الستيفيوسايد

كيميائياً يتكون مُركب الستيفيوسايد من ثلاث جُزيئات من الكلوكوز تمثل الجزء الكلايكوني (Glycone) و جزيئ واحد من Steviol والذي هو عبارة عن Diterpene carboxyl alcohol ،إذ يُمثل الشق اللاكليكوني (Aglycone)(Brandle وTelmer، 2007)، وهو مُركب وفير في أوراق نبات الستيفيا، وأصبح معروفاً بسبب حلاوتهِ التي تبلُغ من 100 – 300 مرة بقدر السكر، ويُستعمل كمُحلي لا يحتوي على سُعرات حرارية في عدد من البلدان ومادة الستيفول ربما تكون ذات منافع طبية وعلاجية لمرضى السكري، ومرضى ارتفاع ضغط الدم، ومضادة للالتهابات، ومادة ضد الأورام، و ضد الإسهال، ومُعززة للنظام المناعي (Chatsudthipong و Muanprasat، 2009).

2- 12: أيض الستيفيوسايد في جسم الإنسان

يُعرف الأيض بأنَّه العملية التي تحدث في جميع الكائنات الحية، وتنتج خلال عملية الأيض طاقة عن طريق هضم المواد الغذائية، ويتحول الغذاء إلى طاقة عن طريق المرور بسلسلة تفاعلات كيميائية، ويتم خلال هذه العملية بناء الخلايا (Chandel، 2021). بَين Shuvo وآخرون (2015) أنَّ أيض Stevioside يتم بشكل كامل دون ضرر أو تأثير على الجسم، إذ أنَّ Stevioside يذوب كلياً في الماء والمحاليل المائية ويطرح من خلال مسارات الاخراج نفسها في جسم الإنسان والحيوان.

عندما يتم هضُم الأوراق فإنَّها تنزل إلى الجهاز الهضمي العلوي الذي يشمل المعدة والأمعاء الدقيقة، وفي هذا الجُزء لا يتم امتصاص Steviol Glycoside، بعد ذلك تَعبُر إلى الأمعاء الغليظة التي يتم عندها إزالة الجزء السُكري من Steviol glycoside عن طريق بكتريا القولون ويتبقى من المُركب هيكل Steviol الذي يُمتص إلى مجرى الدم، بعد ذلك يذهب إلى الكبد الذي يُحولهُ إلى مُركب Steviol Glucuronide الذي يخرُج عن طريق الكِلية كمُركب Steviol Glucuronide (Wingard وآخرون، 1980).

2- 13 : دور حامض السالسلك في زيادة الستيفيوسايد خارج الجسم الحي

حامض السالسلك هو أحد المركبات الفينولية البسيطة التي جَذب العُلماء حول العالم من خلال دورهُ في العديد من العمليات الفَسلجية النباتية ومنها دورهُ في عملية الإنبات، وفتح الثغور وغلقها وتراكم الصُبغات النباتية، وعملية البناء الضوئي، والبناء الحيوي للأثلين ..إلخ (Hayat وAhmed، 2007 ؛ Puranik، 2012). يُعد حامض السالسلك أحد منظمات النمو النباتية التي تلعب دوراً مُهماً في تنشيط أنظمة الدفاع النباتية (Yu وآخرون، 2006)، إذ اسُتخدِم هذا الحامض كمُظهِر(elicitor)لإنتاج مُركبات الأيض الثانوي مثل إنتاج taxol في نبات *Taxus chinensis* (Wang وآخرون، 2007)، وإنتاج tropane alkaloids في نبات *Scopolia parviflora* (Kang و آخرون، 2004)، و مادة jaceosidin و syringing من نبات *Saussurea medusa* (Yu وآخرون، 2006).

تزداد كمية حامض السالسلك بازدياد الاجهاد البيئي وبدورهِ يُزيد من مُستويات المُركبات الثانوية في نبات الستيفيا، ويعمل كمُظهِرعن طريق تحفيز جينات مُرتبطة بعملية البناء الحيوي للستيفيوسايد (Singh وآخرون، 2017). أشار Gadzovska وآخرون (2013) إلى إمكانية

إظهار (elicitation) المُركبات المرغوبة وزياة إنتاجها عن طريق تقانة الزراعة خارج الجسم الحي *in vitro*. بَين Sharma وآخرون (2015)إن حامض السالسلك والمثيل جاسمونيت على الرغم من كونهما هرمونات موجودة في النبات، فإنها تعمل على تحفيز إستجابة النبات للأمراض و الحشرات (Endogenous)، وإنَّ الإضافة الخارجية (Exogenous) لكل من الهرمونين تؤدي إلى تراكم وزيادة في مُركبات الأيض الثانوي.

وضَح كل من Buraphaka وPutalun (2020) دور الإضافة الخارجية (exogenous) لحامض السالسلك بتركيز 2 مليمول إلى زيادة التربينات في نبات *Centella asiatica* عن طريق مسار التحفيز الجيني لبناء التربينات، وزيادة التربينات تؤدي إلى زيادة الفعالية ضد الإلتهابات(Anti-Inflamatory). أشار Mejía-Espejel وآخرون (2018) في تجربتهِ إلى إضافة السالسلك بتركيز 10 و100 ملي مول لكالس نبات الستيفيا واستخدام ألوان مختلفة من الإضاءة هي الأحمر والأزرق والأبيض لمدة 24 ساعة ودرجة حرارة 25-28 م^{O}، ووجَد أنَّ تركيز 100 مايكرومول قد زاد من محتوى الستيفيوسايد بمقدار9.8 مرة مقارنة مع النباتات النامية في البيت الزجاجي.

ذَكَرَ Moharramnejad وآخرون (2019) أنَّ إضافة حامض السالسلك بتركيز 100 مايكرومول إلى وسط الزراعة أدى إلى تحسين إنتاج الستيفيوسايد من 4.1 ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف إلى 19.4 ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف. بَين Thakur وآخرون (2021) إن إضافة SA بالتراكيز 0.5 و 1.0 و 1.5 و 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ إلى الوسط قد أعطى القيم 0.060 و0.120 و0.176 و0.067 ملغم غم$^{-1}$ من الستيفيوسايد. أيَّ أن أفضل نتيجة كانت عند التركيز 1.5 ملغم لتر$^{-1}$.

2 – 14 : دور السكروز في زيادة الستيفيوسايد

يلعب السكروز دوراً حيوياً في تطور النبات من خلال دخوله في مسارات البناء الحيوي وأطلاق الطاقة بالإضافة إلى ذلك فإنَّ السكروز يعمل كمنظم للجينات (gene regulator)(Guleria وآخرون، 2011) كذلك اقتُرح أنَّ النباتات تستجيب لتغيرات محتوى السكروز من خلال التحولات المورفولوجية والتشريحية، وكذلك عن طريق تنظيم تعبير العديد من الجينات عن طريق مسارات نقل الإشارة المختلفة (Koch ، 1996 ؛ Smeekens، 2000) .

أشـار Arora (2010) إلـى دور السكروز كأحد المُركبـات المستخدمة في الزراعـة النسـيجية كمصـدر للكـاربون، وكمصـدر للطاقـة بالإضـافة إلـى ذلـك فـإنَّ تراكيـز السـكروز تـؤثر فـي إنتـاج مركبات الأيض الثانوي.

اشار Gupta وآخرون (2014) إلى أنَّ بعض الاجهادات قد تسبب في تنـاقص معدلات النمو للنبات، لكن تطبيق بعض الاجهادات الكيميائية قد تؤدي إلى تحسين فـي إنتـاج الستيفيوسـايد مقارنـة مع نباتات المقارنة (بدون إضافة مواد كيمياوية)، إضافة إلى ذلك فـإنَّ السـكروز يعمـل علـى تنظيم الجهد الازموزي للخلايا والحفاظ على المـاء فـي الخلايـا، وإنَّ زيـادة تراكيـز السـكروز فـي الوسط تزيد من الضغط الازموزي و يزيد ROS (أنواع الأوكسجين النشط) وجذور الهيدوكسيل وجذور البيروكسايد (Kilayri وBahrany ، 2002). إنَّ مستوى السكر في الوسط يؤثر علـى نمو الأفرع النباتية، وكذلك إنتاج النبات من مركبات الأيض الثانوي (Gürel و Gülşen، 1998)

يعد السكروز من مصـادر الكـاربون الشـائعة الاستخدام في الزراعـة النسيجية (Murashige وSkoog، 1962) ويعتبر التركيز 3% ملائماً لنمو الأفرع وتضاعفها خارج الجسم الحـي مقارنـة مع 2 % و 4 %، إذ أشار Tamura وآخرون (1984) وهم اول الباحثين الذين قامو بإكثار النبات نسيجيا خارج الجسم الحي باستخدام السكروز 3%

وجد Banerjee و Sarkar (2009) أنَّ استخدام السـكروز بحـدود 4 % كـان جيداً فـي تضـاعف الأجنة من كالس نبات الستيفيا. أشار Jala (2012) الى استخدام تراكيز من السكروز(0 و 3 و 4 و 5 و 6 و 7 %) في تضـاعف أفرع نبـات *Curcuma longa* L إنَّ أفضـل تضـاعف للأفرع كان عند التركيز 6 % سكروز بإعطاء 13.4 فرع وأعلى متوسطاً للأوراق بلغ 56.8 ورقة. وجد Modi وآخرون (2012) أنَّ تقليل السكروز إلى 1% له فائدة في إعطـاء أفضـل نتيجـة لتضـاعف نبـات السـتيفيا. وجـد Nower (2014) أنَّ الفركتـوز بتركيـز 4 % قـد أعطـى أفضـل تضـاعفاً للأفرع، بينما تركيز الفركتوز 2% أعطى أفضل نسبة للأوراق المتكونة.

2- 15 : المُفاعلات الحيوية

عّرف Georgiev وWeber (2014) المُفاعل الحيوي على أنَّـه وعـاء (Vessle) مخصـص للزراعـة يحتـوي علـى نظـام تحكـم أوتمـاتيكي، ويكـون وعـاء الزراعـة مُصـمماً لاحتـواء الخلايـا والأجزاء النباتية في ظروف معقمة لتضمن النمو الأمثل من خلال تزويد النبات بـالمُغذيات وتـوفير بيئة صغيرة مناسبة (Microenviroment) وتبادل غازي للأجزاء المزروعة.

تعدالمُفاعلات الحيوية والوسط السائل من التقنيات المثالية في إكثار النباتات نسيجياً كونها تتجاوز العديد من مشاكل الزراعة التقليدية عن طريق تقليل الكُلفة والجُهد والتشغيل الآلي للمُفاعل (Automated) والتخلص من الأثلين والغازات السامة المُتراكمة عن طريق تدوير الهواء و كذلك الاتصال المُباشر بين الوسط السائل والنبيتات المزروعة في المُفاعل (Martínez-Estrada وآخرون، 2019)، وبذلك تستطيع الخلايا إمتصاص المغُذيات بصورة مُوحدة وبذلك يتعزز نمو النبات (Ascough وFennel، 2004)، ولكن ربما قد يتسبب من استخدام هذه التقانة زيادة الرطوبة في الأجزاء النباتية (Hyperhydricity) بسبب الرطوبة العالية في الوعاء (Cuenca وآخرون، 2017).

إنَّ مشاكل الزراعة في الوسط الصلب المُتمثلة بصُغر حجم الزُجاجيات المُستخدمة، و صعوبة التخلص من الآكار الموجود على الجذور عند إجراء عملية الأقلمة، مما تسبب إصابة النبيتات بالأمراض البكتيرية والفطرية والتي تؤدي إلى تقليل معدل النبيتات المؤقلمة، نتيجة لما سبق تزداد كُلفة إنتاج النباتات عن طريق الزراعة النسيجية التقليدية (Gatti وآخرون، 2017 ؛ Georgiev وآخرون، 2014).

يُمكن تقسيم المُفاعلات إلى انواع :

- مُفاعلات الغمر المستمر Liquid-Phase Bioreactor
- مفاعلات الغمر المؤقت Temproray Immersion System
- مُفاعلات الطور الغازي Gas –Phase Bioreactor
- المُفاعلات الهجينة Hybrid Bioreactor

مُفاعلات الغمر المؤقت (TIS) هي مُفاعلات تعتمد على نظام تحكم آلي بصورة كُلية أو جزئية من خلال التحكم في فترات غمر للأجزاء النباتية المزروعة يعقبها فترة تصريف وتعريض الأنسجة النباتية للبيئة الغازية، وعادة تكون فترة الغمر قصيرة (عدة دقائق) في حين فترة التعرض للهواء تكون طويلة (عدة ساعات)، وإنَّ فترة التعرض للغمر توثر بصورة ملحوضة على المحتوى الرطوبي للنسيج النباتي(Albarran وآخرون، 2005).

من أنواع مُفاعلات الغمرالمؤقت المستخدمة عالمياً هي مُفاعل RITA وSETIS وPlantform , وPLANTIMA و Box-in-Bag و WAVE Bioreactor (Georgiev وآخرون، 2014).

2 – 16 : دور المُفاعلات الحيوية في إكثار نبات الستيفيا

وجد Sacco وآخرون (2013) في دراستهم على نبات الستيفيا لنوعين من مُفاعلات الغمر المؤقت RITA وPlantform بالمقارنة مع الوسط الصلب، إذ تم إضافة BA بتركيز 0.3 ملغم لتر$^{-1}$ و IAA بتركيز 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ ومعاملة المقارنة (0.0) لكل من الوسط الصلب ومُفاعل RITA ومُفاعل Plantform، وتم ضبط مدة الغمر للمُفاعلين على 3 دقائق غمر كل 3 ساعات و3 دقائق غمر كل 8 ساعات، وتم حساب نسبة الكالس المتكون إذ أعطى كل من الوسط الصلب وكلا المُفاعلين نسبة كالس بلغت 100 % عدا معاملة المقارنة التي لم تعطِ نسبة كالس، ووجد أنَّ عدد الأفرع المتكونة لكل من الوسط الصلب والوسط السائل كان 5.3 فرع نبات$^{-1}$ للوسط الصلب و 8 فرع نبات$^{-1}$ للوسط السائل في حالة عدم اضافة منظمات النمو ، في حين أنَّ إضافة BA قد زاد من متوسط الأفرع المتضاعفة إلى 14 فرع نبات$^{-1}$ في مُفاعل RITA وPlantform ووصل ارتفاع الأفرع في مُفاعل RITA إلى 9.58 سم.

بَين Venutolo Alvarenga و Aguilar Salazar (2015) دور مُدتين من الغمر في مُفاعل RITA في زيادة الكتلة الحيوية لنبات الستيفيا، إذ ضبط مدة الغمر على 15 و 30 دقيقة كل 6 ساعات لمدة 21 يوماً، أَشارت النتائج إلى أنَّ مدة الغمر كان لها الأثر في معدل النمو، إذ أظهرت مدة الغمر 30 دقيقة نسبة أعلى للتضاعف مقارنة مع 15 دقيقة، و أعطت أعلى عدداً للأفرع بلغ 12.6 فرع نبات$^{-1}$ وعدد أوراق بلغت 85 ورقة نبات$^{-1}$.

في دراسة Ramírez-Mosqueda و آخرون (2016) استخدم الباحث مُفاعل نوع RITA لبيان تأثير تراكيز من BA هي 0.0 و1.0 و2.0 و3.0 ملغم لتر$^{-1}$ في تضاعف نبات الستيفيا ومقارنة النتائج مع الوسط الصلب للتراكيز نفسها وأيضاً فترات من الغمر (2 دقيقة كل 4 و 8 و 12 ساعة)، وجد ان أعلى متوسطاً لتضاعف الأفرع كان 11.8 فرع نبات$^{-1}$ عند تركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA وبفترة غمر 2 دقيقة كل 8 ساعة في 20 مل من الوسط الغذائي.

استخدم الباحث Bayraktar (2019) فترات من الغمر(10 ثانية كل 1 و4 و6 و8 ساعة) مع كميات من الوسط السائل (100 و200 و 300 مل من MS) بدون إضافة منظمات النمو، و أوضحت نتائج الدراسة التي أجراها على نبات الستيفيا باستخدام المُفاعل الحيوي نوع RITA ذو تقانة الغمر المؤقت، أنَّ أفضل مدة لإعطاء أعلى متوسطاً من الأفرع المتضاعفة بلغ 8.47 فرع نبات$^{-1}$ عند المدة 10 ثانية لكل 1 ساعة في وسط 300 مل، في حين أنَّ أعلى استطالة حصل عليها

بلغ 11.99 سم عند 10 ثانية لكل 1 ساعة في وسط 100 مل، وأعلى متوسطاً من العُقد المتكونة بلغ 13.07 عقدة فرع$^{-1}$ عند 10 ثانية كل 6 ساعة في وسط 300 مل من MS.

في دراسة أجراها Aragón و آخرون (2014) على نبات الموز وجد أنَّ النبيتات الناتجة من تقانة الغمر المؤقت في المُفاعل الحيوي مقارنة مع الأوساط الصلبة (Gelled medium) قد حَسن من تجذير النبيتات وإعطاء استطالة للأفرع، وإعطاء أعلى كتلة جافة. ذكر Vives و آخرون (2017) أنَّ استخدام تقانة *in vitro* كانت تجربة مميزة في إكثار النباتات خُضرياً إلّا إنَّ الإنتاج عن طريق هذه التقانة كان أيضاً ذو إنتاجية قليلة نوعاً ما مقارنة مع تقانة الغمر المؤقت.

أشار عدد من الباحثين إلى دور المُفاعلات الحيوية في زيادة مركبات الأيض الثانوي، مثل الفينولات في نبات قصب السكر (Lorenzo وآخرون، 2001) وproteases في نبات الأناناس (Pérez وآخرون، 2004) و الكلايكوسيدات القلبية في نبات الديجيتالس (Pérez-Alonso و آخرون، 2009) والستيرويدات في نبات Withania somnifera (Sivanandhan وآخرون، 2014) والقلويدات في نباتات عائلة Amaryllidaceae (Georgiev وآخرون، 2014) وأيضا الستيفيوسايد في نبات الستيفيا من قبل (Alvarenga-Venutolo وSalazar-Aguilar، 2015؛ Ramírez-Mosqueda وآخرون، 2016).

3 : المواد وطرائق العمل

3 - 1 : مكان تنفيد التجربة

نُفذت التجربة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق / كلية الزراعة / جامعة ديالى للفترة من تشرين الثاني- 2021 الى اذار-2023، و تم الحصول على شتلات النبات الكامل في الشكل (3) من شركة جنة النخيل / الكاظمية / بغداد. أُجريت جميع التجارب في ظُروف التعقيم الكامل، إذ عقمت الأدوات من حوامل المشارط، وملاقط وأوراق الترشيح وأطباق بتري والبيكرات والفلاسكات وأيضاً الماء المقطر باستخدام جهاز المؤصدة (Autoclave) لمدة 15 دقيقة على درجة حرارة 121 م^{o} ، وضغط 1.04 كغم سم^{2} بالإضافة إلى استخدام الكحول الأثيلي بتركيز 99 % لتعقيم الأدوات باللهب بعد كل عملية استخدام (سلمان، 1988).

شكل (3) نبات الستيفيا المستخدم في التجربة

3 - 2 : تحضير الأوساط الزراعية وتعقيمها

أُستخدمت املاح موراشيج وسكوج (MS) الجاهز من شركة Hi-Media والمبينة محتوياته في الجدول (1) إذ تم إذابة 4.9 غم من MS في 1000 مل ماء مقطر وأُضيف إليه 30 غم من السكروز، ومن ثم عُدل الأُس الهيدروجيني (pH)عن طريق إضافة هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) و حامض الهيدروكلوريك (HCL) ليصبح 5.8 (Smith، 2013)، ومن ثُم أُضيف 7 غم من مادة الاكار(Agar) وسُخن على جهاز Hot Plate Magnetic Sitrrer لحين امتزاج المواد وفوران الوسط. بعد ذلك تم توزيع الوسط السائل في قناني زجاجية سعة 350 مل، إذ تم إضافة 40 مل لكل زجاجية وعُقمت الزجاجيات بالمؤصدة (Autoclave) على حرارة 121 ^{o}م وضغط 1.04 كغم سم^{2} لمدة 15 دقيقة، ومن ثم أُخرجت الزجاجيات وتُركت لتتصلب على درجة حرارة الغرفة.

جدول (1) المكونات الكيميائية للوسط MS (في لتر واحد) الجاهز من شركة Hi-Media

Ingredients	Mg L^{-1}
Ammonium Nitrate	1650.0
Calcium Chloride	332.20
Magnesium Sulphate	180.69
Potassium Nitrate	1900.0
Potassium Phosphate Monobasic	170.00
Boric Acid	6.2000
Cobalt Chloride Hexahydrate	0.0250
Copper Sulphate Pentahydrate	0.0250
Disodium Salt Dihydrate	37.300
Ferrous Sulphate Heptahydrate	27.800
Manganese Sulphate Monohydrate	16.900
Molybdic Acid	0.2130
Potassium Iodide	0.8300
Zinc Sulphate Heptahydrate	8.6000

3 - 3 : تجارب الإكثار الدقيق

3 – 3 - 1 : تجربة تعقيم الأجزاء النباتية

فُصلت العقد النباتية بطول 1 سم كما في الشكل (4) إذ أزُيلت عنها الأوراق وغُسلت بالماء المقطر لمدة 30 دقيقة مع إضافة قطرة من الصابون السائل لإزالة الأتربة والشوائب. غُمرت العقد النباتية بالكحول الأثيلي تركيز 70% لمدة 30 ثانية وغسلت بالماء المقطر المعقم 4 مرات لإزالة تأثير الكحول من العقد.

وضعت العقد في مادة هايبوكلورات الصوديوم (القاصر التجاري – فاس 6 %) بتركيز 5% و10%، ولكل تركيز ثلاث مدد زمنية هي 10 و15 و20 دقيقة (6 معاملات). أُضيفت مادة Tween-20 الناشرة مع هايبوكلورات الصوديوم مع التحريك لضمان توزيع التعقيم بصورة كُلية على السطح الخارجي للعقد.

غُسلت الاجزاء النباتية بالماء المقطر المُعقم 4 مرات لمدة 5 دقائق لأزالة تأثير المادة المُعقمة، علماً أنَّ كل هذه العملية أُجريت داخل كابينة إنسياب الهواء الطبقي (Laminar Air Flow Cabinet). زُرعت العقد في زجاجيات حجم 350 مل حاوية على وسط MS و خالٍ من منظمات النمو. أخذت النسبة المئوية للاجزاء الخالية من التلوث بعد مرور أسبوعين من الزراعة.

الشكل (4) تقطيع الأجزاء النباتية قبل إجراء عملية التعقيم

3 – 3– 2: تاثير تراكيز البنزل ادنين في تضاعف نبات الستيفيا

فُصلت عقد بطول 1 سم والناتجة من مرحلة التعقيم وزُرعت على وسط مجهز بخَمسة تراكيز من BA (0.0 و0.5 و 1.0 و1.5 و2.0 ملغم لتر$^{-1}$). اذ زُرعت النبيتات في قناني زجاجية بحجم 350 مل بواقع 10 مكررات لكل معاملة. حُضنت الزروعات في غرفة التنمية بدرجة حرارة 25 ± 2 م^{0} وشدة إضاءة 1000 لوكس، ومدة إضاءة يومية 16 ساعة ضوء و 8 ظلام. سُجلت القراءات بعد مرور 4 أسابيع من تأريخ الزراعة وتم حساب متوسط عدد الأفرع، ومتوسط ارتفاع الافرع، و متوسط عدد الأوراق.

3– 3– 3 : تاثير تراكيز الكاينيتين في تضاعف نبات الستيفيا

أسُتخدِم منظم النمو Kin بخمسة تراكيز (0.0 و 1.0 و 2.0 و 3.0 و4.0 ملغم لتر$^{-1}$). زُرعت النبيتات في قناني زجاجية بحجم 350 مل بواقع 10 مكررات لكل معاملة. حُضنت الزروعات في غرفة التنمية بدرجة حرارة 25 ± 2 م^{0} وشدة إضاءة 1000 لوكس، ومدة إضاءة يومية 16 ساعة ضوء و 8 ظلام. سُجلت القراءات بعد مرور 4 أسابيع من تأريخ الزراعة، وتم حساب متوسط عدد الأفرع، ومتوسط ارتفاع الافرع، وعدد الأوراق.

3 – 3- 4 : دور نفثالين حامض الخليك في تجذير أفرع الستيفيا

أُستعملت النباتات الناتجة من تجربة الإكثار كأفرع لاستخدامها في تجربة التجذير، إذ تم استخدام 4 تراكيز من NAA (0.0 و 0.1 و 0.2 و 0.3 ملغم لتر$^{-1}$)، وُزرعت في قناني زجاجية سعة 350 مل بواقع 10 مكرر لكل معاملة. حُضنت الزروعات على شدة إضاءة 1000 لوكس ودرجة حرارة 25± 2 م^{0} ، وسجلت القراءات بعد مرور 4 أسابيع من الزراعة وتم حساب متوسطعدد الجذور متوسط طول الجذور.

