دعم الليزر الاخضر Nd-YAG والليزر الاحمر He-Ne تكوين وتمايز كالس النبات البري الكلغان *Silybum marianum* L.

علياء رعد مشعل د.شفاء مهدي صالح

علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2018/02/13 تاريخ القبول 2018/04/03

Abstract

The present study includes identification the effect of green laser (Nd-YAG) of wavelength 532nm, power 87mw and red laser (He-Ne) of 650nm wavelength,power5mw.at exposing period 10,15,20,25,30 minutes on callus initiation , protein content and regeneration of *Silybum marianum* L.plants the effect of laser was clear by decreasing the time needed for callus induction, and to increasing the fresh weights of callus. The results showed that there are an increase in the protein contents reached to 0.570,0.707 µg/gm of leave's and cotyledonary leave's callus respectively at 25 min. exposing time to Nd-YAG laser.The results proved the suitability of 30 min. exposing period for hypocotyls and roots since the protein content was 0.750 and 0.410 µg/gm. Moreover, red laser (He-Ne) has possessed a positive effect since the highest protein content of leave's, hypocotyls and root callus was 0.481 ,0.548 and 0.484 µg/gm. respectively at 30min. exposing time.while that of cotyledonary leaves was 0.537 µg/ gm at 25min. exposing period.

الخلاصة

تناولت هذه الدراسة دور الليزر الأخضر Nd-YAG ذي الطول الموجي 532nm وبقوة 87mw والليزر الأحمر He-Ne بطول موجي 650nm وبقوة 5mw ولأوقات تعريض مختلفة 10 و15 و20 و25 و30 دقيقة في استحداث الكالس ومحتواه البروتيني وإنتاج الأفرع الخضرية من نبات الكلغان *Silybum marianum* L.. وكان تأثير الليزر واضحاً في

استحداث كالس الكلغان متمثلاً باختزال مدة استحداثه من الاجزاء المختلفة وزيادة معدلات اوزانه الطرية. وأظهرت البيانات زيادة بالمحتوى البروتيني لكالس الأوراق والأوراق الفلقية المعرضة لليزر الأخضر Nd-YAG مسجلاً اعلى مستوياته 0.570 ،0.707 مايكروغرام/غم في مدة التعريض 25 دقيقة على الترتيب ، وأكدت النتائج ملائمة مدة التعريض30 دقيقة للكالس الناتج من قطع السيقان تحت الفلقية والجذور أذ بلغ محتواه البروتيني 0.750 و0.410 مايكروغرام/غم.أما في حالة الليزر الأحمر (He-Ne) سجلت كمية للبروتين اعلى مستوى لها في كالس الأوراق والسيقان تحت الفلقية والجذور 0.481 ، 0.548 ،0,484 مايكروغرام/غم على الترتيب عند مدة التعريض 30 دقيقة. وسجل كالس الأوراق الفلقية أعلى كمية للبروتين 0.537 مايكروغرام/غم عند مدة التعريض 25 دقيقة .

المقدمة

الليزر ضوء احادي الطول الموجي وله صفات متماثلة من حيث الطور والاتجاه والطاقة ذو سطوع عال واتجاهية محددة ويوصف بانه احادي اللون غالباً ومكون من موجات ضوئية ذات طول موجي واحد تقريبا ويسير مسافات كبيرة بحزمة قليلة الانفراج دون ان ينتشر او يتلاشى [1]. وكلمة ليزر (Light Amplification by Stimulated Emission of: Laser Radiation) تعني تضخيم الضوء بواسطة الانبعاث المحفز للأشعاع [2]. وهو من العوامل الفيزيائية الآمنة يمكن تطبيقها لتحسين نوعية وإنتاجية المحاصيل النباتية [3]. نبات الكلغان *Silybum marianum* من النباتات الطبية [5,4]. قد حقق استخدام ضوء الليزر نجاحا في تحسين التقانات الزراعية المختلفة وأكثر تطبيقات الليزر الزراعية في معاملة البذور للحصول على مواصفات إنتاجية ونوعية أفضل وكذلك في متابعة نمو النباتات وتقويتها وزيادة إنتاجها ومقاومتها للامراض [6]. واكدت أحدى الدراسات تأثير الليزر الايجابي لانبات بذور الحنطة *Triticum aestivum* L عند تعريضها لليزر الأحمر He-Ne بطول موجي 632.8mw وبقوة 5.23mw وبمدد تعريض 1, 3, 10, 30, 60, 180, 600, 1200, 1800 ثانية وسجلت نسبة100% انبات للبذور المعرضة لليزر الأحمر عند مدة تعريض1200 ,3 ثانية كما تشير الدراسة إلى زيادة مستوى بيروكسيد الهايدروجين وبيروكسيد الدهون للبذور المعرضة ولكافة المدد [7]. حيث عرضت بذور الحنطة *Triticum durum* لضوء الليزر الأحمر He-Ne ذي طول موجي 632nm والليزر الأخضر Nd-YAG 532nm لمدة 5 دقائق وظهرت تأثيرا محفزا للأنبات والنمو المبكر ومقاومة الفطريات، اظهرت النتائج ازدياد انبات البذور المعرضة لليزر الأحمر والأخضر بنسبة 95 %، 93 % على التوالي، وأظهرت هذه البذور خلوها من الاصابة

