تأثير البرولين في إنتاج بعض المركبات الثانوية من كالس نبات الحنطة التترية *Fagopyrum tataricum* L.

شامل إسماعيل نعمة[1] إسماعيل أحمد سرحان[2] عباس عبدالله طه[3]

[1] جامعة الأنبار ـ مركز دراسات الصحراء
[2] جامعة الأنبار- كلية الزراعة
[3] جامعة كركوك ـ كلية الزراعة

الخلاصة

أجريت هذهِ الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لمركز دراسات الصحراء- جامعة الأنبار، للمدة من تشرين الثاني 2017 ولغاية آيار 2018. بهدف تحديد إمكانية تحفيز المسارات الحيوية لإنتاج بعض المركبات المهمة طبياً من جزئيين نباتيين خارج الجسم الحي لنبات *Fagopyrum tataricum* L. بإستعمال تراكيز مختلفة من حامض البرولين (0، 10، 20، 30) ملغم.لتر$^{-1}$. أظهرت النتائج وجود تأثير معنوي للأجزاء النباتية في إنتاج المركبات من كالس نبات *Fagopyrum tataricum* L. وحقق الكالس المُستحث من الوريقة الفلقية أعلى معدل معنوي لإنتاج مركبات catechin و resveratrol و diboside بلغت 29.7 و 25.73 و 29.97 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف بالتتابع، بينما أنتجت السويقة الجنينية السفلى أعلى كمية من مركب tatariside بلغت 33.6 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف. سببت المُعاملة بحامض البرولين زيادة معنوية في إنتاج بعض المركبات من نسيج الكالس لهذا النبات وحقق التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى معدل لإنتاج مركبي tatariside و catechin بلغ 45.8 و 47.2 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف بالتتابع. فيما حقق التركيز 30 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى إنتاج لمركبي resveratrol و diboside بمعدل بلغ 26.42 و 29.11 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف بالتتابع. أثر التداخل الثنائي بين عاملي الدراسة معنوياً، إذ سببت مُعاملة الكالس المُستحث من الوريقة الفلقية بالتركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ من حامض البرولين في الحصول على أكبر كمية مُنتجة لمركبات catechin و resveratrol و diboside بلغت 58.10 و 36.67 و 34.54 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف بالتتابع.

الكلمات المفتاحية: زراعة الأنسجة النباتية، الحنطة التترية، حامض البرولين.

Influence of Proline on Secondary Metabolites Production from Callus of *Fagopyrum tataricum* L.

Shamil I. Neamah[1] Ismail A. Sarhan[2] Abbas A. Taha[3]

[1]University of Anbar, Center of Desert Studies.
[2]University of Anbar, College of Agriculture.
[3]University of Kirkuk, College of Agriculture.

Abstract

This study was carried out in plant tissue culture laboratory- Center of Desert Studies at university of Anbar from November 2017 to May 2018. The aim of the study was to determine the possibility of stimulating the biological pathways for the production of some medically important compounds from the explants of *Fagopyrum tataricum* L. using different concentrations of proline (0, 10, 20, 30) mg.L^{-1}. The results showed a significant effect of explants in the production of some compounds of *Fagopyrum tataricum* L. The callus induced by cotyledon the highest rate of production of catechin, resveratrol and diboside compounds of 29.7, 25.73 and 29.97 µg.100 mg^{-1} dry weight, respectively. While, the hypocotyl highest amount of tatariside compound was 33.6 µg.100 mg^{-1} dry weight. The treatment with proline acid increased significantly in the production of some compounds of the callus tissue of this plant. The concentration of tatariside and catechin compounds was 45.8 and 47.2 µg.100 mg^{-1} dry weight, respectively. While, the concentration of 30 mg.L^{-1} Highest production of resveratrol and diboside at 26.42 and 29.11 µg.100 mg^{-1} dry weight, respectively. The interaction between the two factors was significant, The treatment of the induced callus from the cotyledon resulted in a concentration of 20 mg.L^{-1} of the proline acid obtained the highest production of catechin, resveratrol and diboside compounds were 58.7, 36.67 and 34.54 µg.100 mg^{-1} dry weight, respectively.

Keywords: plant tissue culture, *Fagopyrum tataricum* L., proline amino acid.