3 - 3 - 5 : تجربة الأقلمة لنبات الستيفيا

أُجريت تجربة أقلمة لأفرع نبات الستيفيا الناتجة عن تجربة التجذير. إذ تم غسل الجذور بالماء للتخلص من بقايا الوسط الغذائي MS، وبعدها غمرت الجذور بالمبيد الفطري (Root Blunt) تركيز 1 % (v/v) لمدة 5 دقائق، من ثم نُقلت النبيتات إلى أُصص تحتوي على مزيج من بيتموس وبيرلايت بنسبة 1:1 وغطيت بالنايلون الشفاف للحفاظ على نسبة رطوبة مناسبة حول النبيتات. حُضنت النبيتات داخل غرفة التنمية وعدلت الإضاءة إلى 3000 لوكس، مع مراعاة السقي عند الحاجة الذي أُضيف إليه نصف قوة املاح MS، وبعد 7 أيام تم البدء بثقب الاغطية وزيادة عدد الثقوب كل يومين لحين رفع الغطاء (الحسني، 2021 ؛ الكرخي، 2018).

3 - 4 : تجربة استحثاث الكالس

3 – 4 - 1 : دور NAA في استحثاث الكالس

أُجريت تجربة استحثاث الكالس بأخذ أوراق من النبات الناتج من أفضل معاملة في مرحلة التضاعف الخُضري (تجربة البنزل ادنين)، إذ فُصلت الأوراق وتم تجريح الأوراق بوساطة المشرط، ومن ثم زرعت على وسط مُتضمن أربعة تراكيز من منظم النمو NAA (0.0 و 1.0 و2.0 و3.0 ملغم لتر$^{-1}$) داخل قناني زجاجية سعة 100 مل، ومن ثم حُضنت الأجزاء الخضرية (الورقة) في غرفة التنمية على درجة حرارة بحدود 25 ± 2 م^{0} بواقع 10 مُكررات لكل مُعاملة، و تم حساب النسبة المئوية لتكون الكالس ولون وقوام وحجم الكالس بعد مرور 4 أسابيع من الزراعة.

3 – 4 – 2 : دور 2,4-D في استحثاث الكالس

نفذت تجربة استحثاث الكالس بأخذ أوراق من النبات، إذ تم تجريح الأوراق بوساطة المشرط و من ثم زُرعت على وسط متضمن ثلاثة تراكيز من منظم النمو 2,4-D (0.0 و 1.0 و2.0 ملغم لتر$^{-1}$) في قناني زجاجية سعة 100 مل، ومن ثم حُضنت الأجزاء في غرفة التنمية على درجة حرارة بحدود 25 ± 2 م^{0}. بواقع 10 مكررات لكل معاملة، وتم حساب النسبة المئوية لتكون الكالس ولون وحجم وقوام الكالس بعد 4 أسابيع من الزراعة.

- النسبة المئوية لتكون الكالس = عدد الاوراق المستحثة \ عدد الاوراق الكلي× 100
- تم قياس بُنية الكالس وقوامه اعتماداً على كون الكالس يتفتت بسهولة (Soft) عند الضغط أم بصعوبة (Compact) .
- تم قياس لون الكالس اعتماداً على المقياس الوصفي (بالنظر)
- تم قياس حجم الكالس اعتماداً على القيمة النظرية كما في الجدول (2).

جدول (2) المقياس النظري لشدة الإستجابة النباتية لاستحثاث الكالس

القيمة النظرية للكالس	ما تُشير إليه القيمة
-	عدم الإستجابة
+	إستجابة ضعيفة ونشوء للكالس في اطراف الأفرع بحجم حبة عدس
++	إستجابة متوسطة بحجم حبة الحمص
+++	إستجابة عالية يتغير فيها الشكل والتحول إلى كالس بحجم حبة بأقلاء

3 – 5 : استخلاص الستيفيوسايد و تقديره في مزارع الوسط الصلب

تم اتباع طريقة Hurum و Rohrer (2011) مع إجراء بعض التعديلات البسيطة في تقدير نسبة الستيفيوسايد في الأوراق والكالس عن طريق أخذ عينات من معاملات الوسط الصلب على النحو الآتي:

- أخذ عينات حقلية من نبات مؤقلم .
- أخذ عينات من الكالس المتكون من أفضل نتيجة متحصلة من التجارب السابقة (NAA).
- أخذ عينات من نتائج التضاعف للوسط الصلب.
- أخذ عينات من نتائج الزراعة في الوسط الصلب بدون إضافة منظمات النمو.

تم تقدير الستيفيوسايد في وزارة العلوم والتكنلوجيا – دائرة البيئة وعلوم المياه، أذ تُركت الاوراق لتجف على درجة حرارة الغرفة لمدة 48 ساعة و بعدها سحقت بالهاون الخزفي. أخذ 0.5 غم من العينة وأُضيف إليه 10 مل من الميثانول (معامل التخفيف)، بعد ذلك أخذ المزيج ورشح بوساطة Micro filter (0.45 مايكروميتر)، وتم أخذ 100 مايكروليتر من كل عينة، وبذلك أصبحت العينات جاهزة للتقدير على جهاز HPLC. تم تحديد زمن الاستبقاء للمحلول القياسي على ظروف الفصل في الجدول (3).

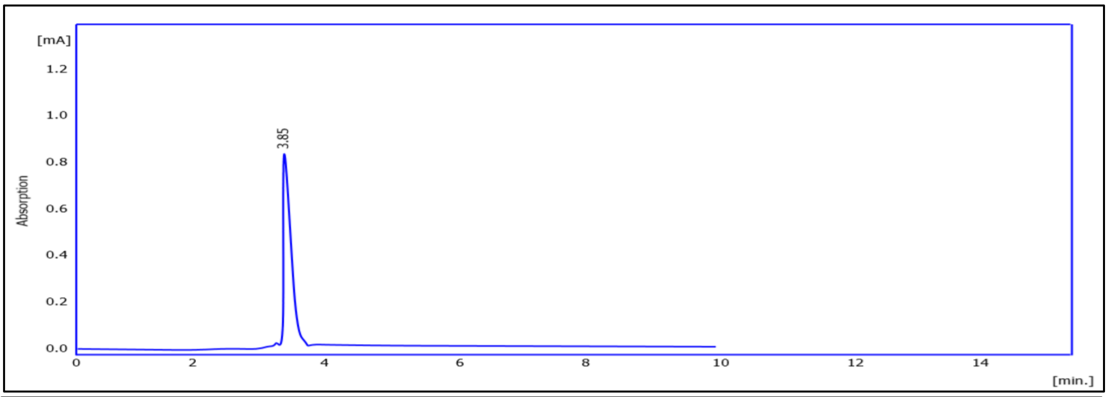
جدول (3) ظروف الفصل المتبعة في تقدير الستيفيوسايد عن طريق جهاز HPLC

ظروف الفصل	
الطور المتحرك	Acetonitril :water adjusted to pH 2.6 with orthophosphoric acid
درجة حرارة الفصل	30
حجم العينة المحقونة	100 ul
سرعة جريان الطور المتحرك	0.8 ml /min
نوع الكاشف	Detector UVset 210 nm
عمود الفصل	Zorbax C18 ,250mm X4.6 mm ID,3.5Mm
الشركة والموديل	Sykam –Germany

3- 6 : تحضير عينات المركب القياسي للستيفيوسايد

حُضرت عينات المركب القياسي وذلك بإضافة 4.7 ملغم من مركب الستيفيوسايد في 50 مل ميثانول، إذ اعتبرت عينة مقارنة لمستخلصات العينات المختلفة. تم حقن المحلول القياسي Standard Solution، وحدد زمن الاستبقاء Retention Time، وذروة مساحة الحزمة Area Peak للمحلول القياسي في الشكل (5)، ثم حددت ظروف الفصل وذلك بتثبيت الطور المتحرك Mobile Phase، المناسب والطور الثابت Stationary Phase، ومعدل سرعة الجريان Flow Rate، ودرجة الحرارة كما موضح بالجدول (3). حقنت النماذج لكل عينة قيد الدراسة في الظروف نفسها حسب تركيز كل مادة وفق المعادلة

$$\text{تركيز النموذج بالعينة } (\mu/gm) = \frac{\text{تركيز النموذج القياسي} \times \text{مساحة حزمة النموذج}}{\text{مساحة حزمة النموذج القياسي}} \times \frac{\text{معامل التخفيف}}{\text{وزن النموذج}}$$



Result chromatography Table (Uncal - F:\ Stevioside 1 ppm))

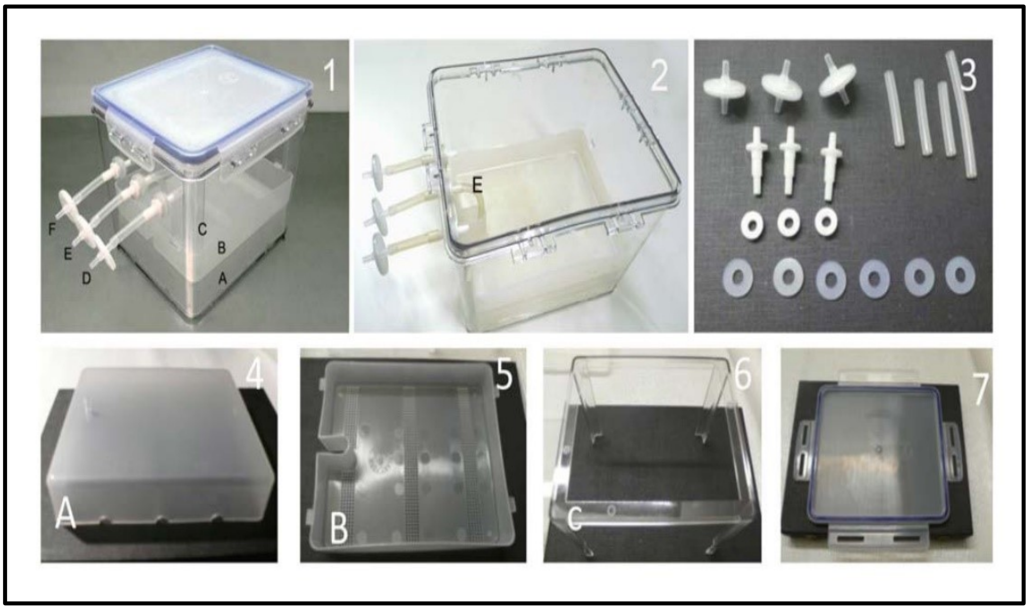
No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	3.85	985.25	805.46	100.00	100.00	0.25	
	Total	985.25	805.46	100.00	100.00		

شكل (5) منحنى المحلول القياسي للستيفيوسايد يتوضح فيهِ زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة

3 – 7 : المُفاعلات الحيوية المستخدمة في التجربة

3 – 7 – 1 : مُفاعل الغمر المؤقت المستورد

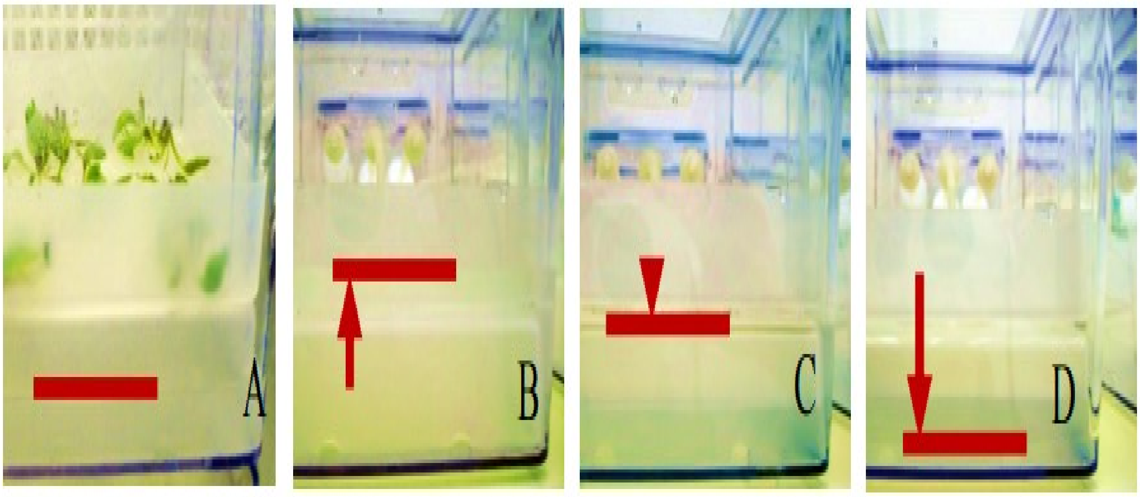
أُستخدمت مُفاعلات حيوية من نوع Plantform Bioreactor والمبينة صورته في الشكل (6)، لإجراء تجارب التضاعف، وتجارب زيادة إنتاج الستيفيوسايد. يعمل المُفاعل عن طريق دفع الوسط السائل (الموجود في الأسفل) إلى الأعلى بوساطة مضخة دفع هواء ميكانيكية (Air Pump) ليحقق نظام الغمر المؤقت (غمر الأجزاء النباتية الموجودة في الأعلى).



شكل (6) اجزاء مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المُصنع من شركة Margareta Welander

3 – 7 – 2 : طريقة عمل المُفاعل

- عندما تكون مضخة الهواء في حالة إطفاء فأنَّ الوسط السائل يكون في أسفل المُفاعل الحيوي الشكل (7- A).
- عند تشغيل مضخة الهواء فإنَّ الوسط السائل سيندفع إلى الأعلى، وبذلك سيحقق غمر للأجزاء النباتية الموجودة في السلة العليا (Basket) شكل (7- B).
- بوساطة المؤقت، فإنَّ مضخة هواء ستنطفئ عند تحقيق مدة الغمر المقررة ، وبذلك ينزل الوسط السائل إلى الاسفل الشكل (7 - C و D).



شكل (7) طريقة صعود السائل في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد ونزوله

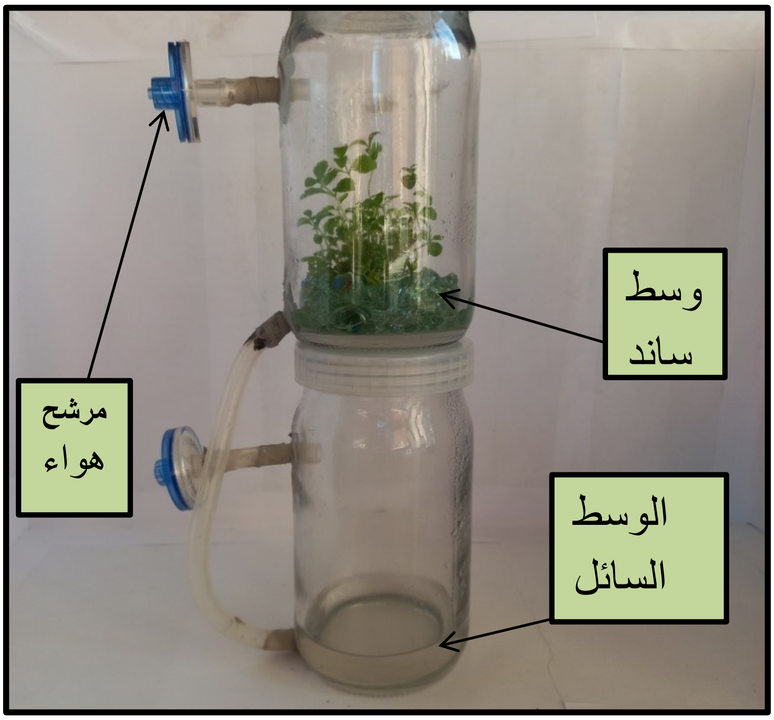
3- 7- 3 : المُفاعل المُصنع في المختبر(LMB)

تم تصميم مُفاعل بشكل آخر ويحقق أيضاً نظام الغمر المؤقت المبينة صورته في الشكل (8). يتكون المُفاعل من قنينتين زجاجيتين توضع واحدة فوق الاخرى وتكون مفصولة عن بعضها ولكن متصلة من الأسفل عن طريق أنبوبة سليكونية قابلة للتعقيم (Autoclavable). وتوجد فتحة عُليا لكل زجاجية تحتوي على مرشح هوائي بقطر فتحات 0.20 مايكروميتر، كذلك تحتوي الزجاجية العُليا على وسط ساند يتكون من كرات زجاجية مُكسرة توضع عليه الأجزاء النباتية، و الزجاجية السفلى تكون حاوية على الوسط السائل.

شكل (8) مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع في مختبر الأنسجة النباتية / قسم البستنة وهندسة الحدائق/ جامعة ديالى

3- 7– 4 : كيفية عمل المُفاعل

تربط المضخة بالقنينة الزجاجية السفلى اذ يقوم الهواء بدفع السائل إلى الأعلى ليصل إلى الزجاجية العليا الحاوية على الأجزاء النباتية كما في الشكل (9)، وبوجود مؤقت (Timer) يحدد فترة تشغيل المضخة الهوائية واطفائها تتم عملية تحديد فترات من الغمر المؤقت، وعند الأطفاء وبفعل الجاذبية ينزل السائل إلى الزجاجية السفلى، ومن خلال ملاحظة فترة الغمر عند التشغيل ونزول السائل الى الاسفل ومن خلال التشغيل التجريبي تبين ان سرعة نزول السائل في المفاعل المُصنع كانت أسرع من المفاعل المستورد في حين ان فترة نزول السائل في المفاعل المستورد كانت تستغرق 10 دقائق.



شكل (9) الأجزاء النباتية داخل مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً في مختبر الأنسجة النباتية التابع لكلية الزراعة / جامعة ديالى

3- 8 : تجارب المُفاعلات الحيوية

أُجريت تجربة تضاعف للعقد المفردة في المُفاعل الحيوي المستورد، إذ قُطعت العقد النباتية بحدود 1 سم ووضع داخل كُل مُفاعل عشر عقد، إذ تمثل كل عقدة نباتية مكرراً واحداً. وثُبتت فترة الغمر 10 دقائق كل 4 ساعات. رُبط المُفاعل إلى مضخة دفع هواء ميكانيكية (Air Pump) ذي مؤقت يعمل على تشغيل المُفاعل واطفائه بفترات محددة، وكذلك مرشحات خاصة تعمل على تنقية الهواء الداخل لحجرة المُفاعل لمنع تلوثها بالملوثات البكتيرية والفطرية. حُضنت الزروعات على

درجة إضاءة 1000 لوكس لفترة 16 ساعة ضوء و 8 ظلام. تم حساب متوسط عدد الأفرع المتكونة و متوسط طول الفرع ومتوسط عدد الأوراق بعد مرور 4 أسابيع من الزراعة.

3 – 8 - 1 : تجربة اختبار اضافة BA و Kin في تضاعف نبات الستيفيا باستخدام مفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً

أُجريت التجربة باستخدام تراكيز مختلفة من السايتوكاينينات، إذ أُضيف تركيزين من البنزل ادنين BA 1.0 و2.0 ملغم لتر$^{-1}$ و تركيزين من الكاينيتين Kin 2.0 و 4.0 ملغم لتر$^{-1}$ مع معاملة المقارنة 0.0، إذ أُضيف 50 مل لكل قنينة زجاجية وتم ربطها إلى مضخة الهواء بمدة غمر 1 دقيقة كل 4 ساعات وحُضنت النبيتات على شدة إضاءة 1000 لوكس، ومدة إضاءة 16 ساعة ضوء و 8 ظلام، وأُخذت القراءات بعد مرور 4 أسابيع من الزراعة وتم حساب متوسط ارتفاع الافرع، ومتوسط عدد الأفرع، ومتوسط عدد الأوراق.

3- 8 - 2 : تجربة اختبار إضافة BA و السكروز في تضاعف نبات الستيفيا باستخدام مفاعل الغمر المؤقت المستورد

أُجريت تجربة إضافة أفضل تركيز لمنظم النمو BA متحصل عليه من الوسط الصلب (تجارب التضاعف للوسط الصلب) إلى الوسط السائل (يحوي BA بتركيز0.0 و1.0 ملغم لتر$^{-1}$)، كذلك أُضيفت 3 تراكيز من السكروز 30 و 60 و 90 غم (إذ أُستخدم 6 مُفاعلات، كل 3 مُفاعلات أضُيف إليه تركيز0.0 و 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ من BA وتراكيز السكروز). مع ثبات فترة الغمر 10 دقائق لكل 4 ساعة بواقع 10 مكررات لكل معاملة. وتم حساب متوسط عدد الأفرع، المتكونة و متوسط عدد الأوراق، و متوسط ارتفاع الافرع بعد مرور 4 أسابيع من الزراعة.

3- 8 – 3 : اختبار دور حامض السالسلك في زيادة الستيفيوسايد

أُجريت تجربة إضافة منظم النمو SA بثلاثة تراكيز هي 10 و20 و30 ملغم لتر$^{-1}$ لأفضل نتيجة متحصلة من تحليل عينات المعاملات السابقة. إذ أُضيف SA للوسط السائل لبيان تأثيره في زيادة محتوى النبات من الستيفيوسايد داخل الأوراق. تُضمنت التجربة مقارنة بين المُفاعلات الحيوية (المستورد و المُصنع مختبرياً،تجربة عاملية) وتم تثبيت مدة الغمر على 10 دقائق غمر كل 4 ساعات لكلا المفاعلين. وتم تحليل العينات بوساطة جهاز HPLC لمعرفة محتوى الأوراق من الستيفيوسايد. كذلك تم أخذ متوسط عدد الأفرع، وارتفاع الافرع، وعدد الأوراق بعد 4 أسابيع من الزراعة على وسط MS السائل.

3 – 9 : التصميم التجريبي و التحليل الإحصائي

نُفذت التجارب جميعها بالتصميم العشوائي الكامل (CRD) بعامل واحد أو عاملين حسب التجربة، وبواقع عشرة مكررات لكل معاملة، وحللت النتائج باستخدام برنامج SAS وفق اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال0.05 (الساهوكي و وهيب، 1990)، أمَّا بالنسبة لمكررات فصل الستيفيوسايد بجهاز HPLC فتم أخذ ثلاثة مكررات لكل معاملة.

4: النتائج والمناقشة

4- 1: مرحلة التعقيم

4 - 1 – 1 : تأثير تراكيز من هايبوكلورات الصوديوم والمدد الزمنية في تعقيم العقد المفردة

تُظهر النتائج في الجدول (4) والشكل (10) الى وجود فروقاً معنوية بين تراكيز الهايبوكلورات المستخدم، إذ أعطى تركيز 10 % أعلى كفاءة للتعقيم بلغت 100 % مقابل 70% لتركيز 5 %، أمّا بالنسبة لتأثير التداخل بين العوامل فقد أوضحت النتائج تفوق تركيز 10 % من هايبوكلورات الصوديوم معنوياً وللمدد الثلاث (10 و15 و20 دقيقة) إذ بلغت كفاءة التعقيم 100%، في حين أنَّ تركيز 5% ولمدة 10 دقائق قد أعطت أقل كفاءة للتعقيم بلغت 60 % و أعلى نسبة للتعقيم بلغت 80% عند المدة 20 دقيقة .

جدول (4) تأثير تراكيز هيبوكلورات الصوديوم والمدة الزمنية في النسبة المئوية للتعقيم لعقد نبات الستيفيا بعد مرور اسبوعين من الزراعة على وسط MS

تركيز هايبوكلورات الصوديوم / المدة الزمنية (دقيقة)	% 5	% 10	متوسط تأثير المدة الزمنية
10	60 b	100 a	80 A
15	70 ab	100 a	85 A
20	80 ab	100 a	90 A
متوسط تأثير الهيبوكلورات	70 B	100 A	

المتوسطات ذات الأحرف المتشابهة لا تختلف معنوياً فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود

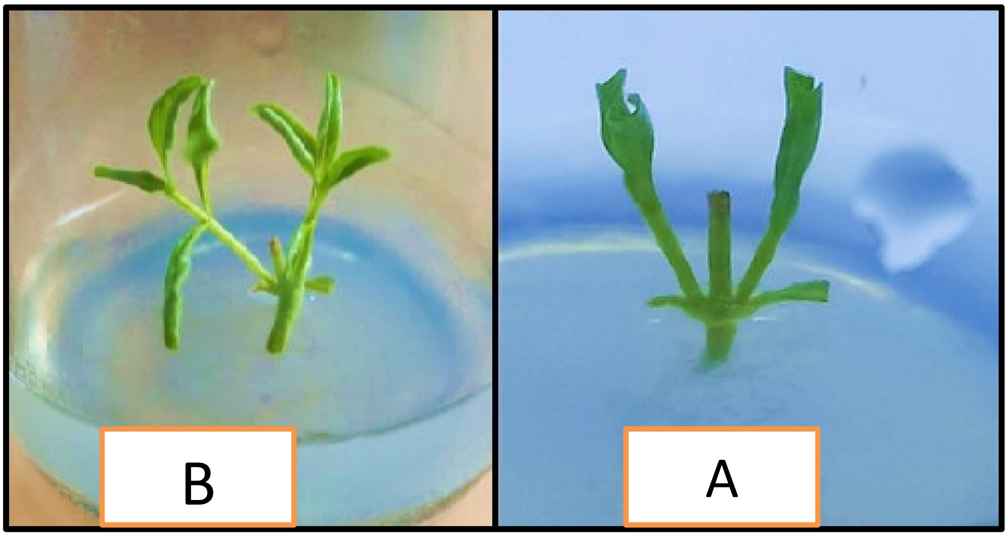
4 - 1 – 2 : تأثير تراكيز مختلفة من هايبوكلورات الصوديوم والمدد الزمنية في نسبة الإستجابة للعقد المفردة

يُشير الجدول (5) إلى عدم وجود فروق معنوية في نسبة الإستجابة باختلاف تراكيز الهايبوكلورات ومدة الغمر.