الفطرية [8]. واظهر استعمال ثلاثة انواع من الليزر آركون ليزر الأخضر بطول موجي 514nm وبقوة 250mw، الليزر الأحمر He-Ne طول موجي 632.8nm وبقوة 12mw والليزر الازرق هليوم كادميوم بطول موجي 441.6nm وبقوة 250mw في زراعة انسجة لنبات *Sequoia sempervirens* لمدة تعريض 5 دقائق وتأثيراتها على الأفرع الخضرية والجذور واكدت النتائج أن الليزر الأخضر(آركون) دوراً في زيادة اطوال الجذور وسرعة في نموها بواقع5.17 سم مقارنة بعينة السيطرة 1.17سم، بينما الازرق (هليوم كادميوم) سبب زيادة في اعداد الجذور ونموها الجيد بلغ 66.67 جذر مقارنة بعينة المقارنة 6.67 جذر وكان لليزر الاحمر He-Ne افضل النتائج في زيادة عدد الأفرع الخضرية وأطولها مسجلة 5.86سم مقارنة بعينة السيطرة 1.66سم، واعداد الأوراق بلغت 27.77 مقارنة بعينة السيطرة 15.33، وحقق تركيز الكلورفيل 10.53mm مقارنة بالسيطرة 3.58mm [9] .

مواد وطرق العمل

أجريت الدراسة الحالية في مختبر التطبيقات الوراثية وزراعة الانسجة النباتية قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة– جامعة الموصل.

جمع البذور وزراعتها

جمعت البذور من نباتات الكلغان .*Silybum marianum* L النامية بشكل بري في حدائق جامعة الموصل حيث أخذت الأزهار (الشكل1,A)، وازالة كافة الشعيرات البيضاء الموجودة في البذور لتصبح جاهزة للعمل (الشكل1,B).

الشكل (1) A: ازهار نبات الكلغان / B: بذور الكلغان المستخدمة في البحث

وعقمت بذور الكلغان .*Silybu marianum*L بمحلول هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl (القاصر التجاري) نسبة التخفيف 3 حجم ماء مقطر معقم/ 1 NaOCl لمدة 20 دقيقة ثم غسلت البذور بعدها بالماء المعقم ثلاث مرات(3دقائق /مرة) وزرعتها في قنانٍ سعة 100مل

حاويه 25 مل من وسط MS الصلب [10] ثم نقلت العينات إلى ظروف غرفة النمو (درجة حرارة 25±2 ^{o}م وظروف ظلام للأيام الثلاثة الأولى من الزراعة وبعد إنباتها نقلت إلى ظروف الضوء والظلام التعاقبي 16 ساعة ضوء/ 8 ساعات ظلام وشدة إضاءة 1200 لوكس).

استحداث الكالس

استخدمت البادرات السليمة المعقمة بعمر 30 يوم مصدراً للأجزاء النباتية إذ قطعت سيقانها تحت الفلقية وجذورها إلى قطع بطول 1 سم أما اوراقها واوراقها الفلقية فقطعت إلى قطع بمساحة 0.5-1سم^{2} ،زرعت زراعة قطع السيقان تحت الفلقية والجذور على سطح وسط MS الصلب المزود بـ2.0ملغم/لتر NAA و1.0ملغم/لتر BA [11] و قطع الأوراق والأوراق الفلقية على سطح وسط MS الصلب المجهز بـ2.0 ملغم/لتر NAA و0.5 ملغم/لتر BA قدر الوزن الطري لأنواع الكالس المتكون بالاعتماد على الفرق في وزن الكالس عند بدء زراعته بوزن 1غم وبعد مرور 30 يوم من الزراعة.

تعريض قطع البادرات لليزر وقياس المحتوى البروتيني

أخذت البادرات المعقمة بعمر 30 يوم وقطعت أجزاؤها (الأوراق، الأوراق الفلقية، السيقان تحت الفلقية والجذور) وكما ورد سابقاً وزرعت على أوساط الاستحداث المنتخبة ثم عرضت مباشرةً لضوء الليزر الأخضر (Nd-YAG) ولضوء الليزر الأحمر (He-Ne) وبالمدد الزمنية 10،15 ،20، 25 و30 دقيقة وايضاً تعريض عينات بوزن 1غم لكل من كالس الأوراق والأوراق الفلقية والسيقان تحت الفلقية والجذور بعمر 30 يوماً وحفظت في الظروف المبينة سابقاً، قدر المحتوى البروتيني في عينات كالس بادرات الكلغان للاجزاء النباتية المعاملة بالليزر وغير المعاملة(المقارنة) وحسب الطريقة القياسية [12].