المقدمة

يساهم القطاع الزراعي في سد الإحتياجات الضرورية لباقي القطاعات وفي مقدمتها القطاع الصناعي، إذ يوفر متطلباتهِ من المادة الأولية الخام التي تتطلبها الصناعة الدوائية مستفيداً بذلك من المركبات الكيميائية الطبيعية المتكونه داخل النباتات والتي أستخدم الكثير منها وعلى مدى العصور الماضية في علاج الأمراض المختلفة والتي بات قسماً منها مستعصياً، ومع تطور العلوم الصيدلانية وتبنيها لأساليب حديثة في العلاج لانزال في أمس الحاجة إلى تلك المركبات الطبيعية لما توفرهُ من علاج آمن وقلة تكاليفها قياساً بالمصنع فضلاً عن صعوبة تصنيع لقسم منها مختبرياً، لذا بات الحصول عليها من مصادرها الطبيعية آمرٌ لابد منهُ (Cseke وآخرون، 2006).

يُعد نبات الحنطة التترية *Fagopyrum tataricum* L. أحد أهم تلك النباتات، فهو يمتاز بفعالية بايولوجية عالية في معالجة العديد من الأمراض فهو مضاد للشيخوخة ومضاد للأرهاق والتعب (Zhang وآخرون، 1999 و Zhang وآخرون، 2005) وخافض لضغط الدم (Li وآخرون، 2002) وخافض لكوليسترول الدم (Tomotake وآخرون، 2007) ومضاد للأورام ومضاد للسكري (Yao وآخرون، 2008) مضاد للأكسدة ومضاد للبكتريا (Zhao وآخرون، 2018) ومضاد للسرطان (Guo وآخرون، 2007) و ومضاد للفطريات ومضاد للفايروسات (Pandey وآخرون، 2014 و Donsi و Ferrari، 2016). إستمدت تلك الخصائص العلاجية من إحتواءها على الكثير من المركبات الفعالة مثل الحوامض الفينولية والفلافونات والتربينات والفلافونيدات ومركبات عطرية والستروبدات (Zhao وآخرون، 2018).

توفر التقانات الحيوية بتطبيقاتها المُختلفة أساليب علمية مطورة في إيجاد الحلول الناجعة للكثير من المشكل التي تعاني منها القطاعات الإنتاجية المختلفة ومنها القطاع الزراعي، فمع صعوبة إستزراع أنواع نباتية مختلفة في العراق نظراً لعدم توفر الظروف البيئية الملائمة لإستزراعها ونموها مكنت تقانة زراعة الانسجة النباتية من إنتاج تلك المركبات خارج الجسم الحي (*in vitro*) بل تعدت ذلك إلى التحكم في المسارات الحيوية لإنتاج تلك المركبات من خلال إضافة البواديء والتي من شانها زيادة إنتاج المركب الهدف الذي يتطلب إنتاجهُ (George وآخرون، 2007 و Wink، 2010). وحامض البرولين هو احد تلك البواديء، إذ أشارت دراسة Al-Aubaidi (2009) إلى وجود تأثير معنوي عند إضافة حامض البرولين بالتركيز 10 أو 20 ملغم.لتر$^{-1}$ إلى الوسط الغذائي المُعد لتحفيز إنتاج Rosmarinic acid من الكالس المُستحث من السويقة لنبات السجاد واتفقت هذهِ النتيجة مع نتائج دراسة سبقتها (Shetty و Wahlqvist، 2004). بينما أظهرت دراسات آخرى بأن الأجزاء النباتية تختلف في محتواها الكيميائي من مركبات الأيض الثانوي عند حث الكالس لإنتاج تلك المركبات (Neamah و Almehemdi، 2017).

لذا هدفت الدراسة الحالية إلى إستثمار هذهِ التقانة في إنتاج بعض المركبات المهمة طبياً من خلال إستخدام تراكيز مختلفة من الحامض الأميني البرولين واستخدامه كباديء لتحفيز المسارات الحيوية المُتحكمة بإنتاج هذهِ المركبات من جزئيين نباتيين هما السويقة الجنينية السفلى والوريقة الفلقية.