جدول (5) تأثير تراكيز هيبوكلورات الصوديوم والمدة الزمنية في نسبة الإستجابة لنبات الستيفيا بعد مرور اسبوعين من الزراعة على وسط MS

تركيز هايبوكلورات الصوديوم / المدة الزمنية دقيقة	5 %	10 %	متوسط تأثير المدة الزمنية
10	100 a	100 a	100 A
15	100 a	90 a	95 A
20	100 a	80 a	90 A
متوسط تأثير الهايبوكلورات	100 A	90 A	

المتوسطات ذات الأحرف المتشابهة لا تختلف معنوياً فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود



شكل (10) نبات الستيفيا A، بعد مرور أسبوعين من التعقيم ، B بعد مرور اربعة أسابيع من التعقيم

تعمل هايبوكلورات الصوديوم على القضاء على البكتريا والفطريات عن طريق فعالية حامض الهيبوكلورين الذي يعمل كمادة مؤكسدة قوية، ويتكون من اتحاد الماء مع الكلور، أمّا لتأثير الكحول الأثيلي فإنّه يعمل على قتل البكتريا والجراثيم عن طريق تدمير الغشاء الخارجي للبكتريا و تعطيل البروتينات الموجودة مما يؤدي إلى قتلها (الصالحي والصميدعي، 2014 ؛ Ramawat، 2004).

4 - 2 : تجارب الإكثار الدقيق

4- 2- 1: تأثير تراكيز من البنزل ادنين في تضاعف العقد المفردة

4 – 2 – 1 – 1: ارتفاع النبات

تُبين النتائج المبينة في الجدول (6) والشكل (13) وجود فروقاً معنوية بين المعاملات، إذ أعطت معاملة المقارنة أعلى متوسطاً لإرتفاع النبات بلغ 5.4 سم، في حين أعطت المعاملة 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ أقل متوسطاً لارتفاع النبات بلغ 1.8 سم.

4 – 2 – 1 – 2 : عدد الأفرع

تُظهر نتائج الجدول (6) أنَّ الأفرع النامية على وسط مجهز بتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA اعطت أعلى متوسطاً لعدد الأفرع بلغ 3.5 فرع نبات$^{-1}$ في حين بلغ أقل متوسط لعدد الأفرع لمعاملة المقارنة 1.5 فرع نبات$^{-1}$.

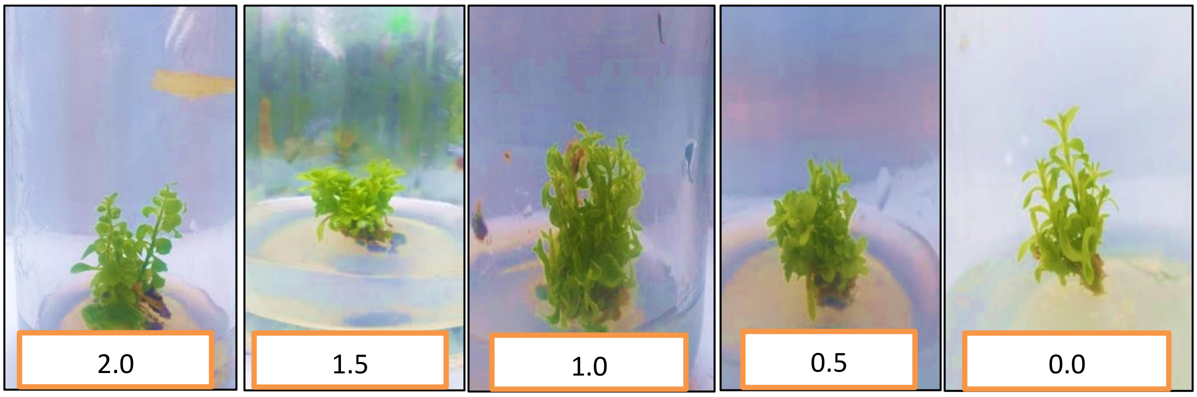
4 – 2 – 1 – 3 : عدد الأوراق

تُشير البيانات في الجدول (6) إلى تفوق المعاملة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ معنوياً على معاملة المقارنة و 1.5 و 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ إذ أعطت أعلى قيمة بلغت 16.8 ورقة فرع$^{-1}$، في حين أعطت معاملة المقارنة متوسط أوراق بلغ 8.8 ورقة فرع$^{-1}$، ولم تختلف معاملات 0.5 و 1.5 و 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ معنوياً فيما بينها.

جدول (6) تأثير تراكيز من BA في صفة ارتفاع النبات، وعدد الأفرع، وعدد الأوراق بعد اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS

الصفة المدروسة / تركيز BA ملغم لتر $^{-1}$	ارتفاع النبات (سم)	عدد الأفرع (فرع نبات $^{-1}$)	عدد الأوراق (ورقة فرع $^{-1}$)
0.0	5.4 a	1.5 b	8.8 b
0.5	2.2 bc	2.9 a	15 ab
1.0	2.7 b	3.5 a	16.8 a
1.5	1.8 c	2.5 ab	10.2 b
2.0	2.2 bc	3.2a	14.2 b

المتوسطات ذات الأحرف المتشابهة لا تختلف معنوياً فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود



شكل (11) تأثير تراكيز BA (ملغم لتر $^{-1}$) في تضاعف نبات الستيفيا بعد مرور اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS

4 – 2 - 2 : تأثير تراكيز من الكاينتين في تضاعف العقد المفردة

4 – 2 - 2 – 1 : ارتفاع النبات

تُظهر نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (7) إلى تفوق معاملة المقارنة معنوياً في صفة ارتفاع النبات، إذ أعطت اعلى متوسط للارتفاع بلغ 5.4 سم، في حين أعطت معاملتا 2.0 و 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ أقل متوسطاً لارتفاع النبات بلغ 1.1 سم.

4 – 2 – 2 – 2 : عدد الأفرع

تُبين النتائج الموضحة في الجدول (7) وجود فروقاً معنوية بين المعاملات، إذ أعطت المعاملة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ أعلى متوسطاً لعدد الأفرع المتكونة بلغ 2.2 فرع نبات$^{-1}$ ،في حين أعطى التركيز 2.0 أقل متوسطاً لعدد الأفرع بمتوسط 1.4 فرع نبات$^{-1}$.

4 – 2 – 2 – 3 : عدد الأوراق

أَشارت نتائج الجدول (7) وجود فروقاً معنوية بين بعض المعاملات ولا توجد فروق بين البعض الآخر من المعاملات، إذ أعطت معاملة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ أعلى متوسطاً للأوراق المتكونة بمتوسط 9.6 ورقة فرع$^{-1}$، في حين أعطت المعاملة 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ أقل متوسطاً للأوراق مقداره 5.1 ورقة فرع$^{-1}$

جدول (7) تأثير تراكيز من Kin في صفة ارتفاع النبات، وعدد الأفرع، وعدد الأوراق بعد اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS

الصفة المدروسة / تركيز Kin ملغم لتر$^{-1}$	ارتفاع النبات سم	عدد الأفرع فرع نبات$^{-1}$	عدد الأوراق ورقة فرع$^{-1}$
0.0	5.4 a	1.5 bc	8.8 a
1.0	1.9 b	2.2 a	9.6 a
2.0	1.1 c	1.4 c	5.1 b
3.0	1.1 c	1.6 abc	6.4 ab
4.0	1.5 cb	2.1 ab	7.2 ab

المتوسطات ذات الأحرف المتشابهة لا تختلف معنويا فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود

من نتائج الجدول (6) يتبين ان منظم النمو BA ادى الى زيادة عدد الأفرع والأوراق ويعود ذلك الى إن BA يعمل على ازالة تاثير السيادة القمية وبالتالي تشجيع البراعم الجانبية على النمو من خلال توجيه المغذيات اليها وتطور الاوعية الناقلة للمواد الغذاية للبراعم الجانبية (الاسدي و الخيكاني، 2019) وربما يعود ذلك إلى طبيعة تركيب جزيئة البنزل ادنين الذي يتكون من ثلاث اوآصر مزدوجة بعكس الكاينتين الذي يحتوي على آصرتين فقط، وكذلك وجود حلقة Benzyl التي جعلت BA من أبرز السايتوكاينينات المستخدمة في إكثار النباتات (عبدول، 1987). كذلك حالة الاستقرار الذي يتميز به BA من ناحية عدم تحلله بسهولة، والكفاءة العالية في كسر السيادة القمية من خلال العمل على اتساع الأوعية الناقلة لنسيج الخشب والأنابيب المنخلية لنسيج اللحاء ومنع تحلل الكلوروفيل، ويحفز إنقسام الخلايا وزيادة إنتاج الأحماض النووية (Mok وآخرون، 2000). ربما تعود الزيادة في ارتفاع الافرع الخالية من منظمات النمو الى وجود الاوكسين الطبيعي IAA الذي يعمل على منع نمو البراعم الجانبية وفرض السيادة القمية (الخفاجي، 2014)

قد تعزى الزيادة في عدد الأفرع في معاملات Kin في الجدول (7) إلى دور الكاينتين في كسر السيادة القمية، إذ يقوم بتحرر البراعم الإبطية بتوجيه المغذيات إليها وبالتالي لعب دوراً ايجابياً في نموها (Cline وHarrington، 2007)، كذلك تساعد في تصنيع RNA والبروتين في الأنسجة المزروعة (الصميدعي، 2017). قد يعزى تفوق معاملة المقارنة في صفة ارتفاع النبات لغياب دور السايتوكاينين إذ يعيق فعالية الأوكسين الطبيعي IAA الذي يمنع نمو البراعم الجانبية بفعل السيادة القمية (أبو زيد، 2000). تتفق النتائج مع ما توصل اليه Khierallah و Al-Obaidy (2017)، Abd El-Motaleb وآخرون (2013).

4 – 3 : تأثير نفثالين حامض الخليك في تجذير الأفرع

4 – 3 – 1 : متوسط عدد الجذور (جذر فرع$^{-1}$)

تُشير نتائج الجدول (8) والشكل (12) عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات في صفة عدد الجذور.

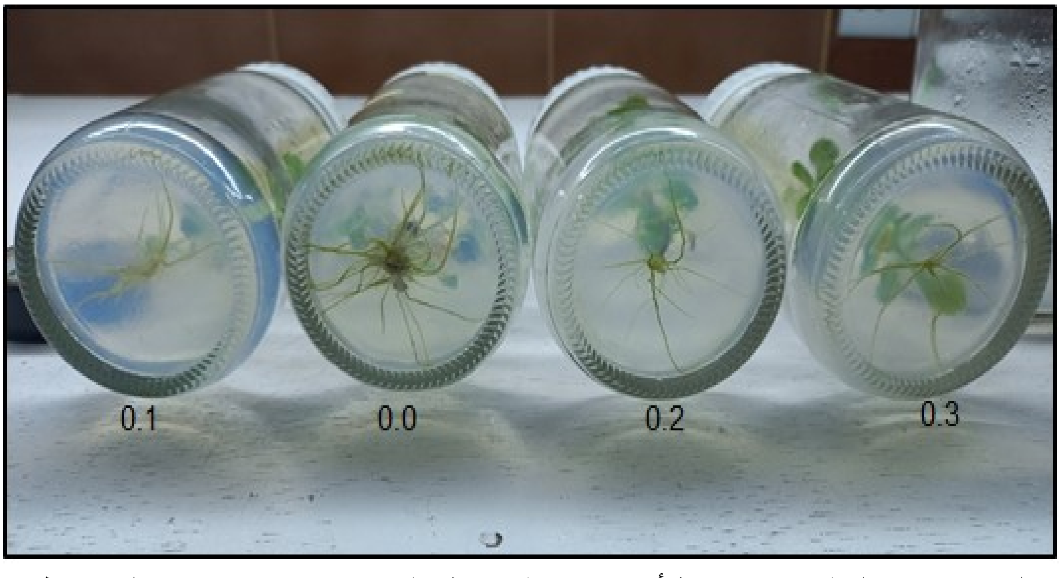
4 – 3 – 2 : متوسط طول الجذور (سم)

أظهرت النتائج في الجدول (8) وجود فروق معنوية بين المعاملات، إذ أعطت معاملة المقارنة أعلى متوسطاً لطول الجذور مقداره 2.2 سم، في حين أعطت المعاملتان 0.3 و0.2 ملغم لتر$^{-1}$ أقل متوسطاً لطول الجور بلغ 1.1 سم، فيما لم تختلف المعاملات 0.1 و0.2 و 0.3 ملغم لتر$^{-1}$ معنوياً فيما بينها.

جدول (8) تأثير تراكيز من NAA في صفة عدد للجذور، وطول الجذور بعد اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS

الصفة المدروسة / تركيز NAA ملغم لتر$^{-1}$	عدد الجذور (جذر فرع$^{-1}$)	طول الجذور (سم)
0.0	4.1 a	2.2 a
0.1	4.2 a	1.4 b
0.2	3.2 a	1.1 b
0.3	2.8 a	1.1 b

المتوسطات ذات الاحرف المتشابهة لا تختلف معنويا فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود



شكل (12) نمو الجذور بعد اربعة أسابيع من الزراعة على تراكيز من NAA على وسط MS

قد يعود الإختلاف بين عدد الجذور المتكونة إلى التراكيز المختلفة من NAA المُضاف و محتوى النبات من الهرمون الداخلي (IAA) ودورها في تحفيز النبات على تكوين الجذور، فضلاً عن انقسام مناشئ الجذور (Root Intial Cell) التي تعتمد على تركيز الأوكسين الداخلي أو المُضاف إلى الوسط عن طريق التحفيز الفسيولوجي في الخلايا البرنكيمية المتخصصة لتجعلها تفقد التمايز وتعيدها إلى الحالة المرستيمية بعملية فقدان التمايز de-Defferntiation ثم انقسامها مكونة مناشئ الجذور التي تستمر بالنمو والتطور إلى بادئات الجذور Root Primordium التي تشق طريقها خلال خلايا الساق مكونة الجذور العرضية (Hartmann وآخرون، 2002) تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه Yesmin (2019).

4 – 4 : أقلمة النبيتات الناتجة من مرحلة التجذير

بلغت النسبة المئوية للنباتات التي اجتازت مرحلة الأقلمة واستمرار نموها في الأصص 100 % وذلك بسبب وجود مجموع جذري قوي هيأ النبات لامتصاص العناصر والمغذيات الموجودة في وسط الزراعة وذلك بعد مرور اربعة أسابيع من تأريخ الأقلمة كما في الشكل (13).

شكل (13) مرحلة الأقلمة: A مرحلة التقسية، B نبات الستيفيا بعد المرور بمرحلة التقسية وصولاً إلى مرحلة النبات المؤقلم بعد مرور اربعة أسابيع

4 – 5 : تجارب استحثاث الكالس

4 – 5 – 1 : استحثاث الكالس بإضافة تراكيز من نفثالين حامض الخليك

4 – 5 – 1 – 1 : النسبة المئوية لتكون الكالس

أَشارت نتائج الجدول (9) والشكل (14) وجود فروقاً معنوية بين المعاملات 1.0 و 2.0 و 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ مقارنة بمعاملة المقارنة، اذ اعطت معاملات NAA نسبة مئوية لتكون الكالس بلغت 80 و100 و100 % على التوالي في حين لم تعطي معاملة المقارنة اي نسبة مئوية للكالس.

4 – 5 – 1 – 2 : لون الكالس

تُشير نتائج الجدول (9) وبالاعتماد على المقاييس اللونية، تكون كالس ذا لون أخضر فاتح ولكل المعاملات ولا توجد هناك فروقاً بينها من حيث اللون.

4 – 5 – 1 – 3 : قوام الكالس

بينت النتائج تكّون كالس ذو قوام صلب ولا يوجد كالس هش بين المعاملات.

4 – 5 – 1 – 4 : حجم الكالس

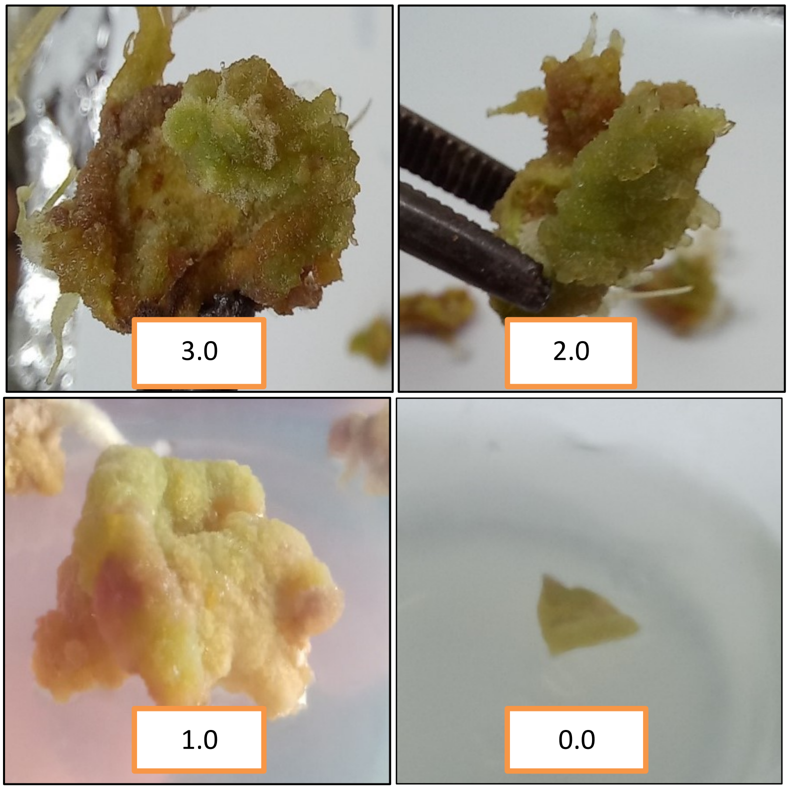
أَشارت النتائج أنَّ كالس النبات يكون ذا حجم ثابت اعتماداً على مساحة القطعة المزروعة (مساحة الورقة)، وأعطت جميع المعاملات كالس بحجم متوسط يقدر بحجم حبة حمص اعتماداً على مقاييس النظر.

جدول (9) تأثير الأوكسين NAA في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس ولون وقوام وحجم الكالس من ورقة نبات الستيفيا بعد مرور اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS

تركيز NAA ملغم لتر$^{-1}$	النسبة المئوية لتكون الكالس(%)	لون الكالس	قوام الكالس	حجم الكالس*
0.0	0 b	---	---	---
1.0	80 a	اخضر فاتح	صلب	++
2.0	100 a	اخضر فاتح	صلب	++
3.0	100 a	اخضر فاتح	صلب	++

المتوسطات ذات الأحرف المتشابهة لا تختلف معنوياً فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود

* + حجم كالس صغير(حجم حبة عدس) ,++ حجم كالس متوسط (حجم حبة حمص), +++ حجم كالس كبير(حجم حبة بأقلاء)



شكل (14) الكالس المتكون من استخدام تراكيز مختلفة من NAA ملغم لتر$^{-1}$ بعد مرور اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS

4 – 5 – 2 : استحثاث الكالس بإضافة تراكيز من 2,4-D

4 – 5 – 2 - 1 : النسبة المئوية لتكون الكالس

يُشير الجدول (10) والشكل (15) أنَّ أعلى نسبة مئوية لتكون الكالس كانت 50 % عند المعاملة بتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ متفوقاً بذلك معنوياً على معاملة 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ التي أعطت 10%. ولم تعطِ معاملة المقارنة اي كالس.

4 – 5 – 2 – 2 : لون الكالس

اظهرت النتائج أيضاً أنَّ الكالس الناتج عن جميع المعاملات كان بلون أصفر إلى الأصفر الفاتح إعتماداً على مقياس النظر.

4 – 5 – 2 - 3 : قوام الكالس

بينت النتائج عند إضافة 2,4-D تكّون كالس ذو بنية صلبة لجميع المعاملات ولا يوجد تكُون لكالس هش.

4 – 5 – 2 – 4 : حجم الكالس

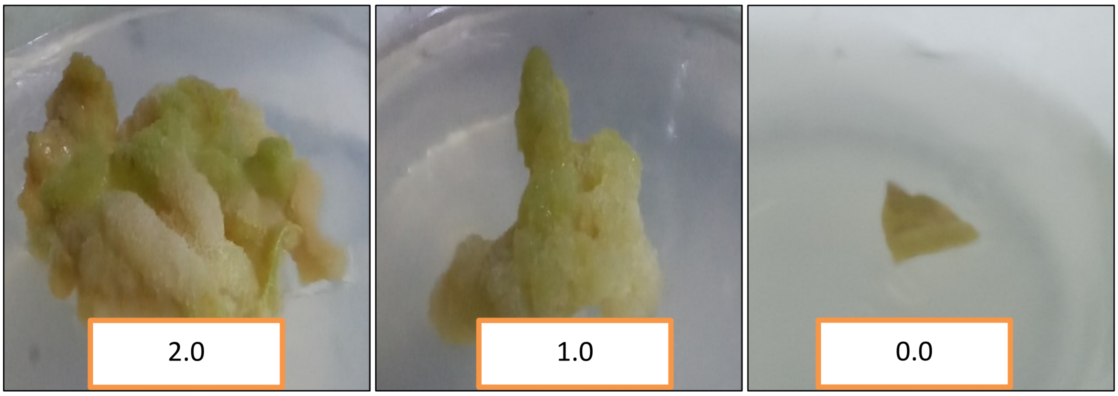
بينت نتائج حجم الكالس تكون كالس بحجم متوسط يقدر بحجم حبة الحمص اعتماداً على مقياس النظر.

جدول (10) تأثير الأوكسين 2,4-D في النسبة المئوية لتكون الكالس ولون وقوام وحجم الكالس بعد اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS

الصفة المدروسة / تركيز 2.4.D ملغم لتر $^{-1}$	النسبة المئوية لتكون الكالس %	لون الكالس	قوام الكالس	حجم الكالس*
0.0	% 0 c	---	---	---
1.0	% 50a	اصفر فاتح	صلب	++
2.0	% 10b	اصفر فاتح	صلب	++

المتوسطات ذات الاحرف المتشابهة لا تختلف معنويا فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود

* - --- = لا يوجد كالس+ = حجم كالس صغير++ = حجم كالس متوسط+++ = حجم كالس كبير



شكل (15) الكالس المتكون بعد اربعة أسابيع من الزراعة نتيجة استخدام تراكيز من 2,4-D على وسط MS

ينشأ الكالس من مناطق الجروح على الأوراق أو الأجزاء النباتية، وهو نسيج غير منتظم يتألف من خلايا غير متمايزة (Raghavan و Nagmani، 1983). وأثبتت الدراسات الحديثة أن منظمات النمو النباتية لها الاثر في إعطاء ألوان مختلفة من الكالس مثل الأخضر الفاتح والغامق والأبيض المصفر وكذلك قوام مختلف مثل الكالس الهش (soft) أو الصلب (compact) (Mahmud وآخرون، 2014). إنَّ إضافة تراكيز مختلفة من الأوكسينات والسايتوكاينينات لها دور مهم في استحثاث الكالس من خلال دورها في زيادة فعالية الخلايا وانقسامها وبناء المواد الأساسية للنمو (Hedden و Stephen، 2006)، وأيضاً تعمل على توسيع الجدار الخلوي وزيادة أيض البروتينات من خلال بناء الحمض النووي RNA وانقسام الخلايا، كما تلعب السايتوكاينينات دوراً مهماً من خلال تنظيم بناء البروتينات وأيض السكروز لتحفيز الخلايا على الإنقسام (Mahesh، 2008). إنَّ الطاقة الكامنة للخلايا (Totipotency) إضافة إلى النسبة المثالية للهرمونات النباتية والعوامل الداخلية للنبات تعمل على تحفيز إنقسام الخلايا للاجزاء النباتية (Margl وآخرون، 2002). تتفق نتائج هذه التجربة مع ما توصل إليه كل من Sharma وآخرون (2015) و Blinstrubienė وآخرون (2020) و Rahim وJawad (2021).