النتائج

تشير النتائج إلى أن تعريض الأجزاء المختلفة من بادرات الكلغان لليزر الأخضر Nd- YAG والليزر الأحمر He-Ne أظهر تأثيراً واضحاً في اختزال مدة استحداث الكالس اذ بلغت 3 أيام للاوراق والاوراق الفلقية عند التعريض لليزر الاحمر مدة 10 و15 دقيقة (الجدول 1). كما انعكس تاثيره الايجابي لكلا نوعي الليزر في معدلات الاوزان الطرية للكالس المشتق من القطع المعرضة حيث سجل اعلى وزن طري لكالس قطع السيقان تحت الفلقية بلغ 13.3غم عند مدة التعريض 20 دقيقة لليزر الاخضر (الشكل 2) واعلى وزن طري في كالس الجذور اذ بلغ 10.3 غم عند تعريضه مدة 30 دقيقة لليزر الاحمر (الشكل 3).

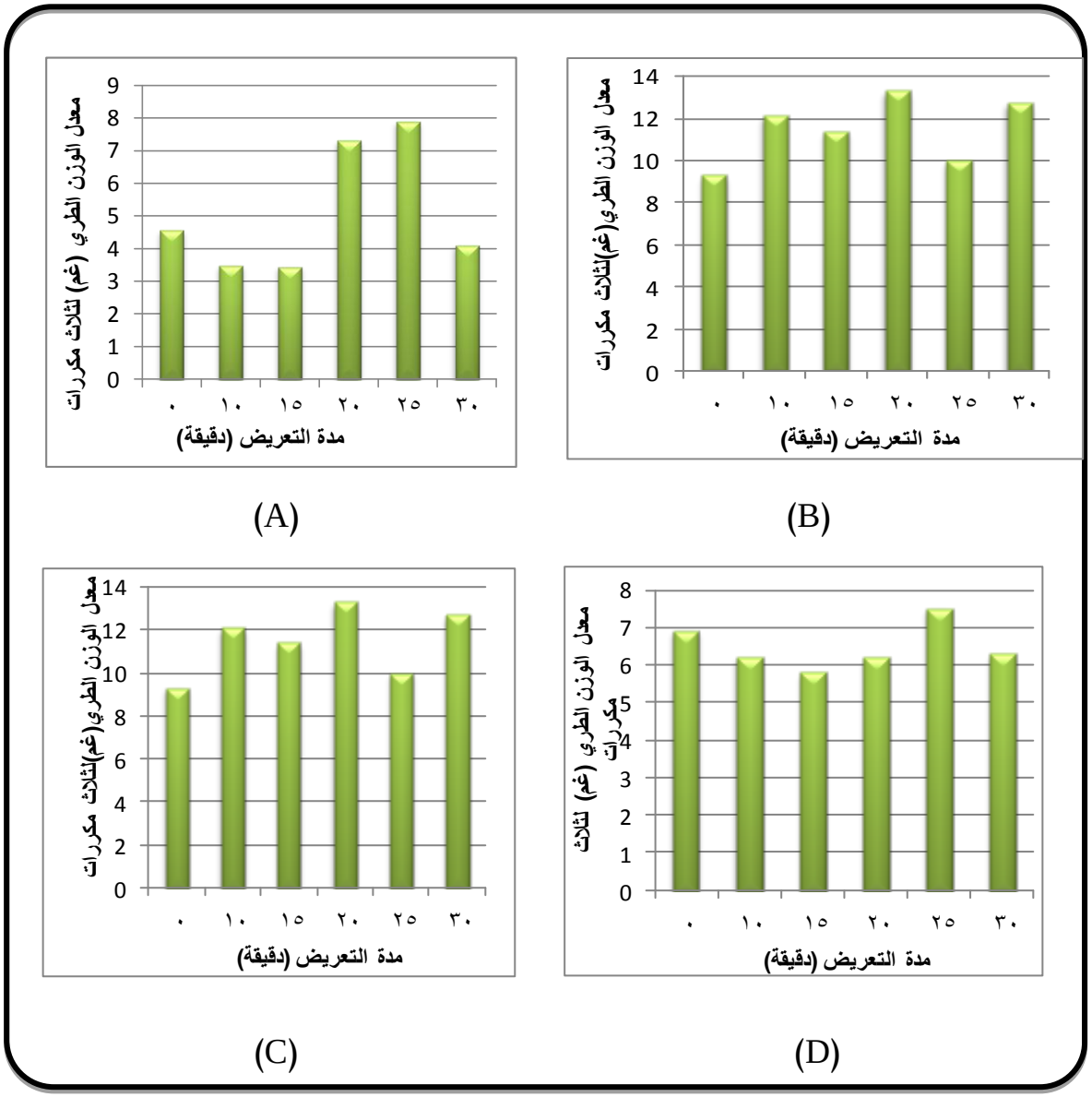
الجدول (1) :أستحداث الكالس من أجزاء بادرات الكلغان *Silybum marianum* L. المعرضة لليزر الأخضر Nd-YAG والليزر الأحمر He-Ne في اوساط الاستحداث MS الصلبة المنتخبة

مدة التعريض (دقيقة)	الاستحداث %				بدء الاستحداث (يوم) الليزرالأخضر/الليزرالأحمر Nd-YAG/ He-Ne			
	الأوراق **	الأوراق الفلقية **	السيقان تحت الفلقية ***	الجذور **	الأوراق	الأورق الفلقية	السيقان تحت الفلقية	الجذور
10	100	100	100	100	5/7	3/5	9/8	12/12
15	100	100	100	100	3/ 8	4/5	8/8	12/11
20	100	100	100	100	5/8	4/3	8/7	11/11
25	100	100	100	100	4/6	4/5	7/7	11/12
30	100	100	100	100	4/8	4/5	6/8	9/12
المقارنة	100	100	100	100	8	5	9	14

* عدد القطع النباتية المزروعة 20 /معاملة

** زرعت القطع على وسط MS الصلب الحاوي على 2.0 ملغم/لتر NAA و0.5 ملغم/لتر BA

***زرعت القطع على وسط MS الصلب الحاوي على 2.0 ملغم/لتر NAA و1.0ملغم/ لتر



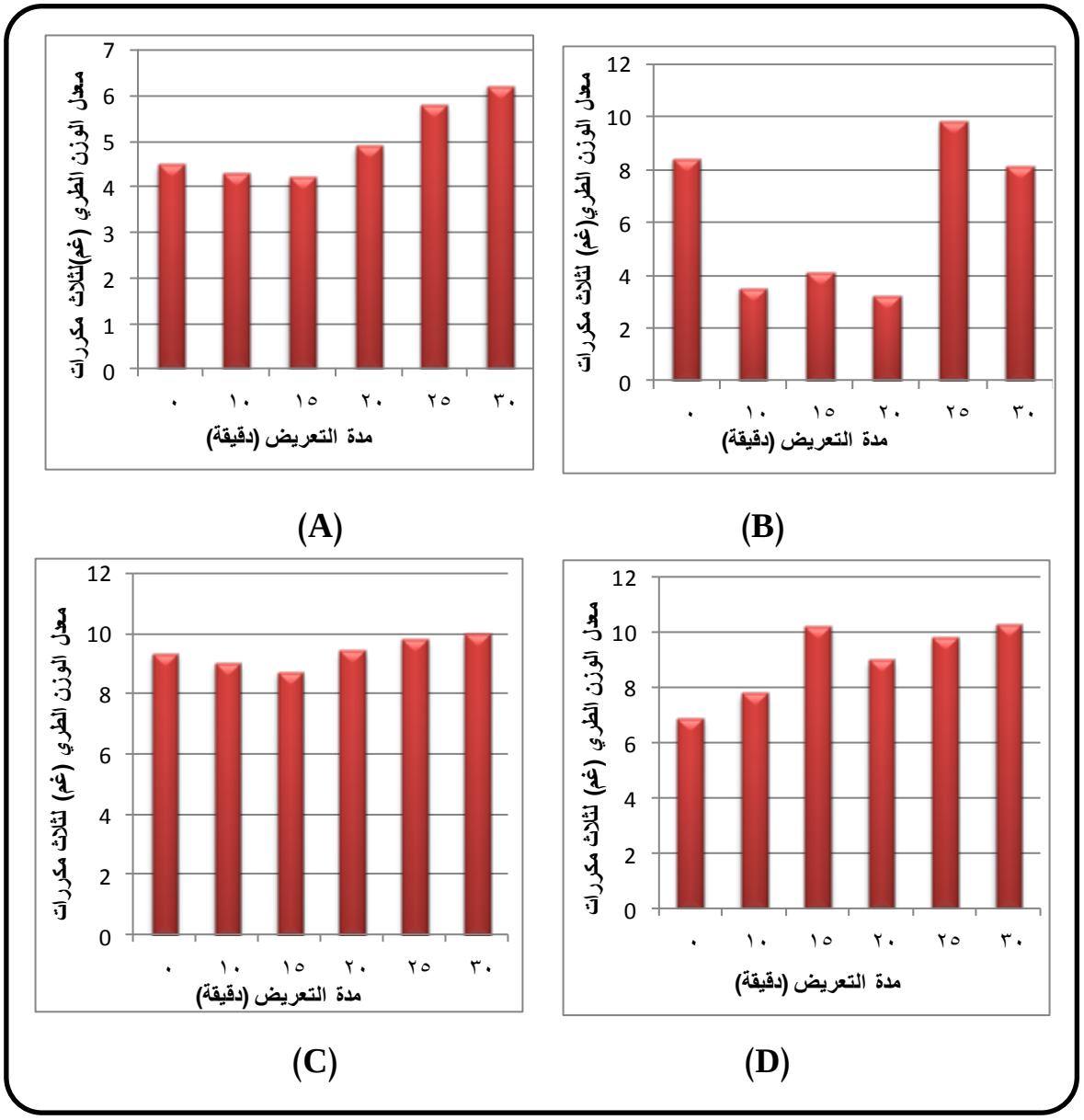
الشكل (2): معدلات الاوزان الطرية للكالس الناتج من أجزاء بادرات الكلغان *S. marianum* L. بعد 30 يوماً من تعريضها لليزر الأخضر Nd-YAG.

(A): الكالس الناتج من الأوراق المعرضة للمدد الزمنية المنتخبة.

(B): الكالس الناتج من الأوراق الفلقية المعرضة للمدد الزمنية المنتخبة.