4 – 6 : تجارب اختبار نمو الزروعات في مُفاعل الغمر المؤقت

4 - 6 - 1 : تجربة إضافة نوعين من السايتوكاينين في تضاعف نبات الستيفيا في المُفاعل المُصنع مختبرياً

4 – 6 – 1 - 1 : ارتفاع الافرع

تُشير نتائج الجدول (11) والشكل (16) إلى تفوق جميع المعاملات معنوياً على معاملة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ بنزل ادنين، إذ أعطت معاملة المقارنة و 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA أعلى متوسطاً لطول الافرع بلغ 4.8 سم و 4.7 سم على التتابع، وأعطت معاملة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ أقل متوسطاً لطول الافرع مقداره 2.8 سم.

4 – 6 – 1 – 2 : عدد الأفرع

يبين الشكل (18) تفوق المعاملتان 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ من Kin و 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ من BA معنوياً على معاملة المقارنة، إذ أعطت معاملة BA أعلى متوسطاً لتضاعف العقد مقداره 3.2 فرع نبات$^{-1}$ وأعطت معاملة المقارنة أقل متوسطاً لتضاعف العقد بلغ 1.6 فرع نبات$^{-1}$، في حين لم تختلف المعاملات Kin و BA معنوياً فيما بينهما.

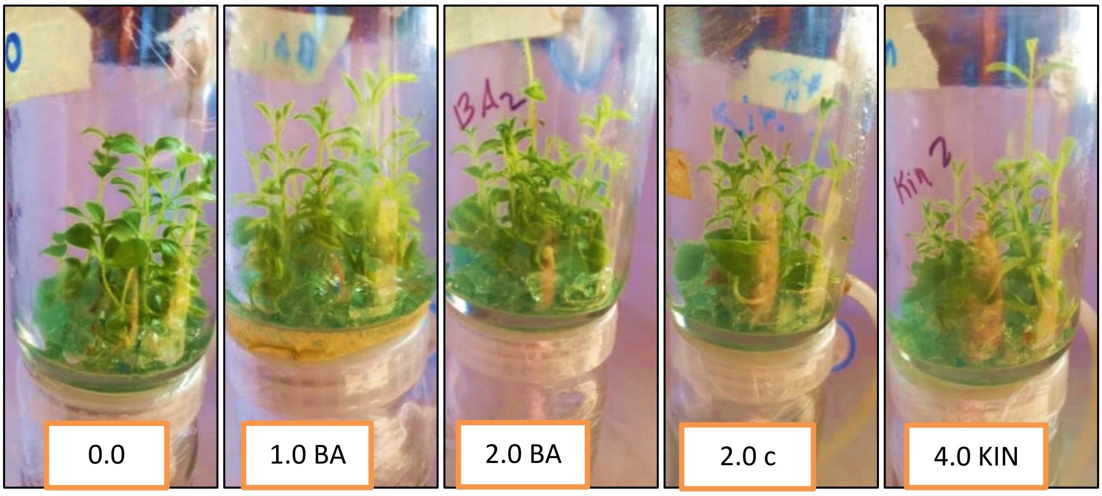
4 – 6 – 1 – 3 : عدد الأوراق

يُلاحظ تفوق المعاملة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ من BA معنوياً على معاملة 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ من BA إذ أعطت المعاملة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ أعلى متوسطاً لعدد الأوراق بلغ 17.1 ورقة فرع$^{-1}$، وأعطت المعاملة 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ من BA أقل متوسطاً لمتوسط عدد الأوراق بلغ 10.2 ورقة فرع$^{-1}$.

جدول (11) تأثير استخدام تراكيز من BA و Kin في صفة ارتفاع الافرع، و عدد الأفرع، وعدد الأوراق في المُفاعل المُصنع مختبرياً بعد اربعة أسابيع من الزراعة

الصفات المدروسة / تركيزمنظم النمو ملغم لتر$^{-1}$	ارتفاع الافرع (سم)	عدد الأفرع (فرع نبات$^{-1}$)	عدد الأوراق (ورقة فرع$^{-1}$)
0.0	4.8 a	1.6 b	11.9 ab
Kin 2.0	4.6 a	3.1 a	15.6 ab
Kin 4.0	4.6 a	2.1 ab	11.8 ab
BA1.0	2.8 b	3.2 a	17.1 a
BA 2.0	4.7 a	2.1 ab	10.2 b

المتوسطات ذات الاحرف المتشابهة لا تختلف معنويا فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود



شكل (16) عدد افرع نبات الستيفا المتضاعف في المُفاعل المُصنع مختبرياً بعد مرور اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS السائل

ربما يعود النمو الأمثل داخل المُفاعل المُصنع مختبرياً إلى دور التبادل الغازي وضخ الأوكسجين المستمر عند كل فترة صعود ونزول السائل داخل الزجاجيات والتخلص من الأثلين المحيط بالنبات، وكذلك الاتصال المباشر بين وسط MS السائل والنبيتات داخل الزجاجيات الذي يجعل من عملية امتصاص المغذيات تكون بصورة متساوية بسبب تدوير مكونات الوسط السائل (Martínez-Estrada واخرون 2019).

أشار بعض الباحثين من وجهة نظر اقتصادية إلى دور مُفاعلات الغمر المؤقت في إكثار النباتات إلى قلة الكُلفة والجهد المبذولة من قبل الباحثين والعاملين في مجال الزراعة النسيجية بالإضافة إلى ذلك إنَّ الأجزاء النامية في مُفاعلات الغمر المؤقت لا تحتاج الى غسل الاكار الذي يحيط بالجذور في الأوساط الصلبة وصعوبة التخلص منه عند إجراء عملية الأقلمة، وكذلك الجهد والكلفة والوقت المبذول في تحضير الأوساط والتخلص منه (Quiala وآخرون، 2012). إنَّ نمو نبات الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً أعطى نباتات قوية وغير متزججة وربما يعود ذلك إلى كفاءة تدوير الوسط السائل وسرعة نزوله إلى الأسفل، وكذلك كفاءة تدوير الهواء في حجرة المُفاعل. تتفق النتائج مع ما توصل إليه Rosales وآخرون (2018).

إنَّ تأثير BA في زيادة عدد الأفرع في المعاملة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ ربما يعود إلى تأثير السايتوكاينينات في تقليل تأثير السيادة القمية ودورها في التمايز الوعائي للبراعم الجانبية مما يسهل في نمو هذه البراعم وتفرعها (جندية، 2003)، أو قد يعود إلى الوصول إلى حالة من التوازن الهرموني بين المحتوى الداخلي لانسجة النبات وما أضُيف إلى الوسط من BA والذي أدى إلى حصول تضاعف (Skoog و Miller، 1957). أمّا بالنسبة لتأثير Kin في زيادة عدد الأفرع ربما يعود إلى دوره في اعاقة هدم البروتين والكلوروفيل بالإضافة إلى تحفيزه لأنزيمات البناء الضوئي والذي تنعكس آثاره في زيادة حجم الخلايا، وتشجيع الإنقسام والتمايز الشكلي (Taiz وآخرون، 2015).

4 – 6 – 2 : تجربة التداخل بين السكروز و BA في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد

4 – 6 – 2 - 1 : ارتفاع النبات (سم)

اوضحت النتائج في الجدول (12) وجود فرق معنوي لتأثير البنزل ادنين، فقد تفوقت معاملة المقارنة على معاملة البنزل ادنين 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ إذ أعطت أعلى طولاً للأفرع مقداره 4.1 سم، وأعطت معاملة البنزل ادنين 1.1 سم ، ولا توجد فروقاً معنوية بين معاملات السكروز.

أمّا بالنسبة لتأثير التداخل بينهما فقد أعطت معاملات المقارنة مع تراكيز السكروز فروقاً معنوية على معاملة البنزل ادنين مع السكروز، إذ أعطت معاملة 60 من السكروز مع معاملة المقارنة أعلى متوسطاً لطول الفرع مقداره 4.4 سم، في حين أعطت معاملة 30 غم من السكروز للبنزل ادنين أقل طولاً للفرع بلغ 0.9 سم.

جدول (12) تاثير اضافة السكروز والبنزل ادنين والتداخل بينهما في صفة ارتفاع الافرع بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS باستخدام مفاعل الغمر المؤقت المستورد

تركيز السكروز / تركيز BA (ملغم لتر$^{-1}$)	30 (غم لتر$^{-1}$)	60 (غم لتر$^{-1}$)	90 (غم لتر$^{-1}$)	متوسط BA
0.0	4.1 a	4.4 a	4.1 a	4.1A
1.0	0.9 b	1.5 b	1.1 b	1.1 B
متوسط السكروز	2.5 A	2.9 A	2.5 A	

المتوسطات ذات الأحرف المتشابهة لا تختلف معنويا فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود

4 – 6 – 2 - 2 : عدد الأفرع

اوضحت نتائج الجدول (13) والشكل (17) تفوق تأثير البنزل ادنين معنوياً على معاملة المقارنة، إذ أعطت أعلى متوسطاً لتضاعف العقد مقداره 4.2 فرع نبات$^{-1}$ و أعطت معاملة المقارنة أقل متوسطاً بلغ 1.9 فرع نبات$^{-1}$ في حين لم تختلف معاملات السكروز معنوياً فيما بينها في صفة عدد الافرع.

أمّا لتأثير التداخل بين المعاملات فقد تفوقت جميع معاملات BA معنوياً على جميع معاملات المقارنة وتراكيز السكروز، إذ أعطت معاملة السكروز 30 غم متداخلاً مع البنزل ادنين أعلى متوسطاً لتضاعف الافرع بلغ 4.5 فرع نبات$^{-1}$، و أعطت معاملة السكروز 90 غم بدون إضافة أقل متوسطاً للتضاعف بلغ 1.8 فرع نبات$^{-1}$.

جدول (13) تاثير اضافة السكروز والبنزل ادنين والتداخل بينهما في صفة عدد الافرع بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS باستخدام مفاعل الغمر المؤقت المستورد

تركيز السكروز / تركيز BA (ملغم لتر$^{-1}$)	30 (غم لتر$^{-1}$)	60 (غم لتر$^{-1}$)	90 (غم لتر$^{-1}$)	متوسط BA
0.0	2.1 b	1.9 b	1.8 b	1.9 B
1.0	4.5 a	4.3 a	3.8 a	4.2 A
متوسط تأثير السكروز	3.2A	3.1A	2.8A	

المتوسطات ذات الاحرف المتشابهه لا تختلف معنويا فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود

4 – 6 – 2 - 3 : عدد الأوراق

بينت نتائج الجدول (14) تفوق معاملة 90 غم من السكروز معنوياً، إذ أعطت أعلى متوسطاً لعدد الأوراق بلغ 13.1 ورقة نبات$^{-1}$ وأعطت معاملة السكروز 60 غم أقل متوسطاً لعدد الأوراق بلغ 9.8 فرع نبات$^{-1}$، أما بالنسبة لتأثير البنزل ادنين يلاحظ عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات .

أما لتأثير التداخل بين المعاملات فقد تفوقت المعاملة 90 غم من السكروز مع 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ بنزل ادنين على معاملات السكروز 30 و 60 غم متداخلاً مع BA ولا توجد فروق معنوية مع جميع معاملات المقارنة.

جدول (14) تاثير اضافة السكروز والبنزل ادنين والتداخل بينهما في صفة عدد الاوراق بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS باستخدام مفاعل الغمر المؤقت المستورد

تركيز السكروز غم لتر$^{-1}$ / تركيز BA (ملغم لتر$^{-1}$)	30 (غم لتر$^{-1}$)	60 (غم لتر$^{-1}$)	90 (غم لتر$^{-1}$)	متوسط BA
0.0	11.2 abc	11.6 abc	12.2 ab	11.6 A
1.0	8.7 bc	8.1 c	14.1 a	10.2 A
متوسط تأثير السكروز	9.9 B	9.8 B	13.1A	

المتوسطات ذات الاحرف المتشابهة لا تختلف معنويا فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود

شكل (17) عدد الافرع لنبات الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المزروع على وسط MS السائل

يعد السكروز المضاف الى الوسط كمصدر للكاربون المجهز للطاقة وايضاً يلعب دوراً في تنظيم الضغط الازموزي (yaseen و آخرون، 2013) ويلاحظ في نتائج الجداول (14) ان السكروز لعب دوراً في زيادة عدد الاوراق وربما يعود السبب الى ان السكروز يعمل كمنظم جيني (gene regulator)، اذ يعمل على تشجيع بناء RNA الذي يعمل بدوره على تشجيع بناء البروتينات وكذلك دور السكروز في زيادة معدل التمثيل الضوئي عند تراكيز معينة ومثالية (Hdider وDesjardins، 1994)، إذ بين Werner وآخرون (2003) دور السايتوكاينينات التنظيمي من خلال تشجيع الإنقسام الخلوي في القمم النامية وتمايزها من خلال دورها في كسر السيادة القمية.

يلاحظ دور BA في تضاعف الأفرع و تناقص ارتفاع الافرع وربما يعود إلى دور BA في تقليل فعالية السيادة القمية ودورها في التمايز الوعائي، وتحفيز نمو البراعم الجانبية، وبالتالي نمو البراعم وتفرعها، وأيضاً حصول حالة من التوازن الهرموني الأمثل للجزء النباتي المزروع (جندية، 2003). تتماشى هذه النتائج مع ما توصل إليه Khierallah و Al-Obaidy (2017). وتفتح البراعم الجانبية.

4 – 7 : تأثير حامض السالسلك في نمو نبات الستيفيا في مزارع الغمر المؤقت للمُفاعل المُصنع والمستورد

4 – 7 – 1 : ارتفاع النبات (سم)

تبين نتائج الجدول (15) وجود فروقاً معنوية بين متوسط تأثير نوع المُفاعل، إذ أعطى المُفاعل المُصنع مختبرياً قيمة بلغت 3.1 سم لارتفاع الافرع، في حين أعطى المُفاعل المستورد أقل قيمة بلغت 2.1 سم، كذلك بالنسبة لمتوسط تأثير حامض السالسلك، وجدت فروقاً معنوية بين تأثير التراكيز، إذ أعطى التركيز 30 ملغم لتر$^{-1}$ قيمة بلغت 3.8 سم، في حين أعطى التركيز 10 ملغم لتر$^{-1}$ قيمة بلغت 1.7سم.

أمّا بالنسبة لتأثير التداخل فوجدت فروقاً معنوية بين المعاملات، إذ أعطت معاملة استخدام المُفاعل المُصنع مختبرياً مع اضافة SA بالتركيز 30 ملغم لتر$^{-1}$ أعلى قيمة بلغت 5.2 سم، في حين أعطت معاملة المُفاعل المستورد مع اضافة SA بالتركيز 10 ملغم لتر$^{-1}$ أقل قيمة بلغت 1.7 سم.

جدول (15) تاثير نوع المفاعل الحيوي وحامض السالسلك والتداخل بينهما في صفة ارتفاع الافرع بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS الحاوي على تركيز 90 غم من السكروز و1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA .

حامض السالسلك / نوع المُفاعل	10 (ملغم لتر$^{-1}$)	20 (ملغم لتر$^{-1}$)	30 (ملغم لتر$^{-1}$)	تأثيرنوع المُفاعل
مُفاعل الغمر المؤقت المستورد	1.7 c	2.2 cb	2.5 b	2.1 B
مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً	1.6 c	2.1 cb	5.2 a	3.1 A
تأثيرحامض السالسلك	1.7 C	2.2 B	3.8 A	

المتوسطات ذات الاحرف المتشابهة لا تختلف معنوياً فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود

4 – 7 – 2 : عدد الأفرع

تبين نتائج الجدول (16) عدم وجود فروق معنوية بين متوسط تأثير مُفاعل الغمر المؤقت المستورد والمُفاعل المُصنع مختبرياً في صفة عدد الافرع و كذلك بالنسبة لتأثير تراكيز SA فلم تؤثر في زيادة عدد الأفرع .

جدول (16) تاثير نوع المفاعل الحيوي وحامض السالسلك والتداخل بينهما في صفة عدد الافرع بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS الحاوي على تركيز 90 غم من السكروز و1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA.

حامض السالسلك / نوع المُفاعل	10 (ملغم لتر$^{-1}$)	20 (ملغم لتر$^{-1}$)	30 (ملغم لتر$^{-1}$)	تأثيرنوع المُفاعل
مُفاعل الغمر المؤقت المستورد	1.8 a	1.8 a	2 .1 a	1.8 A
مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً	1.7 a	2.1 a	2.1 a	1.9 A
تأثيرحامض السالسلك	1.7 A	1.9 A	2.1 A	

المتوسطات ذات الاحرف المتشابهة لا تختلف معنوياً فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود

4 – 7 – 3 : عدد الأوراق

تبين نتائج الجدول (17) وجود فروقاً معنوية بين متوسط تأثير المُفاعل في صفة عدد الأوراق إذ أعطى المُفاعل المُصنع مختبرياً أعلى قيمة بلغت 10.6 ورقة فرع$^{-1}$، في حين أعطى المُفاعل المستورد قيمة بلغت 8.3 ورقة فرع$^{-1}$، أما بالنسبة لتأثير حامض حامض السالسلك في صفة عدد الأوراق فأيضاً وجدت فروقاً معنوية بين المعاملات، إذ أعطت المعاملة 30 ملغم لتر$^{-1}$ من SA أعلى قيمة بلغت 10.8 ورقة فرع$^{-1}$، إلا انها لم تختلف معنوياً عن المعاملة 20 ملغم لتر$^{-1}$ من SA في حين أعطى التركيز 10 ملغم لتر$^{-1}$ أقل قيمة مقدارها 8.2 ورقة فرع$^{-1}$.

اظهر التداخل بين العاملين المدروسين وجود فروقاً معنوية في صفة عدد الاوراق وتفوقت معاملة اضافة SA بالتركيز 30 ملغم لتر$^{-1}$ مع استخدام المفاعل المصنع مختبرياً في اعطائها اعلى عدد للاوراق بلغ 13.4 ورقة نبات$^{-1}$ قياساً مع معاملة اضافة SA بالتركيز 10 ملغم لتر$^{-1}$ مع استخدام ذات المفاعل الحيوي التي اعطت اقل عدد من الاوراق بلغ 7.8 ورقة نبات$^{-1}$ وبقية معاملات التداخل الاخرى.

جدول (17) تاثير نوع المفاعل الحيوي وحامض السالسلك والتداخل بينهما في صفة عدد الاوراق بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS الحاوٍ على تركيز 90 غم من السكروز و1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA .

حامض السالسلك / نوع المُفاعل	10 ملغم لتر$^{-1}$	20 ملغم لتر$^{-1}$	30 ملغم لتر$^{-1}$	تأثير نوع المُفاعل
مُفاعل الغمر المؤقت المستورد	8.6 cb	8.2 cb	8.2 cb	8.3 B
مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً	7.8 c	10.6 b	13.4 a	10.6 A
تأثيرحامض السالسلك	8.2 B	9.4 AB	10.8 A	

المتوسطات ذات الأحرف المتشابهة لا تختلف معنوياً فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود

يعمل حامض السالسلك على تحسين نمو النباتات من خلال تنظيم العمليات الفسلجية، وتقليل الاكسدة الحاصلة للأغشية الخلوية، وبالتالي يحسن من نفاذية العناصر الغذائية وذلك من خلال دعم النظام المضاد للأكسدة وزيادة فعالية أنزيم Peroxidase (Joseph وآخرون، 2010). إنَّ تأثير حامض السالسلك المعنوي في صفات النمو الخضري قد يعود إلى قدرة حامض السالسلك في تحسين مظاهر النمو للنباتات من خلال زيادة محتوى النبات من الهرمونات النباتية الداخلية مثل الأوكسينات والجبرلينات والسايتوكاينينات من خلال تغيير في الوضع الهرموني للنبات، وزيادة انقسام الخلايا واستطالة الخلايا، إضافة إلى زيادة نمو النبات وتطوره وقد يعود الى أنَّ حامض السالسلك يعمل على تشجيع النمو وزيادة امتصاص الماء مما ينعكس ايجابياً على صفات النمو الخضري (Hayat و Ahmed، 2007).تتفق النتائج مع ما توصل اليه Moharramnejad

وآخرون (2019) الذي وجد أن أضافة حامض السالسلك قد أدى الى تحسين صفات النمو ألخضرية لكل من ارتفاع الافرع وعدد الاوراق واصبحت 3.7 فرع نبات$^{-1}$ و8.3 سم و 18.4 ورقة فرع$^{-1}$ في حين ان معاملة المقارنة قد اعطت عدد افرع وطول افرع وعدد اوراق 2.4 فرع نبات$^{-1}$ و 7.1 سم و10.1 ورقة نبات$^{-1}$ على التوالي.

ربما يكون لتأثير نوع المُفاعل وحجم الحجرات دور في تحسين نمو النبات، فمن خلال الملاحظة تم ايجاد فرق في النمو بين مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً ومُفاعل الغمر المؤقت المستورد وربما تعود إلى عدة أسباب

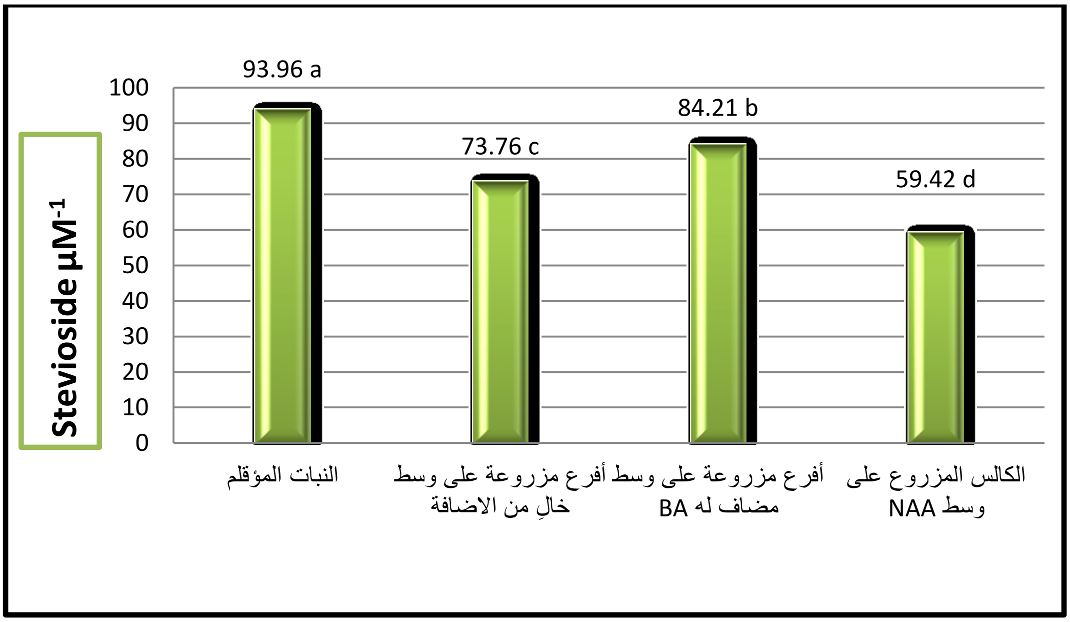
- إنّ مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً يحوي على وسط ساند من كرات زجاجية محطمة ساعد النبات على تثبيت نفسه وبالتالي نمو الجذور وامتصاص المغذيات عند كل صعود ونزول للوسط السائل.
- شفافية الزجاجيات ساعدت النبيتات في الحصول على أفضل إضاءة للقيام بعملية التمثيل الضوئي وبالتالي نمو أفضل للنباتات.
- حجم الزجاجيات الصغير مقارنة مع حجرات المُفاعل المستورد ساعد في تقليل الرطوبة حول النبات.

4 - 8 : تقدير محتوى الستيفيوسايد في نباتات الستيفيا النامية على الوسط الصلب والسائل والمؤقلمة في الحقل

4 – 8 – 1 : تقدير محتوى الستيفيوسايد في نباتات الستيفيا النامية في الوسط الصلب والمؤقلمة في الحقل

أظهرت نتائج الفصل الكروماتغرافي في الشكل (18) أنَّ أعلى تركيزاً لمركب الستيفيوسايد بلغ 93.96 مايكروغم غم$^{-1}$ وزن جاف لعينات النبات المؤقلم بدلالة زمن الاستبقاء ومساحة حزمة للمكررات الثلاث والمبينة في الجدول (18) والشكل (19) والتي تفوقت معنوياً على باقي العينات المفصولة من النبات المزروع على وسط صلب مضاف له BA بتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ في الجدول (19) والشكل (20)، ومن مزراع الوسط الصلب الخالي من إضافة منظم النمو(Free) في الجدول(20) والشكل (21)، والكالس المزروع على وسط مضاف له NAA في الجدول (21) والشكل (22).