(C): الكالس الناتج من السيقان تحت الفلقية المعرضة للمدد الزمنية المنتخبة.

(D): الكالس الناتج من الجذور المعرضة للمدد الزمنية المنتخبة.



الشكل (3): الأوزان الطرية لكالس بادرات الكلغان .*S. marianum*L بعد 30 يوماً من تعريضه لليزر الأحمر He-Ne.

(A): كالس الأوراق المعرضة لليزر الأحمر وللمدد المنتخبة.

(B): كالس الأوراق الفلقية المعرضة لليزر الأحمر وللمدد الزمنية المنتخبة.

(C): كالس السيقان تحت الفلقية المعرضة لليزر الأحمر وللمدد الزمنية المنتخبة.

(D): كالس الجذور المعرضة لليزر الأحمر وللمدد الزمنية المنتخبة.

كذلك أمتد هذا التأثير إلى زيادة كفاءة الكالس في التمايز وتكوين الأفرع الخضرية إذ اظهرت الأوراق قدرتها لتكوين الأفرع الخضرية والتي بلغت 70% (الشكل4،A) عند تعرضها مدة 25دقيقة، في حين دعمت مدة التعريض 20 دقيقة كفاءة كالس الأوراق الفلقية الى 70% قياساً بـ 60% لعينة المقارنة (الجدول 2) عند زراعته على الوسط المنتخب (MS + 2.0ملغم/لتر NAA +0.5 ملغم/لتر BA) (الشكل4،B) كما أظهر كالس السيقان تحت الفلقية الذي ارتفعت قابليته على إنتاج الأفرع الخضرية في الوسط المنتخب (MS + 2.0ملغم/لتر NAA +1.0 ملغم/لتر BA) إلى 90% (الجدول2) عند تعريضه مدة 25 دقيقة لليزر الأخضر (الشكل4،C) . وعموماً اظهرت البيانات أن تعريض بادرات الكلغان لليزر الأحمر كان عاملاً ايجابياً في أستحداث ونمو الكالس وتمايزه لتكوين أفرع خضرية. فقد أدى تعريض كالس الأوراق مدة 25,15 دقيقة إلى دعم قابليته في إنتاج الأفرع الخضرية إلى 80 % عند التعريض 25 دقيقة (الجدول 2) واستلزم تمايز كالس الأوراق وتكوين الأفرع الخضرية 22 يوماً من بعد تعريضه مدة 25 دقيقة لليزر الأحمر He-Ne (الشكل5،A). كما تمايز كالس الأوراق الفلقية بعد 25 يوم المعرض مدة 30 دقيقة لليزر الأحمر (الشكل5،B) وباشر بزوغ تكوين الجذور بعد38 يوماً(الشكل5،C) في نفس الوسط.

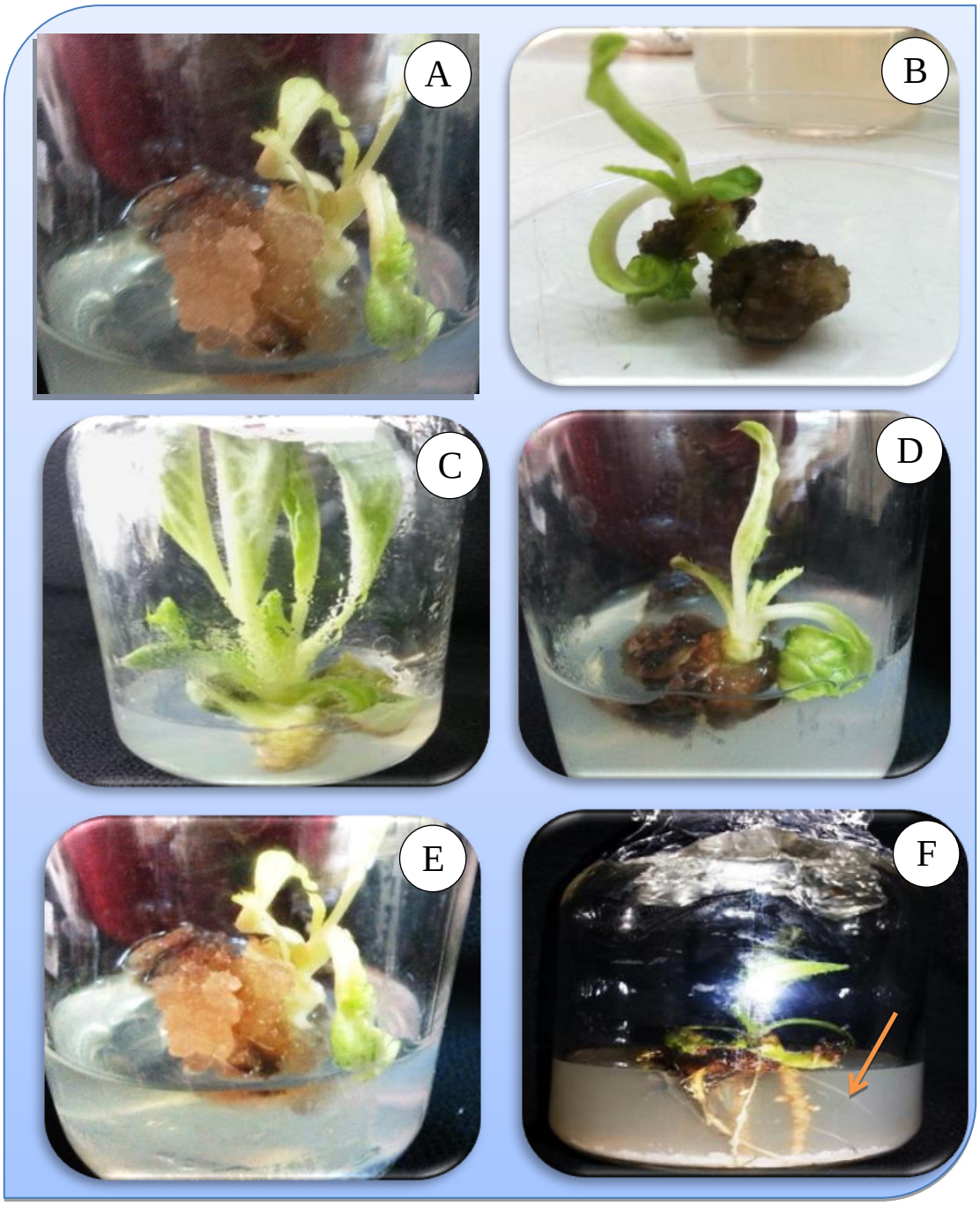
الجدول (2): قابلية كالس بادرات الكلغان *Silybum marianum* L. المعرض لليزر الأخضر Nd-YAG/لليزر الأحمر He-Ne في تكوين الأفرع الخضرية في أوساط MS الصلبة المنتخبة