كما تفوقت الأفرع المزروعة على وسط MS الصلب المضاف له BA بتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ بإعطاء 84.21 مايكروغم غم$^{-1}$ على الكالس، والنبات المزروع على وسط خالٍ من BA وأيضا تفوق النبات المزرع على وسط خالٍ من الإضافة معنويا بإعطاء 73.76 مايكروغم غم$^{-1}$ من الستيفيوسايد مقارنة مع الكالس الذي بلغ 59.42 مايكروغم غم$^{-1}$.



شكل (18) محتوى عينات النبات من الستيفيوسايد (مايكروغم غم$^{-1}$)

من نتائج الفصل الكروماتغرافي لعينات الوسط الصلب النسيجي (وسط صلب مضاف له BA و وسط خالٍ من الإضافة والكالس مع النبات المؤقلم، يُلاحظ تناقص متوسط الستيفيوسايد نسيجياً مقارنة بالنبات المؤقلم وذلك لأن النبات المؤقلم تكون أنسجته متخصصة ولها القابلية على إنتاج مركبات الأيض الثانوي بصورة أعلى (الصميدعي، 2017)

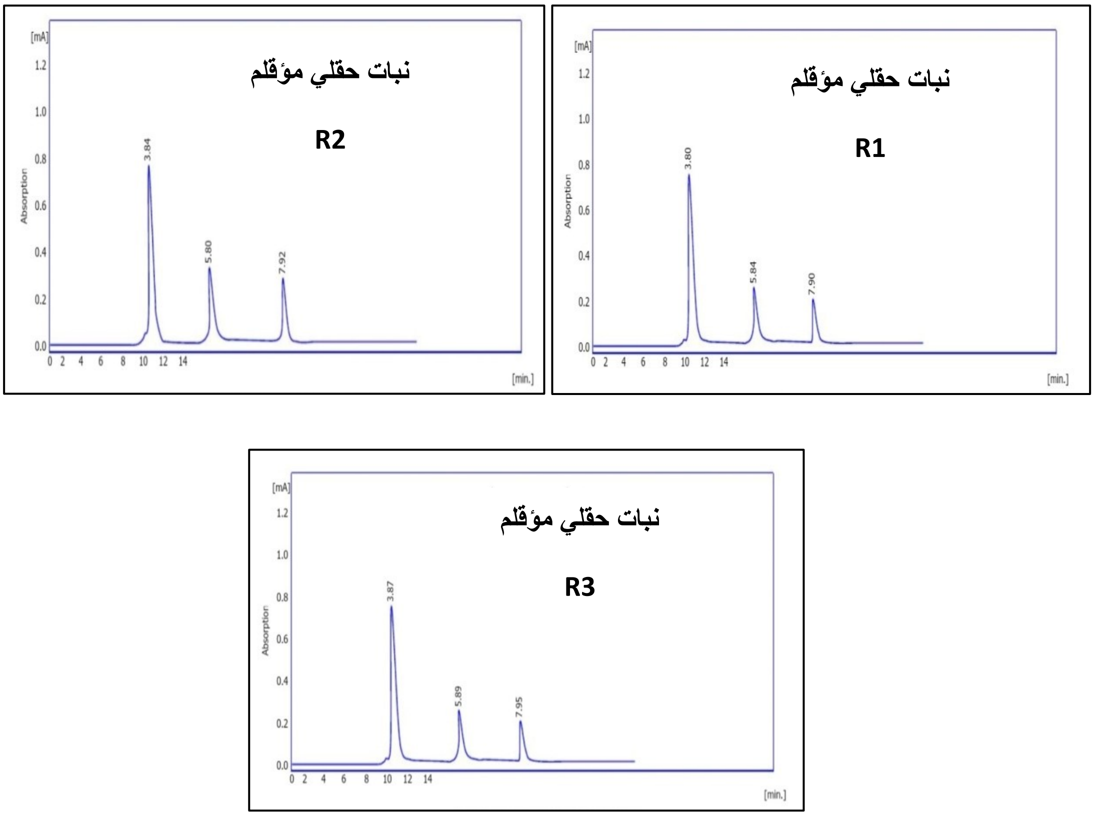
ربما تفسر النتائج إلى كون النبات المؤقلم يحتوي على هرمونات نمو داخلية ونموه في الحقل مع درجات الحرارة وضوء الشمس المباشر أعطى نمواً أمثل مكّن النبات من إعطاء أعلى مستوى من الستيفيوسايد (Röck-Okuyucu وآخرون، 2016)، وأنَّ الفرق بين مستوى الستيفيوسايد بين النبات الحقلي والنسيجي ربما يعود إلى تغير حالة الوسط الفيزيائية والكيميائية وبالتالي تأثيره على نمو النبات وإنتاج مركبات الأيض الثانوية (Bonderv وآخرون، 2001)

الافرع على وسط مضاف له BA تفوقت على الأفرع المزروعة على وسط خالٍ من الإضافة بسبب كون BA يساهم في تنشيط التعبير الجيني لإنتاج المركبات الثانوية كونه يعمل على بناء DNA و RNA (Devlin و Witham، 1983) اختلفت نتائج التحليل مع نتائج ما توصلت إليه Aman وآخرون (2013) الذين وجدوا أنَّ إضافة منظمات النمو النباتية ادت إلى تناقص في مستوى الستيفيوسايد .

الكالس المزروع على وسط NAA أعطى أقل محتوى من الستيفيوسايد وربما يعود السبب إلى كون الكالس خلاياه برنكيمية وغير متخصصة وتستنزف موادها الأيضية في اضافه خلايا جديدة (ramawat، 2004)

جدول (18) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات الحقلي المؤقلم

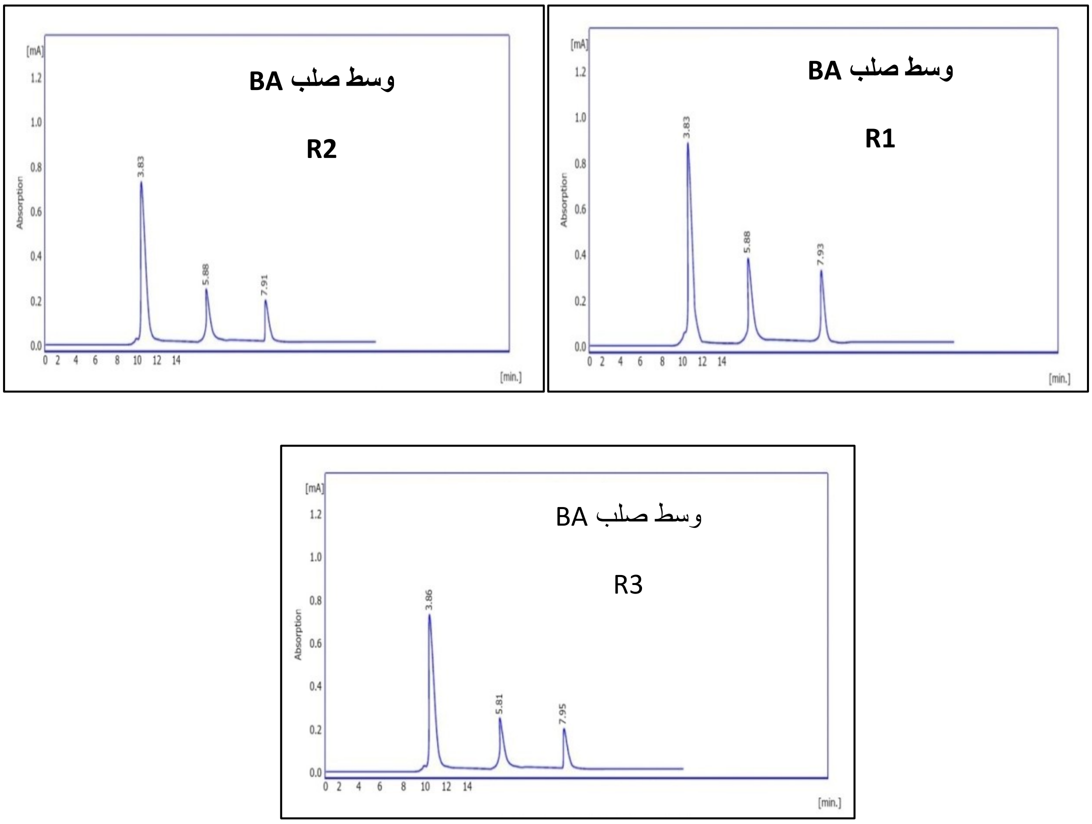
المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
4650.11	3.84	4980.22	3.80	4255.98	3.87



شكل (19) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق النبات الحقلي المؤقلم

جدول (19) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق الوسط الصلب مضاف له BA

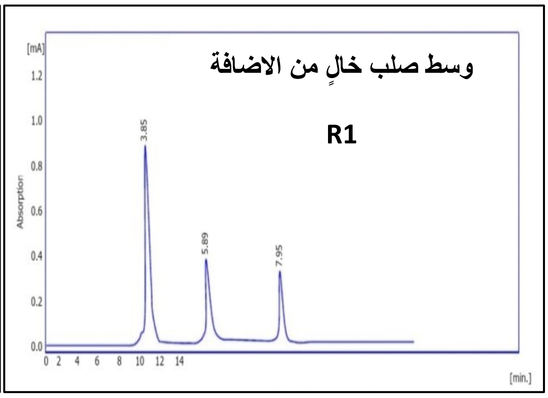
المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
4102.03	3.84	4244.26	3.84	4098.22	3.86

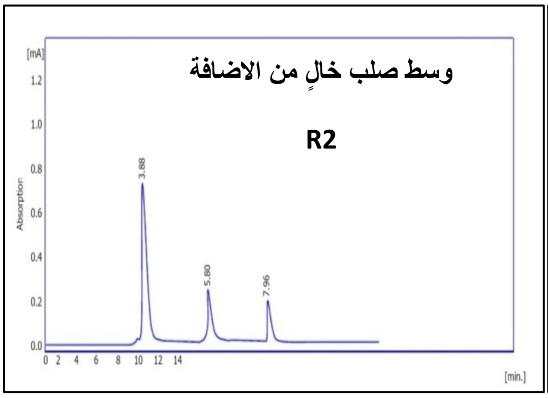


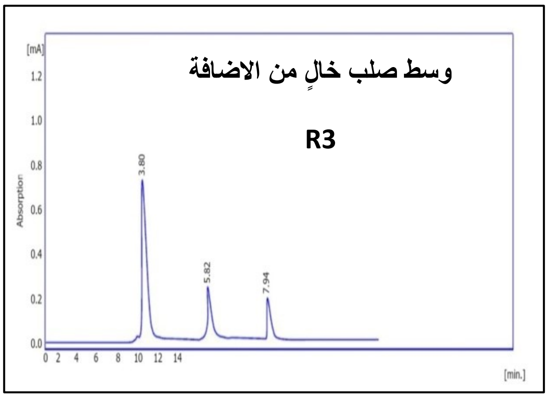
شكل (20) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا المجهز بتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA

جدول (20) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من الوسط الصلب الخالي من الإضافة

المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
3741.25	3.81	3255.47	3.85	3901.44	3.81



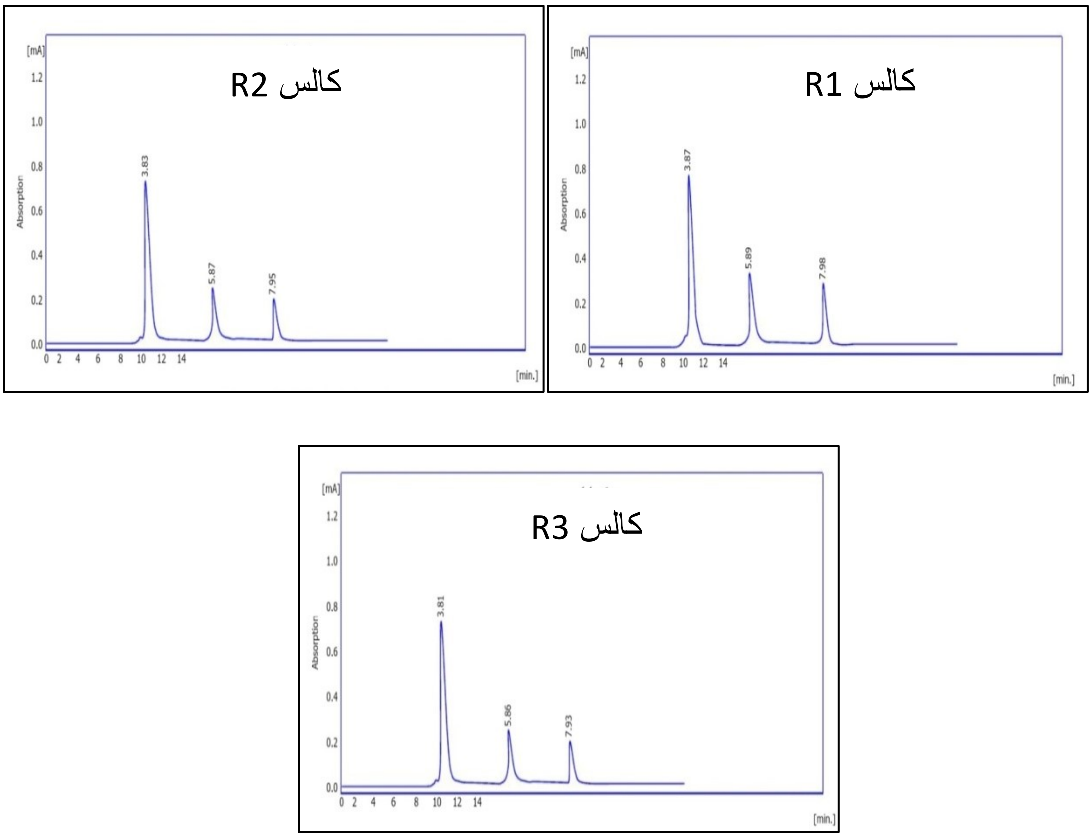




شكل (21) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا المزروع في الوسط الصلب الخالي من الإضافة

جدول (21) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من الكالس المزروع على وسط MS مضاف له NAA من تركيز 3 ملغم لتر[1-]

المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
2988.58	3.87	2892.98	3.86	2900.41	3.85



شكل (22) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة كالس الوسط الصلب

4- 8 – 2 : تقدير محتوى الستيفيوسايد في نباتات الستيفيا النامية على الوسط السائل

4 – 8 – 2 – 1 : تأثير إضافة BA مع السكروز وتداخلهما في محتوى النبات من الستيفيوسايد في مزارع مُفاعل الغمر المؤقت المستورد

تُشير نتائج الجدول (22) الى التاثير المعنوي لتراكيز السكروز، إذ أعطى التركيز 90 غم أعلى متوسطاً للستيفيوسايد بلغ 156.52 مايكروغم غم$^{-1}$ وزن جاف ، في حين أعطى التركيز 30 غم أقل تركيزاً للستيفيوسايد بلغ 114.24 مايكروغم غم$^{-1}$ وزن جاف. أمَّا لتأثير متوسط BA فقد أعطت المعاملة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ أعلى متوسطاً للستيفيوسايد مقداره 148.62 مايكروغم غم$^{-1}$ في حين أعطت معاملة المقارنة 126.28 مايكروغم غم$^{-1}$.

أمَّا لتأثير التداخل بين المعاملات فقد أعطت المعاملة 90 سكروز متداخلاً مع BA أعلى تركيزاً للستيفيوسايد بلغ 171.02 مايكرو غم$^{-1}$ وزن جاف في الجدول (28) و الشكل (28) ، في حين أعطت المعاملة 30 غم بدون إضافة منظم نمو أقل تركيز للستيفيوسايد بلغ 105.81 مايكروغم غم$^{-1}$ في الجدول (23) و الشكل (23)، والتداخلات الاخرى تتبع الجداول 24 و25 و26 و27 والشكل 24 و25 و26 و27 على التوالي.

جدول (22) تأثير BA والسكروز وتداخلهما في محتوى الأفرع من الستيفيوسايد (مايكروغم غم$^{-1}$) عند الزراعة في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد بعد مرور اربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS

تركيز BA (ملغم لتر$^{-1}$) / تركيز السكروز غم لتر$^{-1}$	0.0	1.0	متوسط تأثير السكروز
30	105.81 f	122.67 e	114.24 C
60	131.01 c	152.17 d	141.59 B
90	142.01 b	171.02 a	156.52 A
متوسط تأثير BA	126.28 B	148.62 A	

المتوسطات ذات الاحرف المتشابهة لا تختلف معنويا فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود

السكريات هي عناصر شائعة وحيوية لأي عملية أيض عامة، وتدخل السكريات في معظم العمليات في خلايا النبات، سواء عن طريق توفير هياكل للمُركبات العضوية أو تخزين الطاقة للتفاعلات الكيميائية كما تعمل السكريات أيضاً كمركبات إشارة حيوية فيما يتعلق بالحالة الأيضية للخلية واستجابتها للإجهاد الحيوي وغير الحيوي (Rolland وآخرون، 2006). من نتائج الجدول (22) يلاحظ زيادة الستيفيوسايد بزيادة السكروز في الوسط السائل وقد يعزى السبب إلى كون الكربوهيدرات وهي من المكونات المهمة لأي وسط غذائي ويتحدد تأثيرها على الجزء النباتي المزروع في كونها مصدراً للطاقة والكاربون فضلاً عن دورها في تنظيم ازموزية الوسط (George، 2008)، مما يحفز الخلايا على إنتاج مركبات الأيض الثانوي وقد يعود أيضا إلى أنَّ التراكيز العالية من السكروز تؤدي إلى تحفيز إنتاج المركبات الثانوية ومن ثم تراكمه في النبات. تم إجراء هذه الدراسة وفقًا لحقيقة أنَّ تركيز معين من السكروز ضروري لنمو النبات، والاقتراح بأنَّ النباتات تستجيب لتغيرات محتوى السكروز من خلال التحولات المورفولوجية والتشريحية، وكذلك عن طريق تنظيم تعبير العديد من الجينات عن طريق مسارات نقل الإشارة المختلفة (Smeekens، 2000)

تُبين نتائج الجدول (22) زيادة محتوى النبات من الستيفيوسايد مع زيادة تركيز السكروز في الوسط و تتفق هذه النتائج مع نتائج Praveen وآخرون (2011) الذي وجد أن إضافة السكروز وصولا الى التركيز 5% قد ادى الى زيادة محتوى الاوراق من الستيفيوسايد الى 3.32 ملغم غم$^{-1}$ مقارنة مع التركيز 3 % الذي وصل فيه مستوى الستيفيوسايد بحدود 1.16 – 2.66 ملغم غم و تختلف نتائج هذه الدراسة مع نتائج الباحث Bondarev وآخرون (2003)، الذي وَجد أنَّ زيادة تركيز السكروزفي الوسط من 2 % إلى 3 % في الوسط قد زاد من محتوى الستيفيوسايد في الأوراق، وأنَّ زيادة السكروز إلى 5 % قد اعطى محتوى النبات من الستيفيوسايد اقل من 3%.

إنَّ التعبير الجيني المتضمن البناء الحيوي للستيفيوسايد كان قد تغير بتغيير تراكيز السكروز (Praveen وآخرون، 2011). ربما تعود الزيادة الحاصلة في الستيفيوسايد إلى تأثير مُفاعل الغمر المؤقت المستورد، والتبادل الغازي، والاتصال المباشر بين الوسط والنبيتات، وأَشارت الدراسات إلى دورالسكروز في الوسط وتأثيراتها على إنتاج مركبات الأيض الثانوي، ففي مزراع نبات عين البزون يتذبب مستوى المركبات القلويدية مع اختلاف تراكيز السكروز في الوسط إذ يرتفع مع زيادة السكروز من 4 – 10 %، وأيضاً في نبات *Dioscrea deltidea* فإنَّ إنتاج Diosgenin يتاثر بتغيير مستوى السكروز في المزراع الخلوية (ramawat، 2004).

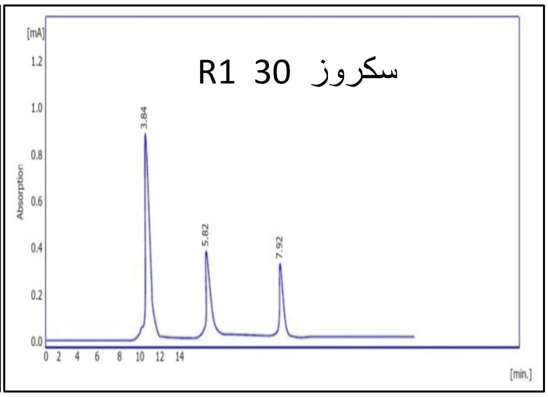
ربما تعود الزيادة في الستيفيوسايد عند اضافة BA الى دور السايتوكاينينات بالاضافة الى انقسام الخلايا وزيادة عدد الافرع في النبات الى دورها في تنظيم دورة الخلايا عن طريق السيطرة على نشاط انزيمات الخلية وكذلك السيطرة على تنظيم المغذيات التي تدخل الى الاوراق (Vince وZoltán، 2011). تتفق نتائج البحث مع نتائج الباحث Ashrafi وآخرون (2022) من زيادة الستيفيوسايد عند المعاملة بالبنزل ادنين متداخلاً مع 2,4-D مقارنة مع معاملة المقارنة لكن هذه الدراسة اجريت في الوسط الصلب فقط ولا توجد دراسات عن دور BA في زيادة الستيفيوسايد في الوسط السائل لمفاعلات الغمر المؤقت.

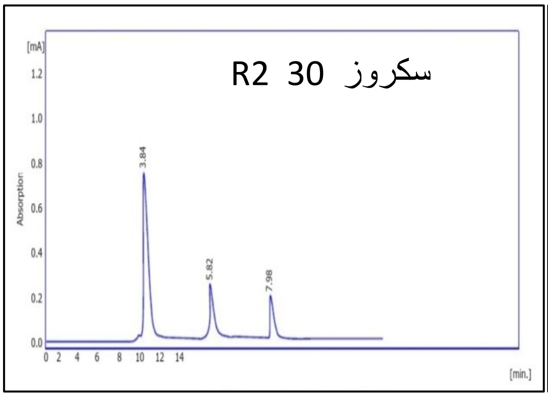
ربما تعود الزيادة في مستوى الستيفيوسايد إلى التأثير التجميعي لجميع العناصر المُضافة لكل من السكروز الذي يتحول إلى الكلوكوز والفركتوز بعد التعرض للحرارة، ويعمل كمصدر كاربون يدخل في مسارات البناء الحيوي لمركب الستيفيوسايد ودور مُفاعل الغمر المؤقت في تحسين التبادل الغازي والاتصال الجيد بين النبيتات والوسط، وكذلك حالة الوسط السائل المضاف له السكروز، ودور BA في زيادة مركب الستيفيوسايد.

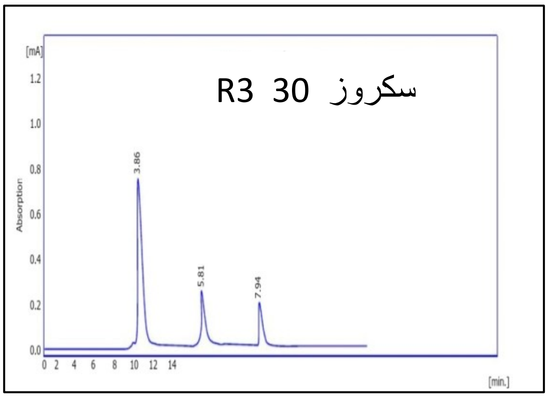
ربما تكون بيئة المُفاعل التجديدة من الهواء و الوسط السائل المحيط بالنبيتات والذي يسهم في تغذية النبيتات وإنتاج مركبات الأيض الثانوي مثل مركبات كلايكوسيدات الستيفول وأنَّ زيادة تراكيز السكروز في مُفاعل الغمر المؤقت ربما يتضمن نشاطاً لعدد من الأنزيمات المسؤولة عن تمثيل السكروز (Kondo وآخرون، 2014) تتفق النتائج مع ما توصل إليه Sharma وآخرون (2015) الذي وجد أنَّ تضمين الوسط بالسكروز بالتركيز 45 غم قد زاد من محتوى الأوراق من الستيفيوسايد.