مدة التعريض (دقيقة)	عدد الافرع الخضرية الناتجة من كالس			تكوين الأفرع الخضرية (%)		
	*الأوراق	*الأوراق الفلقية	**السيقان تحت الفلقية	الأوراق (Nd-YAG / He-Ne)	الأوراق الفلقية	السيقان تحت الفلقية Nd-YAG
10	0/4	4/6	5	0/40	40/50	60
15	7/6	0/0	8	70/70	0/0	80
20	0/0	0/7	7	0/0	0/70	70
25	8/0	5/0	9	80/0	50/0	90
30	0/0	7/0	0	0/0	70/0	0
المقارنة	7	6	8	70	60	80

عدد القطع المزروعة 10 /معاملة

*الوسط المنتخب MS الصلب الحاوي على 2.0ملغم/لتر NAA و0.5 ملغم/لتر BA.

** الوسط المنتخب MS الصلب المجهز بـ 2.0ملغم/لتر NAA و1.0 ملغم/لتر BA



الشكل(4): تمايز الكالس لأجزاء بادرات الكلغان.*S. marianum*L المعرضة لليزر الأخضر والليزر الأحمر وإنتاج الأفرع الخضرية .(A): استجابة كالس الأوراق بعد 18 يوماً من تعريضه لليزر الأخضر لمدة 15 دقيقة.

(B): استجابة كالس الأوراق الفلقية بعد 9 أيام من تعريضة لليزر الأخضر لمدة 20 دقيقة.

(C): استجابة كالس السيقان تحت الفلقية(المعرض مدة 25 دقيقة) بعد 15 يوم من تعريضه لليزر الأخضر.

(D): استجابة كالس الأوراق بعد 22 يوماً من التعرض لليزر الأحمر مدة 25 دقيقة .

(E): استجابة كالس الأوراق الفلقية بعد 25 يوماً من التعرض لليزر الأحمر مدة 30 دقيقة .

(F): تكوين الجذور بعد38 يوماً

أثبتت نتائج تقدير المحتوى البروتيني لانواع الكالس الناتج من الأجزاء المختلفة لبادرات الكلغان المعرضة لليزر الأخضر Nd-YAG والليزر الاحمر He-Ne حصول تغيرات في محتواه البروتيني مقارنة بعينات المقارنة (غير المعرضة لليزر) (الجدول 3).

الجدول (3) :تقديرات المحتوى البروتيني لانواع الكالس المستحدث من اجزاء بادرات الكلغان *Silybum marianum* L. المعرضة لليزر الأخضر Nd-YAG/الليزرالأحمر He-Ne

مدة التعريض (دقيقة)	(المحتوى البروتيني µg/gm ± SD) الليزرالأخضر/الليزرالأحمر He-Ne /Nd-YAG			
	الأوراق	الأوراق الفلقية	السيقان تحت الفلقية	الجذور
10	0.433 /0.328	0.482/0.443	0.521/0.703	0.443 /0.406
15	0.433/0.315	0.491/0.433	0.525/0.618	0.482/0.316
20	0.460/0.406	0.480/0.550	0.530 /0.607	0.453/ 0.341
25	0.463/0.570	0.537/0.707	0.542/0.566	0.459/0.397
30	0.481/ 0.406	0.486/0.445	0.548/0.750	0.484/0.410
المقارنة	0.540	0.537	0.438	0.406

عدد المكررات المستخدمة 3 / معاملة

المناقشة

أسهمت التقنيات الحياتية وغيرها من التقنيات المختلفة في زيادة فهم الباحثين للعديد من المعلومات الأساسية المتعلقة بانقسام الخلايا وتخصصها فضلا عن تأثير العوامل الخارجية كالمواد الكيميائية والإشعاع وعوامل البيئة المختلفة على الخلايا ومحتواها الداخلي من المركبات [14,13]. اقترحت الدراسة الحالية للاستفادة من اساليب زراعة الانسجة واقترانها بتطبيقات الليزر الأخضر Nd-YAG والليزر الأحمر He-Ne ولتحديد أفضل الاوساط الملائمة لاستحداث الكالس وانتاج الافرع الخضرية النباتات الطبي الكلغان *Silybum marianum*L. لأحتوائه على المركبات الفلافونويدية المضادة لنمو الخلايا السرطانية. ان تميز نبات الكلغان بسهولة استحداث كالسه من الأوراق، الأوراق الفلقية، السيقان

تحت الفلقية والجذور بكفاءة عالية في وسط MS المدعم بتراكيز متباينة ومتداخلة من NAA و BA . فقد ذكرت بعض الدراسات استخدام وسط MS المدعم بتراكيز مختلفة من الاوكسينات والسايتوكايتينات في استحداث كالس نبات الكلغان [17, 16,15]، وأكدت إحدها أن وسط MS المدعم بتراكيز عديدة من BA,NAA كان الأفضل من غيره من الاوكسينات والسايتوكاينينات في عملية استحداث الكالس لانواع العائلة المركبة [18]. ويبدو جلياًمن نتائج الدراسة الحالية تفوق المعاملات التي تضمنت استعمال الليزر الأخضرNd-YAG وبمدات التعريض 10 ،15 ،20 ،25 ،30 دقيقة عن معاملة المقارنة التي لم يحصل تعريضها للاشعة وربما يعود السبب في ذلك إلى التأثير التحفيزي لأشعة الليزر المستعملة مع النسيج النباتي كون هذه الاشعة تمثل ضوءاً مضخماً [2] اذ وجد بعض الباحثين[19 ،20] ان اشعة الليزر تنشط انقسام الخلايا النباتية والتي تؤدي بدورها الى تسريع نمو وتطور النسيج. إن التأثير الايجابي لاستعمال ضوء الليزر الأخضر Nd-YAG في اختزال زمن بدء استحداث الكالس لجميع العينات النباتية وزيادة معدلات الأوزان الطرية للكالس المشتق منها في مدد التعريض يفسر اولاً إلى زيادة نفاذية الخلايا وبالتالي دخول المواد الداخلة في مكونات الوسط الغذائي ومانتطلبه الخلايا في عمليات الانقسام والنمو. او ثانياً إلى وفرة الفايتوكرومات النباتية والتي تشكل مستقبلات ضوئيةsensory photoreceptors تنظم نمو وتطور النبات كاستجابة للتحفيز الضوئي [21 ,22] وحصول تحفيزات انزيمية تنتهي بزيادة نمو النبات اذ من المعروف أن الكثير من الانزيمات التي تسيطر على نمو النبات وتطوره . وقد أشارت احدى الدراسات إلى ان تعريض النباتات الى ضوء الليزر يحفز عمليات فسلجية ومظهرية كبيرة مؤدية إلى زيادة خطية في النمو والكتلة الجافة المتحققه اضافة إلى حجم الأوراق وبالتالي ناتج النبات الكلي [23 ,24]. ولوحظ ان المحتوى البروتيني في الكالس المستحث من الأوراق والأوراق الفلقية المعرضة لليزر الأخضرNd-YAG حقق اعلى مستوياته وأثبتت النتائج بشكل واضح ان جميع مدد التعريض لليزر الأخضر كانت ملائمة للكالس المتكون من السيقان تحت الفلقية المعرضة بدلالة الزيادات الحاصلة في المحتوى البروتيني لهذا الكالس. أوضحت نتائج تعريض قطع نبات الكلغان *Silybum marianum*L. لضوء الليزر الأحمرHe-Ne إلى دوره في أختزال زمن استحداث للكالس من كافة القطع النباتية، وقد أشارت دراسة اخرى[25] إلى التاثيرات المحفزه لليزر الأحمر في أستحداث الكالس وزيادة الوزن الطري لنخيل التمر *Phoenix dactylifera* . وذكرت العديد من البحوث التأثيرات الايجابية لليزر الأحمر في نمو البادرات واستحداث الكالس وتمايزه وزيادة محتواه البروتيني ولكافة النباتات المعرضة [26 ,27]. وربما يعود السبب إلى زيادة معدل الطاقة في النباتات المعرضة وبالتالي زيادة نفاذية الاغشبة البايولوجية ومايترتب عنها من زيادة لنشاط