جدول (23) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له السكروز 30 مع وسط خالٍ من منظمات النمو

المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
5213.66	3.85	5122.08	3.82	5302.49	3.88



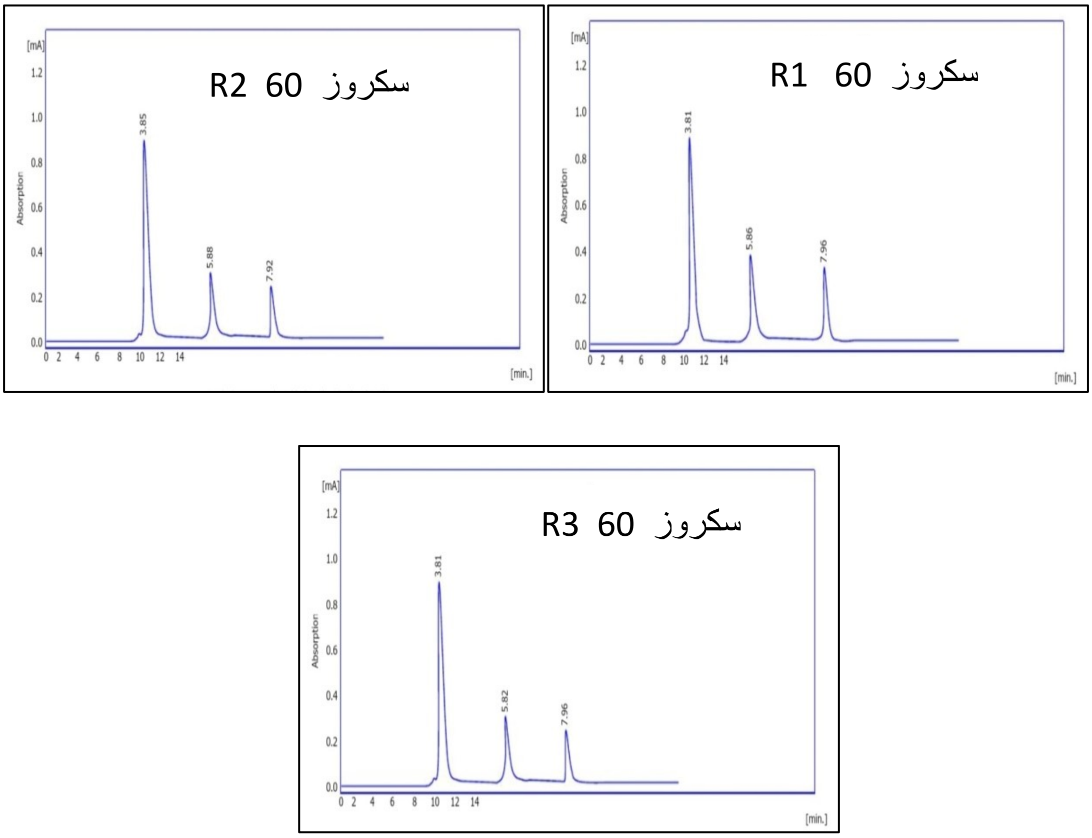




شكل (23) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق نبات الستيفيا في وسط MS حاوٍ على تركيز 30 غم سكروز

جدول (24) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له السكروز 60 مع وسط خالٍ من منظمات النمو

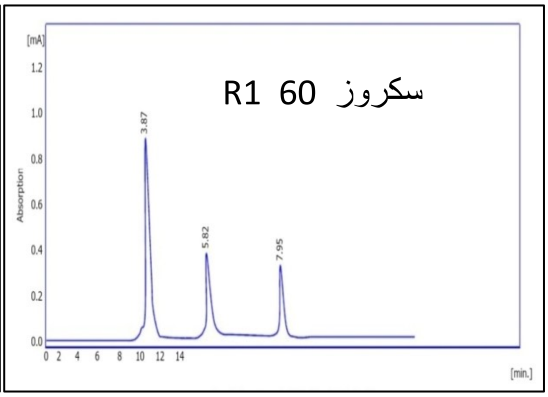
المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
6358.15	3.85	6148.97	3.88	6855.49	3.83

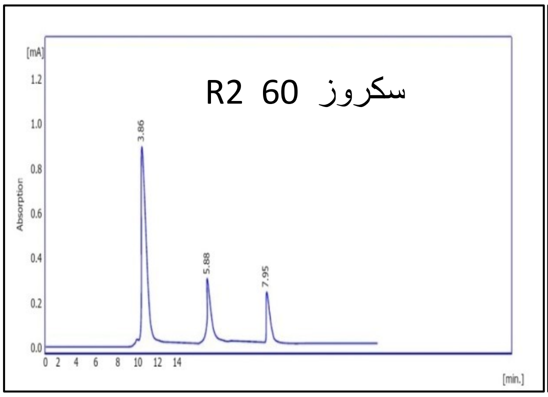


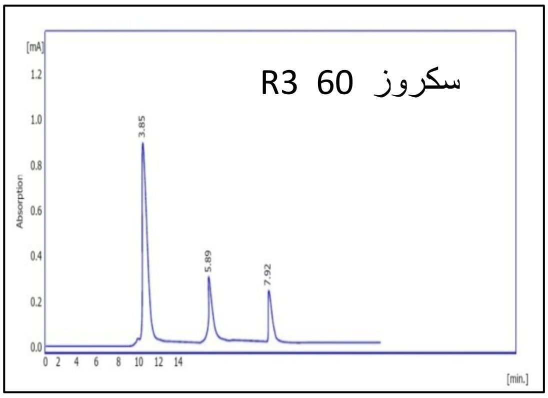
شكل (24) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق نبات الستيفيا في وسط MS حاوٍ على تركيز 60 غم سكروز

جدول (25) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف السكروز 90 مع وسط خالٍ من منظمات النمو

المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
7022.14	3.87	6842.14	3.84	7123.65	3.89



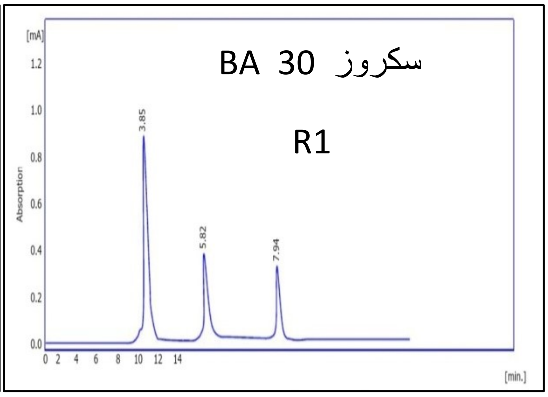


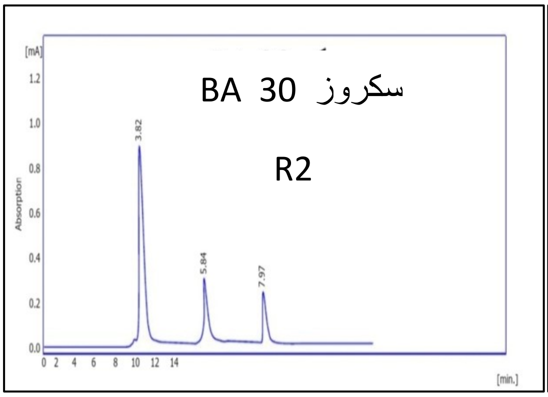


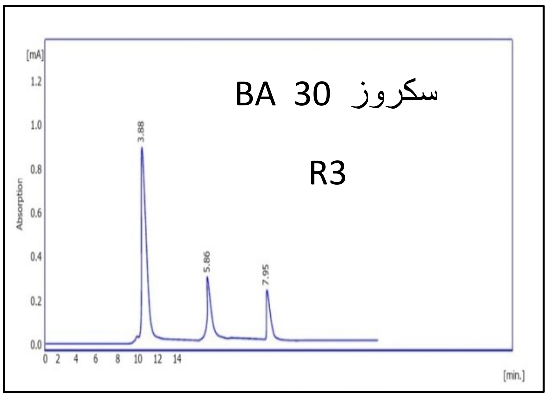
شكل (25) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في وسط MS حاوٍ على سكروز 90 غم

جدول (26) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف السكروز 30 مع وسط مضاف له BA

المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
5960.55	3.87	6011.85	3.83	6158.02	3.81



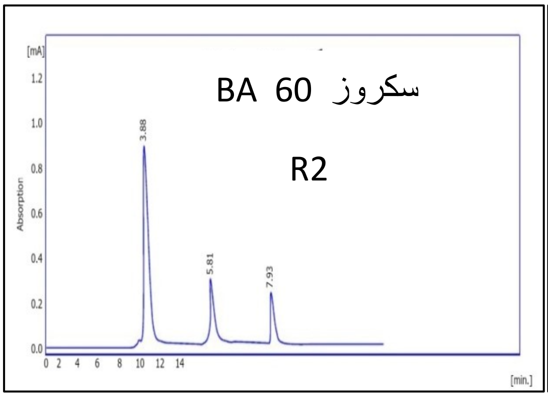


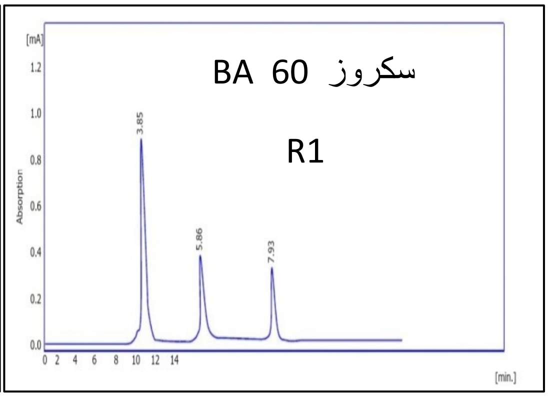


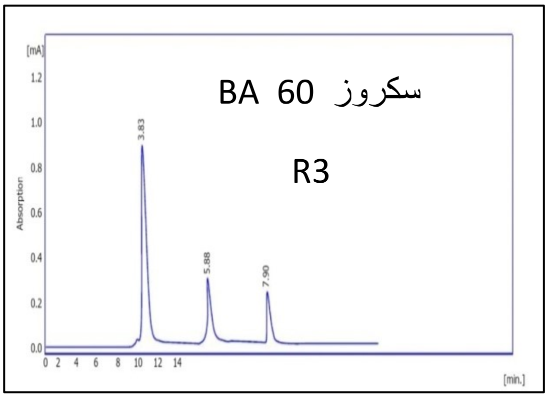
شكل (26) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في وسط حاوٍ على سكروز 30 غم مع تركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA

جدول (27) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له السكروز 60 مع وسط مضاف له BA

المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
7588.97	3.85	7185.64	3.88	7714.59	3.80



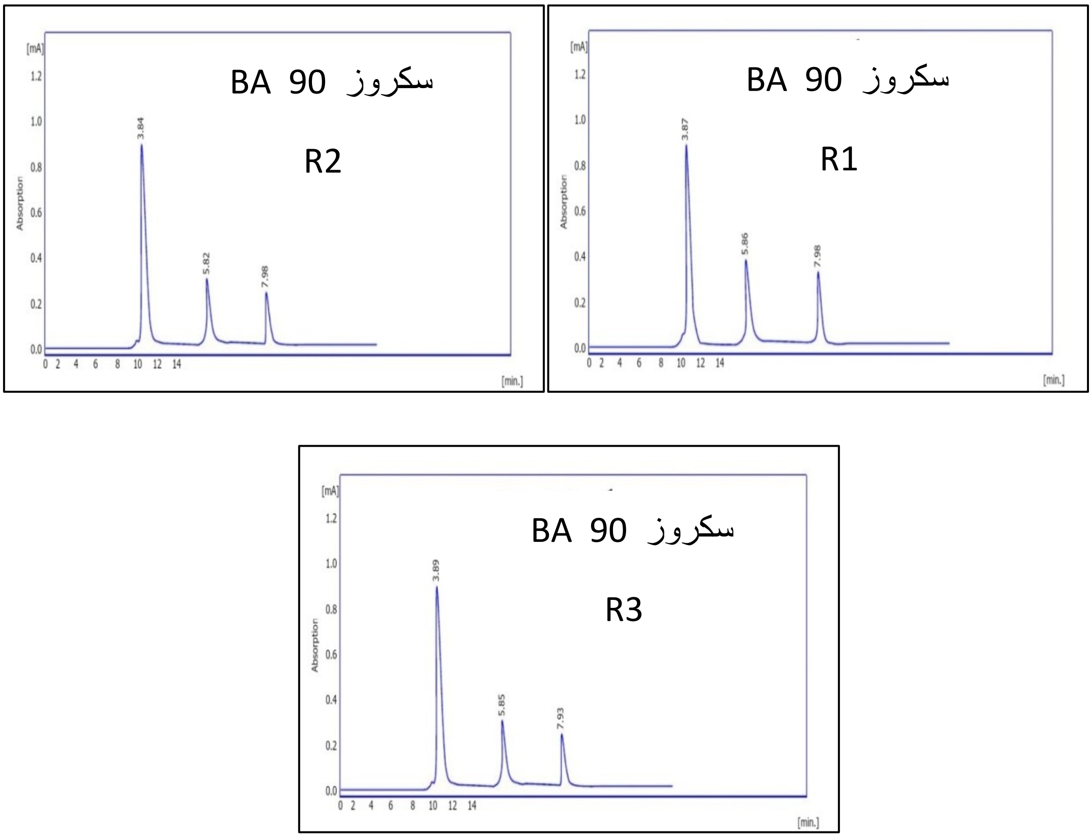




شكل (27) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في وسط حاوٍ على 60 غم سكروز مع تركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA

جدول (28) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له السكروز 90 مع وسط مضاف له BA

المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
8411.26	3.83	8744.08	3.83	8120.32	3.84



شكل (28) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في وسط حاوٍ على 90 غم سكروز مع تركيز 1.0 ملغم لتر-1 BA

4- 8 – 2 – 2 : تأثير حامض السالسلك عند اضافته إلى الوسط الغذائي لنوعين من مُفاعلات الغمر المؤقت

أظهرت نتائج الجدول (29) أنَّ تجهيز الوسط الغذائي السائل بحامض السالسلك بالتركيز 30 ملغم لتر$^{-1}$ زاد من محتوى النبات من الستيفيوسايد وبلغ 493.44 مايكروغم غم$^{-1}$ وزن جاف متفوقاً معنوياً على معاملة 20 ملغم لتر$^{-1}$ والتي بدورها تفوقت على معاملة 10 ملغم لتر$^{-1}$ والتي أعطت أقل محتوى بلغ 129.11 مايكروغم غم$^{-1}$ وزن جاف. كما تشير النتائج إلى تفوق المُفاعل المُصنع مختبرياً معنوياً بأعلى قيمة بلغت 372.15 مايكروغم غم$^{-1}$ على مُفاعل الغمر المؤقت المستورد التي أعطت أقل قيمة مقدارها 239.09 مايكروغرام غم$^{-1}$.

أمَّا في تأثير التداخل بين المعاملات فقد أعطت معاملة 30 ملغم لتر$^{-1}$ من حامض السالسلك متداخلاً مع المُفاعل المُصنع مختبرياً أعلى متوسطاً للستيفيوسايد مقداره 599.78 مايكروغرام غم$^{-1}$ في الجدول(35) و الشكل (34) متفوقاً بذلك معنوياً على جميع المعاملات، وأعطت معاملة 10 ملغم لتر$^{-1}$ SA متداخلاً مع مُفاعل الغمر المؤقت المستورد أقل محتوى بلغت 108.35 مايكروغم غم$^{-1}$ للنبيتات المزروعة في المُفاعل المستورد كما في الجدول (30) والشكل (29)، اما بقية التداخلات فتتبع الجداول (31) و(32) و (33) و (34) والاشكال (30) و(31) و(32) و (33)على التوالي.

جدول (29) تأثير حامض السالسلك المضاف له 90 غم سكروز مع 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA لنوعين من مُفاعلات الغمر المؤقت في زيادة محتوى الأوراق من الستيفيوسايد

نوع المُفاعل / SA (ملغم لتر$^{-1}$)	المُفاعل المُصنع مختبرياً	مُفاعل الغمر المؤقت المستورد	متوسط SA
10	149.88 e	108.35 f	129.11 C
20	366.80 c	221.83 d	294.32 B
30	599.78 a	387.10 b	493.44 A
متوسط تأثير المُفاعل	372.15 A	239.09 B	

المتوسطات ذات الأحرف المتشابهة لا تختلف معنويا فيما بينها عند مستوى احتمال 5% حسب اختبار دنكن متعدد الحدود

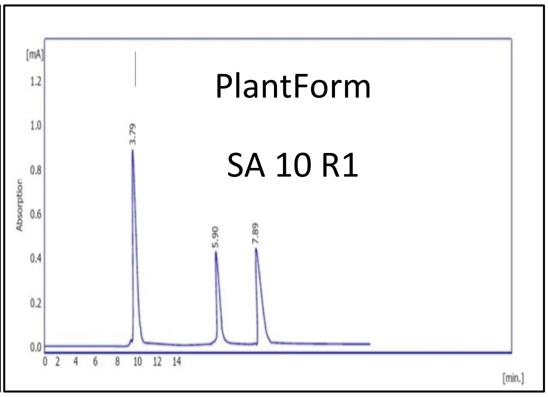
يُعبر عن مصطلح جزيئات الاشارة (Signal Molecules) إلى الجزيئات التي تعمل على تحفيز الدفاعات النباتية ضد الأمراض والأجهادات وتحفيز إنتاج وتراكم مركبات الأيض الثانوي عن طريق تحفيز الدفاعات النباتية (Rhee وآخرون، 2010) إذ يعد حامض السالسلك من الهرمونات النباتية التي يمكن أنَّ تتكون داخلياً (Endogenous) وتلعب دوراً مهماً في إستجابة النبات للإجهادات المختلفة (Horváth وآخرون، 2007). تُفسر النتائج في الجدول (29) إلى دور حامض السالسلك كمنشط لمسارات بناء مركبات الأيض الثانوي والانزيمات (copalyldiphosphate و ent-kaurene) التي تعمل على إنتاج حامض Kauronic (Brandle و Temler، 2007) مع ذلك فإنَّ تأثير المُحفز (elicitor) على تراكم الستيفيوسايد يعتمد على مدى تركيز المحفز و التأثير الفسيولوجي على مسارات البناء التي تتضمن بناء مركب الستيفيوسايد و مدة التعرض للمحفز. ذكر Bayraktar وآخرون (2016) إنَّ إضافة حامض السالسلك إلى الوسط قد حسّن من إنتاج الستيفيوسايد عند اضافته بتركيز 100 مايكرو مول.

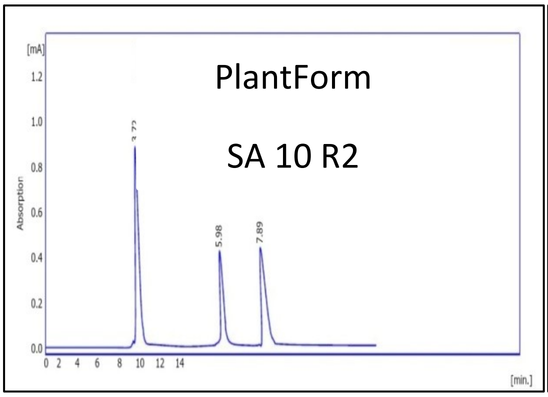
في دراسة اجراها Dong وآخرون (2010) أثبت فيها دور حامض السالسلك في زيادة تراكم مركبات الأيض الثانوي والمركبات الفينولية، ويعتمد كمية مركبات الأيض على التركيز وطول الوقت، إنَّ حامض السالسلك يعمل على تنشيط تراكم مركبات الأيض الثانوي إذ يعطي إشارة للبدء بعملية التراكم كجزء من الإستجابة الدفاعية الخارجية، فضلاً عن دوره في تنظيم العمليات الفسلجية كالنمو والتمثيل الكاربوني وأيض النتروجين مما ينعكس على زيادة المجموع الخضري وبالتالي زيادة إنتاج مركبات ثانوية، ودوره في تحفيز التعبير الجيني لمواد الأيض الثانوي عند اضافته إلى الوسط الغذائي (Zhao وآخرون، 2005 ؛Hayat و Ahmed، 2007).

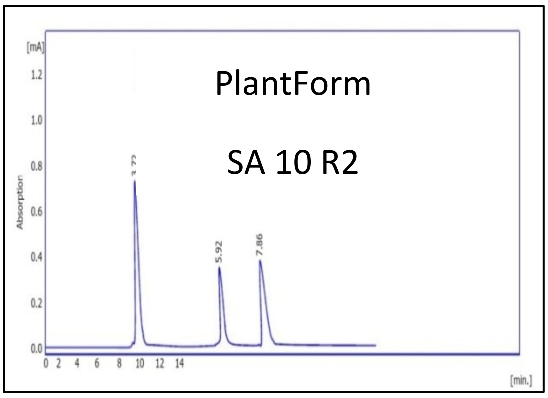
يمكن زيادة مركبات الأيض الثانوي في مُفاعلات الغمر المؤقت عن طريق أمثلة الوقت ومدة الغمر وعدد مرات الغمر (Ivanov وآخرون، 2012 ؛ Georgiev وآخرون، 2014). تتفق النتائج مع بعض ما توصل إليه Vives وآخرون (2017) بمقارنة نباتات نامية على وسط صلب و وسط سائل في مُفاعل الغمر المؤقت في محتوى النبات من الستيفيوسايد، إذ وجد ان النبات النامي في مُفاعل الغمر المؤقت قد أعطى كمية ستيفيوسايد أكثر من الوسط صلب في 1 غم مادة جافة 43.4 ملغم غم$^{-1}$ في الوسط السائل و 3.11 ملغم غم$^{-1}$ وسط شبه صلب.

جدول (30) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له 90 غم السكروز مع وسط BA مع تركيز 10 ملغم لتر$^{-1}$ SA

المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
5421.59	3.79	5570.15	3.72	5021.58	3.72



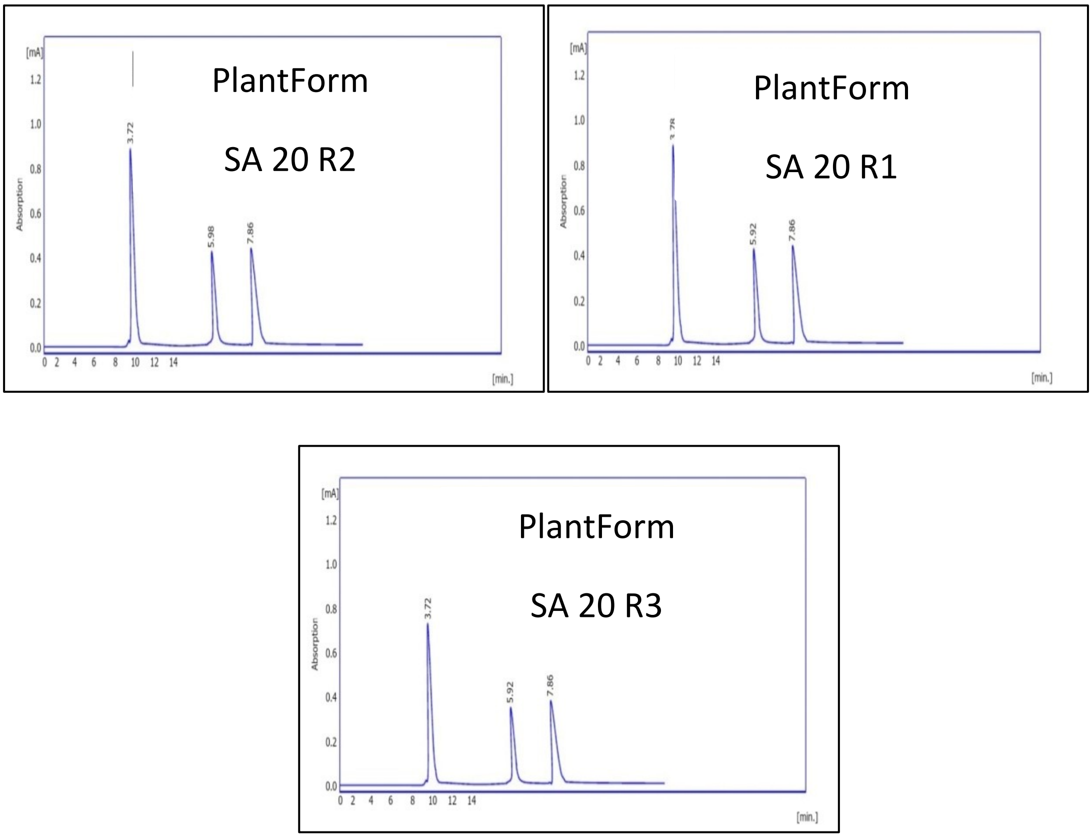




شكل (29) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المجهز بحامض السالسلك بالتركيز 10 ملغم لتر$^{-1}$

جدول (31) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له 90 غم سكروز مع BA مع تركيز 20 ملغم لتر$^{-1}$ SA

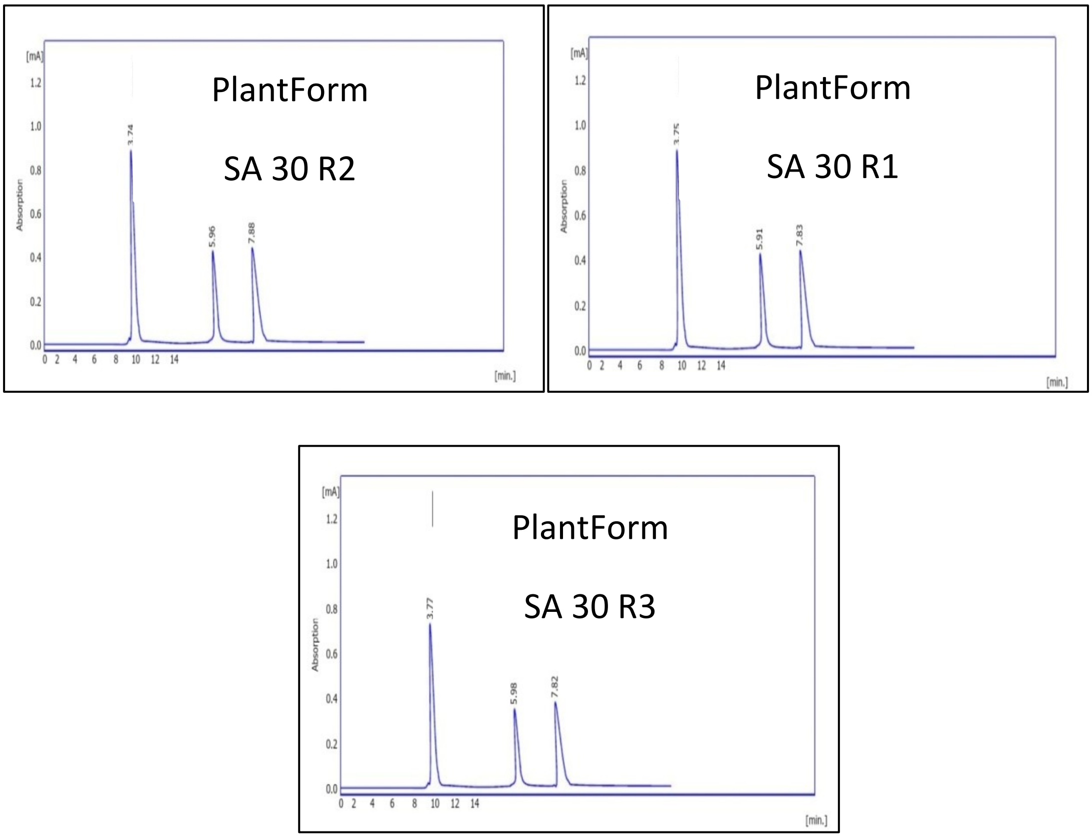
المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
10552.65	3.78	11230.14	3.72	11002.23	3.72



شكل (30) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المجهز بحامض السالسلك بالتركيز 20 ملغم لتر$^{-1}$

جدول (32) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المضاف له 90 غم سكروز مع وسط BA مع تركيز 30 ملغم لتر$^{-1}$ SA

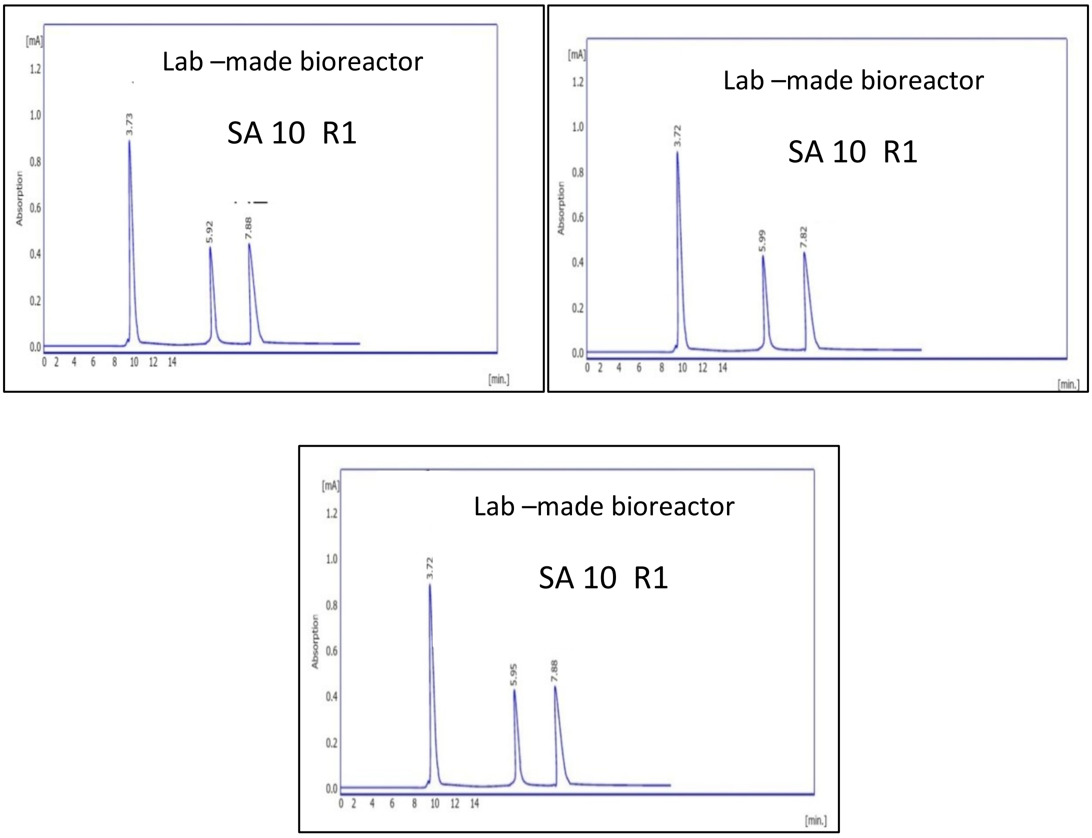
المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
19885.45	3.75	18221.49	3.74	19102.05	3.77



شكل (31) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد المجهز بحامض السالسلك بالتركيز 30 ملغم لتر$^{-1}$

جدول (33) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً المضاف له 90 غم السكروز مع وسط BA مع تركيز 10 ملغم لتر$^{-1}$ SA

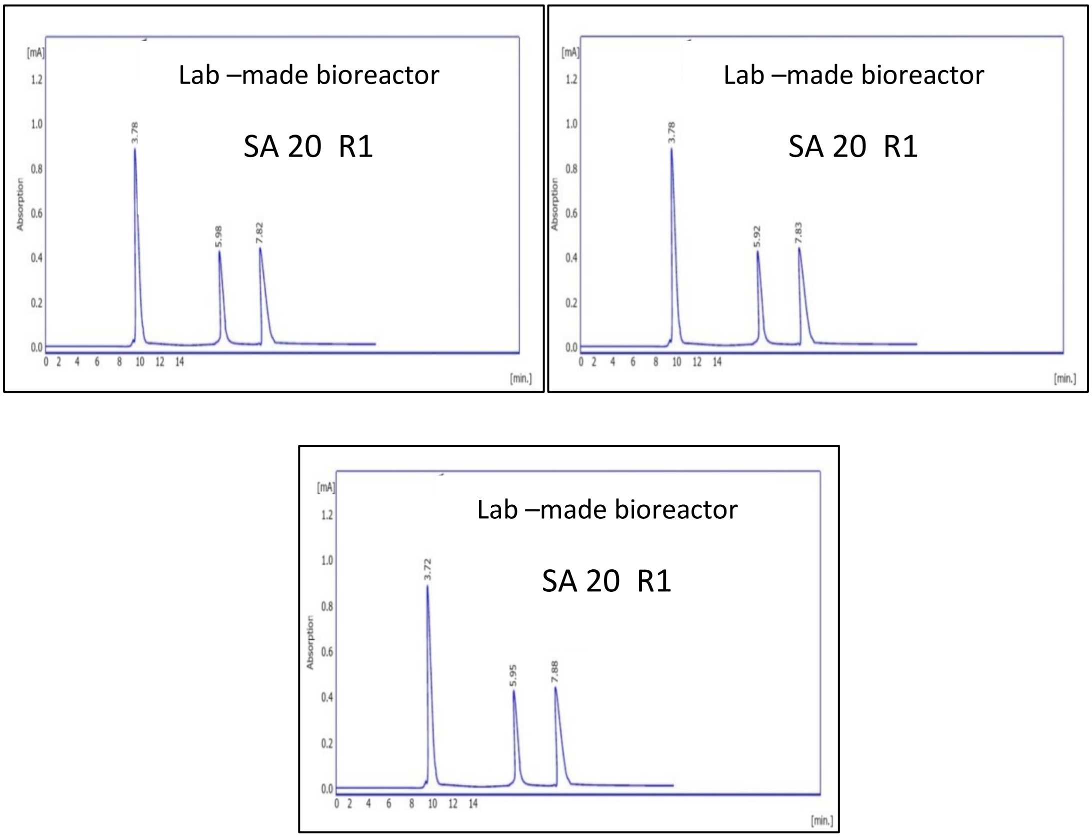
المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
7885.04	3.72	7120.46	3.73	7145.08	3.72



شكل (32) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً المجهز بحامض السالسلك بالتركيز 10 ملغم لتر$^{-1}$

جدول (34) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً المضاف له 90 غم السكروز مع وسط BA مع تركيز 20 ملغم لتر-1 SA

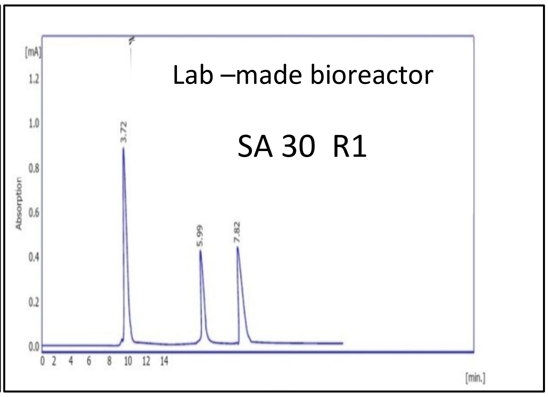
المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
18210.23	3.78	17885.08	3.78	18114.25	3.72

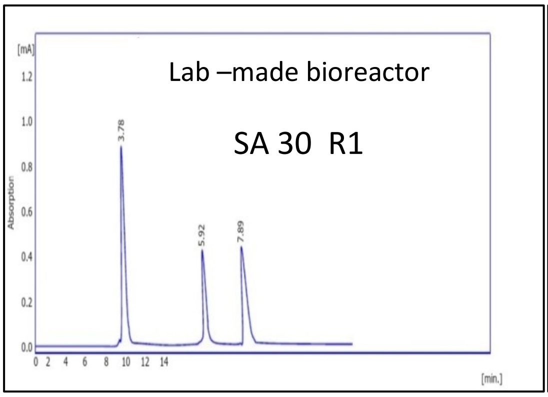


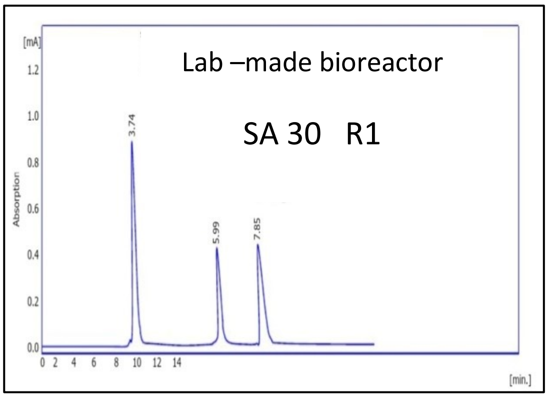
شكل (33) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المصنع مختبرياً المجهز بحامض السالسلك بالتركيز 20 ملغم لتر-1

جدول (35) زمن الاستبقاء ومساحة الحزمة للعنيات المفصولة في جهاز HPLC من أوراق النبات المزروع في مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبرياً المضاف له 90 غم السكروز مع وسط BA مع تركيز 30 ملغم لتر-1 SA

المكرر الأول		المكرر الثاني		المكرر الثالث	
مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء	مساحة الحزمة	زمن الاستبقاء
29562.08	3.72	30022.14	3.78	29056.58	3.74







شكل (34) منحنيات الفصل الكروماتوكرافي لعينة من أوراق الستيفيا في مُفاعل الغمر المؤقت المصنع مختبرياً المجهز بحامض السالسلك بالتركيز 30 ملغم لتر-1

5- الاستنتاجات والتوصيات

1-5 الإستنتاجات

1- إضافة BA بتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ أعطى أفضل تضاعف للأفرع. إضافة Kin بالتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ أعطى أفضل تضاعف للأفرع ولكن أقل من BA.

2 - أدت إضافة NAA بالتركيز 2.0 و3.0 ملغم لتر$^{-1}$ الى الحصول على نتيجة للكالس بلغت 100% مع قوام صلب ولون أخضر فاتح. أدت إضافة 2,4-D بالتركيز 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ إلى تكوين كالس من الأوراق بنسبة 50 % مع قوام صلب ولون أصفر فاتح.

3- المُفاعل المصنع مختبرياً اعطى تضاعف للافرع بلغ 3.2 فرع نبات عند 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA.

4- استخدام السكروز 30 غم لتر$^{-1}$ مع BA بتركيز1.0 ملغم لتر$^{-1}$ في مزارع الوسط الصلب أعطى ستيفيوسايد يقدر 84.21 مايكروغم غم$^{-1}$. محتوى النبات من الستيفيوسايد يتأثر بتغير تراكيز حامض السالسلك المضاف، و تراكيز السكروز في الوسط الغذائي في مُفاعلات الغمر المؤقت.

5- 2 : التوصيات

1 – دراسة تأثير أنواع من السايتوكاينينات في تضاعف نبات الستيفيا واستحثاث الكالس بتوليفات من منظمات النمو

2- دراسة تأثير مدد غمر أخرى في تضاعف نبات الستيفيا وتأثيرها على محتوى النبات من الستيفيوسايد

3- استخدام مُفاعلات الغمر المؤقت في الإكثار الدقيق وزيادة المركبات الثانوية

4- دراسة زيادة الستيفيوسايد في مزارع الكالس.

6- المراجع

6 – 1: المراجع العربية

ابو زيد، الشحات نصر . 2000 . الهرمونات النباتية والتطبيقات الزراعية . الطبعة الثانية. الدار العربية للنشر والتوزيع. جمهورية مصر العربية.

الاسدي، ماهر حميد سلمان، علي حسين جاسم الخيكاني.2019. الهرمونات النباتية وتأثيراتها الفسلجية . كلية الزراعة. جامعة القاسم الخضراء . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .جمهورية العراق

جندية ، حسن .2003 . فسيولوجيا أشجار الفاكهة (أحدث الطرائق في علاج مشاكل الزراعة والتربية والإنتاج لأشجار الفاكهة في الأراضي المحتلفة).الدار العربية للنشر والتوزيع .القاهرة. جمهورية مصر العربية.

الحسني ، زينب حامد عبد الرحيم . 2021 .امكانية زيادة مركبي التحلية ودراسة المؤشرات الجزيئية في نبات الستيفيا بتوظيف تقانات الزراعة النسيجية والتطفير. اطروحة دكتوراه . جامعة بغداد . العراق.

الخفاجي ، مكي علوان .2014 . منظمات النمو النباتية تطبيقاتها واستعمالاتها. كلية الزراعة .جامعة بغداد . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جمهورية العراق.

الساهوكي ، مدحت مجيد وكريمة وهيب .1990 . تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب . دار الحكمة للطباعة والنشر. الموصل، ص488

سلمان ، محمد عباس .1988 . أساسيات زراعة الخلايا النباتية، جامعة بغداد ، جمهورية العراق، ص416.

الصالحي، قيس جميل و كاظم محمد الصميدعي . 2014 . تقانات النبات الأحيائية ، جامعة النهرين ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جمهورية العراق.

الصميدعي، كاظم محمد إبراهيم .2017 . تطبيقات في التقانات الاحيائية النباتية . الجزء الأول ، جامعة النهرين . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جمهورية العراق.

عبدول ، كريم صالح . 1987 . منظمات النمو النباتية . الجزء الأول . جامعة صلاح الدين . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جمهورية العراق.

فهمي، فكري جلال محمد .2003 . زراعة الأنسجة النباتية . كلية الزراعة . جامعة أسيوط . مصر ص246.

الكرخي ، محمد ظاهر عبد الهادي . 2018 .الإكثار الدقيق لنبات الداؤدي من العقد المفردة وتحفيز التغاير لتحمل الاجهاد الملحي في المزارع النسيجية . رسالة ماجستير .جامعة ديالى . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جمهورية العراق.

المختار، سراب عبد الهادي ،إبراهيم عبد الله حمزة ومحمد شهاب حمد .2010 . تأثير الوسط الغذائي والجزء النباتي والأوكسين في استحثاث الكالس من نبات الخشخاش *Papaver somniferum* خارج الجسم الحي. مجلة كربلاء 8 (2) : 184-192.

المنظمة العربية للزراعة والتنمية . 1988 النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي جامعة الدول العربية . الخرطوم. السودان.

6- : المراجع الأجنبية

Abd EL-Motaleb, M, M. S. Abd EL-Hady; M. A. El-Kholy and A. Badr. 2013. In vitro propagation *of Stevia rebaudiana* Bertoni in Egypt. Journal of Applied Sciences Research 9(8):4597-4605.

Abou-Arab, A. E., Abou-Arab, A. A., Abu-Salem, M. F. 2010 . Physico chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. African Journal of Food Science, 4.5, 269-281.

Ahmed, K. Z., Sayed, A. M., Saber, S. M., Abdel-Hamed, A. A. 2018. An Efficient *In vitro* Culture Protocol of Stevia Plants .*Stevia rebaudiana* Bertoni Var. Chaine. 2 With Cytogenetical Studies.

Department of Genetics, Faculty of Agriculture, Minia University, El-Minia, Eg-61519, Egypt.

Albarran, J.,Bertrand,B., Lartaud, M., Etienne, H. 2005. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee .*Coffea arabica* somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81, 27-36.

Alvarenga Venutolo, S., Salazar Aguilar, T . 2015. Mass microprogation of Stevia rebaudiana Bertoni in temporary immersion systems. Cultivos tropicales, 36.3, 50-57.

Aman, N., Hadi, F., Khalik, S.A., Zamir, R., Ahmad, N. 2013. Efficient regeneration for enhanced steviol glycosides production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). C. R. Biol. 336, 486–492.

Anbazhagan, M., Kalpana, M., Rajendran, R., Natarajan, V., Dhanavel, D. 2010 . *In vitro* production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Emirates Journal of Food and Agriculture, 216-222.

Anulika, N. P., Ignatius, E. O., Raymond, E. S., Osasere, O. I., Abiola, A. H. 2016. The chemistry of natural product: Plant secondary metabolites. Int. J. Technol. Enhanc. Emerg. Eng. Res, 4.8, 1-9.

Aragón C, Sánchez C, Gonzalez-Olmedo J, Escalona M, Carvalho L, Amâncio S . 2014. Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during *in vitro* growth and acclimatization. Biol Plant 58:29–38

Arora R. 2020. Medicinal plant biotechnology. UK: CABI.

Ascough, G. D., Fennell, C. W. 2004 . The regulation of plant growth and development in liquid culture. South African Journal of Botany, 70.2, 181-190.

Ashrafi, K., Iqrar, S., Saifi, M., Khan, S., Qamar, F., Quadri, S. N. Abdin, M. Z. 2022 . Influence of Plant Growth Regulators on Glandular Trichome Density and Steviol Glycosides Accumulation in *Stevia rebaudiana*. ACS Omega, 7(35), 30967-30977.

Bajwa, V. S., Shukla, M. R., Sherif, S. M., Murch, S. J., Saxena, P. K. 2014. Role of melatonin in alleviating cold stress in *Arabidopsis thaliana*. Journal of pineal research, 56.3, 238-245.

Banerjee, M., and P. Sarkar. 2009. Somatic embryogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni using different concentration of growth hormones. International Journal of Plant Science 5: 284–289

Bayraktar, M. 2019. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni using RITA bioreactor. HortScience, 54.4, 725-731.

Bayraktar, M., Naziri, E., Akgun, I. H., Karabey, F., Ilhan, E., Akyol, B., Gurel, A. 2016. Elicitor induced stevioside production, *in vitro* shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 127, 289-300.

Blinstrubienė, A., Burbulis, N., Juškevičiūtė, N., Vaitkevičienė, N., Žūkienė, R. 2020. Effect of growth regulators on *Stevia rebaudiana* Bertoni callus genesis and influence of auxin and proline to steviol glycosides, phenols, flavonoids accumulation, and antioxidant activity *in vitro*. Molecules, 25.12, 2759.

Bondarev, N., Reshetnyak, O., Nosov, A. 2001. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Science, 161(1), 155-163.

Bondarev, N., Reshetnyak, O., Nosov, A., 2003. Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. Plant Sci. 165 (4), 845–850.

Brandle, J. E., Telmer, P. G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry, 68.14, 1855-1863.

Buraphaka, H., Putalun, W. 2020. Stimulation of health-promoting triterpenoids accumulation in *Centella asiatica* .L. Urban leaves triggered by postharvest application of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors. Industrial Crops and Products, 146, 112171.

Caponetti, J. D., Gray, D. J., Trigiano, R. N. 2005. History of plant tissue and cell culture. In Plant development and biotechnology .pp. 9-15. Florida: CRC Press.

Chandel, N. S. 2021. Lipid metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *13*(9), a040576.

Chatsudthipong, V., Muanprasat, C. 2009. Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. Pharmacology therapeutics, 121.1, 41-54.

Cline, M. G. Harrington, C. A. 2007. Apical dominance and apical control in multiple flushing of temperate woody species. Canadian j. of Forest Res., 37.1:74-83.

Cuenca, B., Sánchez, C., Aldrey, A., Bogo, B., Blanco, B., Correa, B., Vidal, N. .2017. Micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut .*Castanea sativa*× *C. crenata* in liquid medium in a continuous immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture .PCTOC, 131, 307-320.

Cui, X. H., Murthy, H. N., Wu, C. H., & Paek, K. Y. 2010. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 103, 7-14.

Davies, J. P. 1995 . Plant Hormones . Cornell University , New York U. S. A.pp 740.

De Carlo, A., Tarraf, W., Lambardi, M., Benelli, C. .2021. Temporary immersion system for production of biomass and bioactive compounds from medicinal plants. Agronomy, 11.12, 2414.

Deshmukh, N., Talkal, R., Khan, N. 2017. *In vitro* propagation and determination of genetic stability of micropropagated plants of *Stevia rebaudiana*. IJARIIE International Journal of Advance Research and Innovative Ideas in Education, 3, 884-894.

Devlin M, Witham H. 1983. Plant physiology, 4th Ed. Publishers Willard, Grant Press, Boston.

Dixon, R. A., Gonzales, R. A. .Eds.. .1994. Plant cell culture: a practical approach .No. 145. IRL press.

Dong, Juane.Guowei Wan, Zongsuo Liang .2010. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture., 148(23), 99–104.

Dwivedi, R. S .1999. Unnurtured and untapped super sweet nonsacchariferous plant species in India. Current science, 76.11, 1454-1461.

Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Hagège, D., Courtois, D., Joseph, C. 2013. The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphtodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture .PCTOC, 113, 25-39.

Gatti, E., Sgarbi, E., Ozudogru, E. A., Lambardi, M. 2017. The effect of PlantformTM bioreactor on micropropagation of Quercus robur in comparison to a conventional *in vitro* culture system on gelled medium, and assessment of the microenvironment influence on leaf structure. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 151.6, 1129-1136.

George , E. F., Hall, M. A. and Klerk, G. D. 2008. Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Published by spring. pp:1- 479.

Georgiev, M. I., Weber, J. 2014. Bioreactors for plant cells: hardware configuration and internal environment optimization as tools for wider commercialization. Biotechnology letters, 36, 1359-1367.

Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T. .2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. Engineering in life sciences, 14.6, 607-621.

Gregersen, S., Jeppesen, P. B., Holst, J. J., Hermansen, K. .2004. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. Metabolism, 53.1, 73-76.

Guleria, P, Kumar V, Yadav SK. 2011. Effect of sucrose on steviol glycoside biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana*. Asian J Plant Sci; 10: 401-409.

Gupta P, Sharma S, Saxena S . 2014 . Effect of Salts (NaCl and Na2CO3) on Callus and Suspension Culture of *Stevia rebaudiana* for Steviol glycoside Production. Appl Biochem Biotechnol; 172: 2894–2906.

Gürel, S., & Gülşen, Y. 1998. The effects of different sucrose, agar and pH levels on *in vitro* shoot production of almond (*Amygdalus communis* L.). *Turkish Journal of Botany*, *22*(6), 363-374.

Guruchandran, V., Sasikumar, C . 2013. Organogenic plant regeneration via callus induction in *Stevia rebaudiana* Bert. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2.2, 56-61.

Han, H., Zhang, S., Sun, X. 2009. A review on the molecular mechanism of plants rooting modulated by auxin. African Journal of Biotechnology, 8.3.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies Jr, F. T., Geneve, R. L. 2002. The Feasibility of Utilizing Tobacco Greenhouses as Propagation Facilities for Ornamental Plants. In Combined Proceedings International Plant Propagators' Society (Vol. 52, p. 440).

Hayat, S., and Ahmed, A., 2007. Salicylic acid: A plan hormone. Published in Springer: 401.

Hdider, C., & Desjardins, Y. 1994 . Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 36, 27-33.