الخلية وسرعة انقسامها وبالتالي زيادة معدلات نموها [29,28]. واظهرت نتائج التعريض لليزر الأحمر He-Ne تأثيراً مشجعاً في اعادة تكوين الأفرع الخضرية وتجذيرها من كالس الأوراق عند مدتي التعريض 15,25 دقيقة مسجلاً 80 و70% وللأوراق الفلقية 70% عند مدة التعريض 30 دقيقة وقد يفسر تحفيز النمو إلى صبغة الفايتوكروم التي أثبت وجودها في جميع النباتات الا أنها تتواجد بتراكيز عالية في الأنسجة النباتية الفتية وغير المتخصصة بما في ذلك المرستيمات وحتى خلايا الجذور وان هذه الصبغات تمثل معقد بروتيني يمتص الضوء ويوجد في حالتين (P660, P730) ويمكن لكل حالة ان تتحول عكسياً إلى الاخرى بامتصاص الضوء [30]. وربما تؤثر أشعة الليزر في الفايتوكروم وتحويلها من طور السبات إلى طور السيطرة على مختلف الفعاليات الفسلجية بما في ذلك إنتاج بعض المواد والانزيمات التي تساعد في تسريع النمو والاستفادة القصوى من مكونات الوسط الغذائي وبذلك تحقق نمواً افضل وفي وقت اقصر [31].

المصادر

1- مشاري، جاسب عبد الحسين. الليزرات وتطبيقاتها . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل، العراق، كتاب مترجم (1987).

2- عوف، فهمي عبد الحميد وسلام، عبد الستار محمد وعبد المحسن، محمد المرسي وسيف النصر، سمير .الهيئة العامة للتعليم التطبيقي والتدريب ، الكويت، 430ص(1991).

3 - Podleoeny, J..Monografie I Rozprawy Naukowe, IUNG, Pu³awy. 3: 1-59. (2002).

4 - Fraschini,F.;Dermartini, G. and Esposti, D. Clin.Drug Invest, 22: 51-65. (2002).

5- Duke, J. A. Sky herbals. J. 08:27- 31(2004).

6- الإمارة، فارس جاسم محمد. دار الشؤون الثقافية العامة، وزارة الثقافة والاعلام، بغداد، العراق، 184ص(1990).

7- Abdelghafar. Abu-Elasoud and Sultan.Science International. 10: 39-49. (2013)

8- Yasemin , Z; Rassam and Firdaws, A. IOSR. Vol 2, (47-51). (2013).

9- Lobna, S. T.; Hanan, A. A.; Sami, A. M. and Hwida, M. F.. Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical. *ISSN: 0975-8585*. (2014).

10 - Murashige, T. and Skoog, F. A. Physio. Plant .15: 473-497(1962).

11- Bekheet, S. A.;Taha, H. S. andGabr, A. M. (2013).J.AppI.Sci.Res. 9(1): 860-866.

12 - Lowery, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. J. Biol. chem., 193:265-275. (1951).

13 - Khan, I. A.; Dahot, M. U. and Khatri, A. Pak. J. Bot., 39(5):1489-1501. (2007).

14 - Kaushal, B.;Kulaganathan,A.and Vinay,SJACS 8-1.15-26. .(2015).

15- Bekheet, S. A.;Taha, H. S. and Ahmed, M. Original articles, 9(1): 860-866. (2013).

16-Mohamed,R.;Mohamed,A;Hassan,A;Moemen,S;Mohamed,M; Shafie,A; Fayza, M; Shams, I. and Naglaa, H. J. Gene. Enginee. Biotech. (2013).

17-Fayha. Rida and Tamara. JAS, 10: 120-129(2014).

18- الحمداني، إسلام ياسر عبدالله. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة الموصل.(2007).

19-Tazawa, Z., JARQ 33:(3). (1999).

20-Dinoev, S. 56:83-91 .(2006)

21 - Mathews, S.;Burleigh, J. and Donoghue, MMol.Biol.Evol.,20,1087-1097 .(2003).

22-Li,X.Y.and Li,Y. C:life Sci.,52,371-380.(2009).

23- Cwintal, M. and Olszewski, J. Acta Agrophysica, 147, 345-352 (2007).

24-Cwintal, M., Dziwulska, H. and Wilczek, M. . Int. Agrophysics, 24: 15-19(2010).

25- الكعبي، أنسام مهدي صالح مجلة البصرة لأبحاث نخلة التمر. المجلد:9 العدد:1. (2010).

26- Muszynski and Gladyszewska.. Int. Agroph. 22:151-157. (2008)

27-Zeinab, A.M; Abo Rekab, M; Khater, S. and Mohamed, A. MSci. Res. JASR, 8 (8): 4685-4690. .(2012).

28 - Silvana, D.G.; Petru, N.; Esofina, R.; Mona, P.; Marian,R; Floarea, B. M.; and Mihaela, G.; (Romanian Biotech.Lett. 16,(6):34-39.(2011).

29- Rassam Y.Z.Journal of Applied Sciences Reseach,6(8)1298-02.(2010).

30 -Tomas, B. and Vince-Prue, D. Photoperiodism in Plants 2nd. ed. San Diego Academic press(1997).

31- Liu,F.; Chen,H.and Han,R.American J.Plant Sci.6:1206-1214.(2015).