Hedden, P. and Stephen, G. 2006. Plant Hormone signaling . Blackwell Publisher L td. pp:97-101.

Hilo, B.R., Hussain, N.H., Khaleel, S.A., Hullo, B. 2020. Effect of some growth regulators on glycosides leaf content of *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro*. Plant Arch. 2020, 20, 1715–1720.

Horváth, E., Szalai, G., Janda, T. 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. Journal of Plant Growth Regulation, 26, 290-300.

Hurum, D., Rohrer, J. 2011. Steviol glycoside determination by HPLC with charged aerosol and UV detections using the acclaim trinity P1 column. Application Note, 293.

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The plant cell*, *25*(9), 3159-3173.

Ivanov, I., Georgiev, V., Berkov, S., & Pavlov, A. 2012. Alkaloid patterns in *Leucojum aestivum* shoot culture cultivated at temporary immersion conditions. *Journal of Plant Physiology*, *169*(2), 206-211.

Jala, A. 2012 . Effects of NAA ,BA and Sucrose on Shoot Induction and Rapid Micropropagation by Trimming Shoot of *Curcuma longa* L. Science Technology Asia, 54-60.

Javed, R., Yucesan, B., Zia, M., Gurel, E. 2017. Differential effects of plant growth regulators on physiology, steviol glycosides content, and antioxidant capacity in micropropagated tissues of *Stevia rebaudiana*. Biologia, 72.10, 1156-1165.

Joseph, B., Jini, D., Sujatha, S. 2010. Insight into the Role of Exogenous Salicylic Acid on. Asian Journal of Crop Science, 2(4), 226-235.

Kang, S. M., Jung, H. Y., Kang, Y. M., Yun, D. J., Bahk, J. D., Yang, J. K., Choi, M. S. 2004. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Science, 166.3, 745-751.

Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Tavarini, S., Pompeiano, A., Angelini, L. G. .2016. The positive role of steviol glycosides in stevia .*Stevia rebaudiana* Bertoni under drought stress condition. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 150.6, 1323-1331.

Khierallah, H. S. M., Al-Obaidy, O. M. A. 2017. effect of expalnt type and some plant growth regulators on culture initiation of stevia plants *in vitro*. The Iraqi Journal of Agricultural Science, 48.5, 1206-1214.

Kilayri ,JM. Bahrany, AM .2002. Callus growth and proline accumulation in response to sorbitol and sucrose induced osmotic stress in rice. Biol Plant 45:609–611

Koch, K. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Annu Rev Plant Biol; 47: 509-540.

Kondo, S., Tomiyama, H., Rodyoung, A., Okawa, K., Ohara, H., Sugaya, S & Hirai, N. 2014. Abscisic acid metabolism and anthocyanin synthesis in grape skin are affected by light emitting diode (LED) irradiation at night. Journal of plant physiology, 171(10), 823-829.

Koubaa, M., Roselló-Soto, E., Šic Žlabur, J., Rezek Jambrak, A., Brncic, M., Grimi, N., Barba, F. J. 2015. Current and new insights in the sustainable and green recovery of nutritionally valuable compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63.31, 6835-6846.

Kumar, N., Batra, P., Kajla, S., Chowdhury, V. K. 2017 An efficient micropropagation protocol for an anti-diabetic natural sweetener plant-*Stevia rebaudiana* Bertoni. Eco. Env. Cons. 23 .3; pp.1535-1540

Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K. .2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food chemistry, 132.3, 1121-1132.

Lorenzo, JC., Blanco, MA., Peláez, O., González, A., Cid M, Iglesias. A., González, B., Escalona, M., Espinosa, P., Borroto,C .2001. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. Plant Cell Tiss ,Org Cult 65:1–8

Mahdi, A.A., Gabr M.F., Abo El-Fadl R.E., Hassan A.H., Abdelhamid A.H., El-Saber M.M .2021. Green biosynthesis of magnetite nanoparticles via neem extracts effect on molecular and biochemical *Stevia rebudiana* callus. IOSR J. Biotech. Biochem., 7.5: 40-58.

Mahesh, S. 2008. Plant Molecular Biotechnology, First edition published by New Age International publishers, New Delhi, India. 432.

Mahmud, S., Akter, S., Jahan, I. A., Khan, S., Khaleque, A., and Islam, S. 2014. Comparative analyses of stevioside between fresh leaves and in-vitro derived callus tissue from *Stevia rebaudiana* Bert. using

HPLC. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 49 .4 :199–204.

Maiti, R. K. and Purohit,S. S. 2008. Stevia: A miracle plant for human health. Agrobios .India Jodhpur, India.

Margl, L., Tei, A.; Gyurjan, I. and Wink, M. 2002. GLC-MS analysis of thiophene derivatives in plant and *in vitro* culture of *Tagetes patula* .Asteraceae Z. Naturforsch, 57: 63-7.

Martínez-Estrada, E., Islas-Luna, B., Pérez-Sato, J. A., Bello-Bello, J. J. 2019. Temporary immersion improves *in vitro* multiplication and acclimatization of *Anthurium andreanum* Lind. Scientia Horticulturae, 249, 185-191.

Mehta, J., Dadhich, L. K. 2015. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. In different Kind of basal medium. International Journal of Pure and Applied Bioscience, 3, 264-270.

Mejía-Espejel, L., Robledo-Paz, A., Lozoya-Gloria, E., Peña-Valdivia, C. B., Carrillo-Salazar, J. A. 2018. Elicitors on steviosides production in *Stevia rebaudiana* Bertoni calli. Scientia Horticulturae, 242, 95-102

Memelink, J. 2005. Tailoring the plant metabolome without a loose stitch. Trends in Plant Science, 10.7, 305-307.

Modi, A. R., Patil, G., Kumar, N., Singh, A. S., & Subhash, N. 2012. A simple and efficient in vitro mass multiplication procedure for *Stevia rebaudiana* Bertoni and analysis of genetic fidelity of in vitro raised plants through RAPD. *Sugar Tech*, *14*, 391-397.

Moharramnejad, S., Azam, A. T., Panahandeh, J., Dehghanian, Z., Ashraf, M. 2019. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on *in vitro* growth, stevioside production, and oxidative defense system in *Stevia rebaudiana*. Sugar Tech, 21, 1031-1038

Mok, M. C., Martin, R. C., Mok, D. W. 2000. CytoKinins: biosynthesis metabolism and perception. *In vitro* Cellular Developmental Biology-Plant, 36, 102-107.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3):473-497.

Naik, P. M., Al-Khayri, J. M. 2016. Impact of abiotic elicitors on *in vitro* production of plant secondary metabolites: a review. Journal of Advanced Research in Biotechnology, 1.2, 1-7.

Namdeo, A. G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Pharmacogn Rev, 1.1, 69-79.

Noordin, N; Ibrahim, R. Sajahan, N. H. Nahar, S. M. M. Nahar, S. H. M. and Abdul Rashid, N. R. 2012. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni through temporary Immersion Bioreactor System. Research and Development Seminar, INIS, Malaysia, p. 1–8.

Nower, A.A. 2014. In vitro propagation and synthetic seeds production: An efficient method for *Stevia rebaudiana* Bertoni. Sugar Tech 16: 100–108.

Ojha, A., Kumar, S., Singh, G., Tyagi, B. S. 2012. *In vitro* callus induction from leaf and stem explant of the natural sweetener plant, *Stevia rebaudiana* Bertoni. African Journal of Biotechnology, 11, 34.

Pérez A., Napoles L., Carvajal, C., Hernandez M., Lorenzo, JC. 2004. Effect of sucrose, inorganic salts, inositol and thiamine on protease excretion during pineapple culture in temporary immersion bioreactors. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 40:311–316

Pérez-Alonso, N., Wilken, D., Gerth, A., Jähn, A., Nitzsche, H., Kerns, G., Capote-Perez, A., Jiménez, E . 2009. Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. Plant Cell Tiss Org Cult 99:151–156

Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N., Bednarek, P. 2015. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. New Phytologist, 206.3, 948-964.

Praveen, G., Vineet, K., Yadav, S. K. 2011. Effect of sucrose on steviol glycoside biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana*. Asian Journal of Plant Sciences, 10(8), 401-407.

Puranik, S., Sahu, P. P., Srivastava, P. S., Prasad, M. 2012. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. Trends in plant science, 17.6, 369-381.

Quiala, E., Cañal, M. J., Meijón, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., Barbón, R. 2012 . Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 109, 223-234.

Raghavan, V., Nagmani, R. 1983. Morphogenesis of pollen callus cultures of *Hyoscyamus niger*. American journal of botany, 70.4, 524-531.

Rahim, Z. H. A., Jawad, L. K. 2021. The Role of Growth Regulators in The Multiplication of *Stevia Rebaudiana* Bertoni Shoot and Callus Induction in Vitro. Diyala Agricultural Sciences Journal, *13*(2), 24-31.

Ramawat, K. G. 2004. PlantBiotechnology. S. Chandand Company LTDNew Delhi, India

Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M., Palazon, J. 2016. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. Molecules, 21(2), 182.

Ramírez-Mosqueda, M. A., Iglesias-Andreu, L. G., Ramírez-Madero, G., & Hernández-Rincón, E. U. 2016. Micropropagation of Stevia rebaudiana Bert. in temporary immersion systems and evaluation of genetic fidelity. *South African Journal of Botany*, *106*, 238-243.

Rathi, N., Arya, S. 2009. *In vitro* regeneration through callus culture of medicinally important plant *Stevia rebaudiana* .Bert.. Int J Plant Sci 4 .2: 559-563.

Razak, U. N. A. A., Ong, C. B., Yu, T. S., Lau, L. K. .2014. *In vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. Brazilian Archives of Biology and Technology, 57, 23-28.

Razdan, M.K. .2003. Introduction to Plant Tissue Culture; Science Publishers: Enfield, NH, USA; Plymouth, UK,

Rhee, H. S., Cho, H. Y., Son, S. Y., Yoon, S. Y. H., Park, J. M. 2010. Enhanced accumulation of decursin and decursinol angelate in root cultures and intact roots of *Angelica gigas* Nakai following

elicitation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture .PCTOC, 101, 295-302.

Röck-Okuyucu, B., Bayraktar, M., Akgun, I. H., Gurel, A. 2016. Plant growth regulator effects on *in vitro* propagation and stevioside production in *Stevia rebaudiana* Bertoni. HortScience, 51(12), 1573-1580.

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *57*, 675-709.

Rosales, C., Brenes, J., Salas, K., Arce-Solano, S., Abdelnour-Esquivel, A. 2018. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* in temporary immersion systems as an alternative horticultural production method. Revista Chapingo. Serie horticultura, 24(1), 69-84.

Sacco, E., Mascarello, C., Pamato, M., Musso, V., Ruffoni, B. 2013, June. Evaluation of temporary immersion system for *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. In VIII International Symposium on *In vitro* Culture and Horticultural Breeding 1083 .pp. 327-334.

Sahu, J., Sahu, R. K. 2013. A review on low cost methods for *in vitro* micropropagation of plant through tissue culture technique. Pharmaceutical and Biosciences Journal, 38-41.

Sakakibara, H. 2006. CytoKinins: activity, biosynthesis, and translocation. Annu. Rev. Plant Biol., 57, 431-449.

Sharma, N., Gauchan, D. P., Dhakal, A., Luitel, A., Shakya, S., Shakya, R. 2015. Establishment of regenerative callus, cell suspension system and molecular characterization of *Stevia rebaudiana* Bertoni

for the production of stevioside in *in vitro*. Int J Res Appl Sci Eng Technol, 3.3, 133-48.

Shivanna, N., Naika, M., Khanum, F., Kaul, V. K. 2013. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. Journal of Diabetes and its Complications, 27.2, 103-113.

Shuvo, M. M. A., Mohammad, A. M., Chowdhury, T., Absar, N., Hasanuzzaman, M. 2015. An assessment of major nutritional components and some secondary metabolites of in-vitro propagated *Stevia rebaudiana* .cultured in Bangladesh plant leaves dry powder. International Journal of Applied Sciences and Biotechnology, 3.4, 721-726.

Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D. I., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Liao, W. 2017. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. Journal of translational medicine, 15.1, 1-17.

Sivanandhan, G., Selvaraj, N., Ganapathi, A., & Manickavasagam, M. 2014. Enhanced biosynthesis of withanolides by elicitation and precursor feeding in cell suspension culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal in shake-flask culture and bioreactor. PloS one, 9(8), e104005.

Skoog, F., Miller, C. O. 1957. Biological action of growth substances. In Symposia of the Society for Experimental Biology .Vol. 11, pp. 118-131.

Skrzypczak-Pietraszek, E., Słota, J., Pietraszek, J. 2014. The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on

the accumulation of phenolic acids in *Exacum affine* Balf. f. ex Regel shoot culture. Acta Biochimica Polonica, 61(1).

Smeekens, S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. Annu Rev Plant Biol; 51: 49-81.

Smith, R. H. .2013. Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. Academic Press, pp:188.

Steingroewer, J., Bley, T., Georgiev, V., Ivanov, I., Lenk, F., Marchev, A., Pavlov, A. .2013. Bioprocessing of differentiated plant *in vitro* systems. Engineering in Life Sciences, 13.1, 26-38.

Tadhani MB, Rema S. 2006. *In vitro* antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. Trop J Pharma Res 5 .1: 557-560.

Taiz, L., Zeiger, E. 2006. Secondary metabolites and plant defense. Plant physiology, 4, 315-344.

Taiz, L., Zeiger, E. 2010. Photosynthesis: carbon reactions. Plant Physiology,.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. 2015 . *Plant physiology and development* (No. Ed. 6). Sinauer Associates Incorporated.

Tamura, Y, Nakamura S, Fukui H, Tabata M. 1984. Comparision of Stevia plants grown from seeds, cuttings and stem tip cultures for growth and sweet diterpene glycoside. Plant Cell Rep 3: 180-182.

Tanaka, O. 1982. Steviol-glycosides: new natural sweeteners. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1.11, 246-248

Thakur, K., Sood, A., Kumar, P., Kumar, D.,Warghat, A. R. 2021. Steviol glycoside accumulation and expression profiling of biosynthetic pathway genes in elicited *in vitro* cultures of *Stevia*

rebaudiana. *In vitro* Cellular Developmental Biology-Plant, 57, 214-224.

Thakur, M., Sohal, B. S. 2013. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. International Scholarly Research Notices,

Vanisree, M., Lee, C. Y., Lo, S. F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y., Tsay, H. S. .2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Bot. Bull. Acad. Sin, 45.1, 1-22.

Alvarenga Venutolo, S., Salazar Aguilar, T . 2015. Mass microprogation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in temporary immersion systems. Cultivos tropicales, 36.3, 50-57.

Vince, Ö., & Zoltán, M. 2011. *Plant physiology*. Debreceni Egyetem. pp-84

Vives, K., Andújar, I., Lorenzo, J. C., Concepción, O., Hernández, M., Escalona, M. 2017. Comparison of different *in vitro* micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor .BIT®. Plant Cell, Tissue and Organ Culture .PCTOC, 131, 195-199.

Wang, Y. D., Wu, J. C., Yuan, Y. J. 2007. Salicylic acid-induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. mairei. Cell biology international, 31.10, 1179-1183.

Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H. and Schmulling, T. 2003. CytoKinin deficient transgenic Arabidopsis plants showed multiple developmental alterations indicating

opposite functions of cytoKinins in the regulation of shoot and root meristem activity. Plant Cell, 15:2532-2550.

Wingard Jr, R. E., Brown, J. P., Enderlin, F. E., Dale, J. A., Hale, R. L., Seitz, C. T. 1980. Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. Experientia, 36.5, 519-520.

Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D., & Ahuja, P. S. 2011. A review on the improvement of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Canadian journal of plant science, 91(1), 1-27.

Yancheva, S., Georgieva, L., Badjakov, I., Dincheva, I., Georgieva, M., Georgiev, V., Kondakova, V. 2019. Application of bioreactor technology in plant propagation and secondary metabolite production. Journal of Central European Agriculture, 20.1, 321-340.

Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., & Hafiz, I. A. 2013. Role of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Molecular biology reports*, *40*, 2837-2849.

Yesmin, S. 2019. *In vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 29.2, 277-284.

Yu, Z. Z., Fu, C. X., Han, Y. S., Li, Y. X., Zhao, D. X. 2006. Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. Biotechnology Letters, 28, 1027-1031.

Yücesan, B., Büyükgöçmen, R., Mohammed, A., Sameeullah, M., Altuğ, C., Gürel, S., Gürel, E. .2016. An efficient regeneration system and steviol glycoside analysis of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a source of natural high-intensity sweetener. *In vitro* Cellular Developmental Biology-Plant, 52, 330-337.

Zara, R. R., Rodriguez, S. A. G., Cedo, M. L. O. .2014. Efficient *in vitro* culture protocol for mass propagation of stevia .*Stevia rebaudiana* Bertoni in the Philippines. Philippine Agricultural Scientist, 97.4, 340-346.

Zhao, I.C. Davis, R. Veerporte. 2005. Elicitor Sginal Transduction Leading to Production of Plant Secondary Metabolites. "Biotechnology advances . 23: 283 -333.

7- الملاحق

1-7 : تجارب التعقيم

الملحق 1: متوسط مربعات مصادر الإختلاف لصفات تأثير الهيبوكلورات والمدة الزمنية و تداخلهما في نسبة التعقيم ونسبة الإستجابة

S.O.V	DF	متوسطات المربعات	
		نسبة التعقيم	نسبة الإستجابة
A	1	13500.00000	1500.000000
B	2	500.00000	500.000000
AB	2	500.00000	500.000000
E	54	1129.62963	25000.00000

2-7 : تجارب التضاعف

الملحق 2: متوسط مربعات مصادر الإختلاف لصفات تأثير البنزل ادنين في متوسط ارتفاع الافرع وعدد الأفرع وعدد الأوراق

S.O.V	DF	متوسطات المربعات		
		ارتفاع الافرع	عدد الأفرع	عدد الأوراق
A	4	20.84255000	6.02000000	113.4000000
E	45	0.60000000	1.86700000	36.54200000

الملحق 3: متوسط مربعات مصادر الإختلاف لصفات تأثير الكاينتين في متوسط ارتفاع الافرع وعدد الأفرع وعدد الأوراق

S.O.V	DF	متوسطات المربعات		
		ارتفاع الافرع	عدد الأفرع	عدد الأوراق
A	4	32.6112000	1.33000000	34.0000000
E	45	0.51100000	0.52900000	12.44500000

7- 3: تجارب المُفاعل المُصنع

الملحق 4:متوسط مربعات مصادر الإختلاف لصفات تأثير الكاينتين و البنزل ادنين في متوسط ارتفاع الافرع وعدد الأفرع وعدد الأوراق في مُفاعل الغمر المؤقت المُصنع مختبريا

S.O.V	DF	متوسطات المربعات		
		ارتفاع الافرع	عدد الأفرع	عدد الأوراق
A	4	7.63800000	4.81900000	75.87600000
E	45	1.78500000	1.43800000	33.17800000

7 – 4 :تجارب المُفاعل المستورد

الملحق 5: متوسط مربعات مصادر الإختلاف لصفات تأثيرالسكروز و البنزل ادنين في متوسط ارتفاع الافرع وعدد الأفرع وعدد الأوراق في مُفاعل الغمر المؤقت المستورد

S.O.V	DF	متوسطات المربعات		
		ارتفاع الافرع	عدد الأفرع	عدد الأوراق
A	2	0.9631667	1.01666667	68.3166667
B	1	135.6006667	77.06666667	29.4000000
AB	2	0.1031667	0.31666667	39.6500000
E	54	0.7719630	1.2259259	14.751852

الملحق 6: متوسط مربعات مصادر الإختلاف لصفات تأثيرحامض السالسلك ونوعين من مُفاعلات الغمر المؤقت في متوسط ارتفاع الافرع وعدد الأفرع وعدد الأوراق

S.O.V	DF	متوسطات المربعات		
		ارتفاع الافرع	عدد الأفرع	عدد الأوراق
A	1	10.58400000	0.17222222	77.06666667
B	2	25.53216667	0.01666667	33.86666667
AB	2	13.68150000	0.31666667	45.06666667
E	54	0.4820000	0.11666667	7.7777778

الملحق7 : متوسط مربعات مصادر الإختلاف لصفات تأثير NAA في عدد الجذور وطول الجذور

S.O.V	DF	متوسطات المربعات	
		عدد الجذور	طول الجذور
A	3	4.36666667	2.45300000
E	36	2.30000000	0.43500000

الملحق8 : متوسط مربعات مصادر الإختلاف لصفات تأثير نفثالين حامض الخليك في استحثاث الكالس

S.O.V	DF	متوسطات المربعات
		النسبة المئوية لتكون الكالس
A	3	235.83300000
E	36	2.50000000

الملحق9 : متوسط مربعات مصادر الإختلاف لصفات تأثير 2,4-D في استحثاث الكالس

S.O.V	DF	متوسطات المربعات
		النسبة المئوية لتكون الكالس
A	2	70.00000000
E	27	12.59300000

الملحق 10 : متوسط مربعات مصادر الإختلاف لصفات تأثير الوسط الصلب في تركيز الستيفيوسايد خارج الجسم الحي

S.O.V	DF	متوسطات المربعات
		STEVIOSIDE
A	3	656.452475
E	8	26.197625

الملحق 11 : متوسط مربعات مصادر الإختلاف لصفات تأثير السكروز و البنزل ادنين في زيادة إنتاج الستيفيوسايد خارج الجسم الحي

متوسطات المربعات STEVIOSIDE	DF	S.O.V
2246.615465	1	A
2757.632063	2	B
56.867210	2	AB
23.658898	12	E

الملحق 12: متوسط مربعات مصادر الإختلاف حامض السالسلك ونوع المُفاعل في زيادة إنتاج الستيفيوسايد خارج الجسم الحي

متوسطات المربعات STEVIOSIDE	DF	S.O.V
79672.3362	1	A
199676.2763	2	B
11144.5386	3	AB
92.1886	12	E

Abstrsct

Experiments were conducted in the Plant Tissue Culture Laboratory at the College of Agriculture, Diyala University, during the period from 2022 to 2023. Several experiments were carried out on stevia plant, including sterilization of plant parts, Micropropagation, induction of callus from plant leaves, and experiments to increase the plant's content of stevioside in Temporary Immersion Bioreactors and the role of some elicitors in increasing production using different methods. In the sterilization experiments, sodium hypochlorite concentrations of 5% and 10% were used for three different time durations: 10, 15, and 20 minutes. The sterilization results showed significant differences between the treatments, with the 10% concentration for all three durations giving the highest sterilization percentage of 100%, surpassing the 5% concentration. The time durations did not differ significantly within the same concentration. For micropropagation of single nodal segments, BA was used at concentrations of 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg L^{-1}. The results showed that the comparison treatment (0.0) significantly outperformed all other treatments in terms of shoot height, reaching 5.4 cm. Regarding the number of shoots, the concentration of 1.0 mg L^{-1} BA showed a significant increase compared to the control treatment, with a 3.5 shoot per plant . The other treatments did not differ significantly.Callus induction experiments involved the use of 2,4-D at concentrations of 1.0 and 2.0 mg L^{-1}, as well as the use of NAA at concentrations of 1.0, 2.0, and 3.0 mg L^{-1}. The results indicated that the concentrations of 2.0 and 3.0 mg L^{-1} NAA had the highest percentage of callus formation, reaching 100%, while 2,4-D at a concentration of 1.0 mg L^{-1} resulted in a 50% callus formation. In the bioreactors experiments, several trials were conducted, including the addition of sucrose concentrations of 30, 60, and 90 g L^{-1} in combination

with BA. Additionally, experiments were performed using salicylic acid at concentrations of 10, 20, and 30 mg L^{-1} in Temporary Immersion Bioreactors, both plantform and lab-made bioreactor . The results of stevioside analysis showed that the solid medium treatment outperformed BA with a value of 84.21 µg g^{-1} compared to the control treatments, but it did not exceed the field-grown plants. The HPLC analysis of sucrose treatments indicated that the combination of 90 g sucrose concentration with BA resulted in the highest content of stevioside, reaching 171.02 µg g^{-1}. The results showed that the addition of salicylic acid had a superior effect at a concentration of 30 mg L^{-1} in increasing stevioside *in vitro*, reaching 599.78 µg g^{-1} in the lab-made temporary immersion bioreactor and 387.10 µg g^{-1} in the imported temporary immersion bioreactor.

Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Diyala
Horticulture And Land Scap Gardening

micropropagation of Stevia and enhancing Stevioside content using solid medium and temporary immersion bioreactors, and some elicitors

A thesis Submitted to
The Council of the College of Agriculture at the University of Diyala
In partial Fulfillment of the Requirements for the Masters Degree in Agricultural Sciences
Horticulture and Landscape Gardening
BY

Mustafa Raeef Ameer Al-Nuaimi

Supervisor

Prof. Dr. Ayad Assi Obaid

2023 A.D **1445 A.H**