المواد وطرائق البحث

تم الحصول على بذور نبات الحنطة التترية *Fagopyrum tataricum* L. من شركة Prorganics الأمريكية المتخصصة في إنتاج البذور، أجريت عملية انباتها في ظروف معقمة داخل المختبر وذلك بتعقيمها بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بالتركيز 6.0% ولمدة 10 دقائق، بعدها عقمت بمحلول الأيثانول 70% لمدة دقيقة واحدة ثم جرى غسلها بالماء المقطر المعقم لثلاث مرات متتالية للتخلص من بقايا محلول التعقيم بعدها زرعت في وسط نوع MS (Murashige و Skoog، 1962)، ثم حضنت البذور المزروعة على درجة حرارة 25 ±1 م° وإضاءة 1000 لوكس مدة 16 ساعة يومياً. بعد إنبات البذور المعقمة، أخذت السويقة تحت الفلقية والوريقة الفلقية لغرض إستحثاثهما لتكوين الكالس، جرى ذلك تحت ظروف معقمة داخل منضدة سريان الهواء الطبقي وزرعت في انابيب بأبعاد 2.5×8.0سم الحاوية على 10مل من الوسط الغذائي الذي يحتوي على 2,4-D و Kin. بالتركيزين 3.0 و 1.5 ملغم.لتر$^{-1}$ وهو التركيز الذي حقق أعلى معدل وزن طري للكالس من بين مجموعة من التراكيز التي تم إختبارها ولكلا المنظمين، وقد أستعملت التوليفة نفسها أعلاه لإدامة الكالس المستحث، زرع 150 ملغم من الكالس في وسط الإدامة مضافاً لهُ البرولين واستعملت التراكيز (0، 10، 20، 30) ملغم.لتر$^{-1}$ واتبع في تنفيذها التصميم العشوائي الكامل (CRD) وبثلاث مكررات، حُضنت الزروعات في الظروف المشار لها آنفاً في زراعة البذور.

ولإجراء التقدير النوعي والكمي للمركبات الفينولية الأربعة قيد الدراسة، تم إذابة مقدار 100 ملغم من عينة نسيج الكالس المُحفز بعد تجفيفها تحت 50°م في 30مل من محلول Acetonitrail جرى بعدها رج العينة ولمدة 30 دقيقة بإستعمال جهاز Ultra-sonicثم تم ترشيح المُستخلص بإستعمال ورق الترشيح Whatman بقطر 0.5 مايكرومتر لتنقيتهِ من الشوائب، ثم أخذ مقدار 25 مايكروليتر ليتم حقنهُ في جهاز كروموتوكرافيا السائل ذي الأداء العالي (HPLC) واستعمل الطور المتحرك Acetonitrail:Methanol:Distilled water (10:40:50, v/v/v) بسرعة جريان بلغت 1.4مل/دقيقة، أما الطول الموجي فكان 360 نانوميتر بعدها جرى تسجيل القراءات وحسب زمن الإحتجاز للمحاليل القياسية والعينات المدروسة (Suarez وآخرون، 2005 و Pacomel وآخرون، 2014 و Al-Zubaidy وآخرون، 2016). قدرت تراكيز المواد الفعالة كمياً بمقارنة مساحة حزمة المادة القياسية مع مساحة حزمة النموذج إعتماداً على المعادلة التالية:

تركيز المركب الفعال= $\frac{\text{مساحة حزمة النموذج}}{\text{مساحة حزمة المركب القياسي}}$ ×تركيز المركب القياسي×عدد مرات التخفيف

أجريت عملية التحليل الأحصائي على البيانات المُستحصل عليها ولمكررات الدراسة الثلاث، بإستعمال برنامج GenStat وتم حساب قيمة أقل فرق معنوي (L.S.D) لإجراء المقارنات بين المتوسطات الحسابية للمعاملات المختلفة عند مستوى إحتمال 5%.

النتائج والمناقشة

بينت النتائج في الجدول (1) وجود تأثير معنوي لكلا عاملي الدراسة في كمية المُنتج من مركب tatariside، إذ حققت السويقة الجنينية اعلى إنتاج لهذا المركب بلغ 33.6 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف تفوقت من خلالهِ معنوياً عن ماتم إنتاجهُ من الورقة الفليقة والذي بلغ 22.9 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف. أما المُعاملة بحامض البرولين فقد أعطت زيادة في إنتاج هذا المركب وحقق التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى كمية منهُ بلغت 45.8 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف تفوقت من خلالها معنوياً على كافة المعاملات قيد الدراسة في الوقت التي لم تختلف تلك المعاملات فيما بينها معنوياً. لم يظهر التداخل الثنائي بين الجزء النباتي وتركيز حامض البرولين تأثيراً معنوياً في إنتاج مركب tatariside.

جدول (1) تأثير الجزء النباتي وحامض البرولين في إنتاج مركب tatariside من كالس نبات الحنطة التترية *Fagopyrum tataricum* L. بعد أربعة أسابيع من الزراعة في وسط نوع MS

تركيز حامض البرولين (ملغم.لتر$^{-1}$)	الجزء النباتي		المتوسط
	السويقة الجنينية السفلى	الوريقة الفلقية	
0	21.1	15.7	18.4
10	32.8	15.3	24.0
20	50.6	41.0	45.8
30	30.0	19.5	24.8
المتوسط	33.6	22.9	
L.s.d 0.05	Ex.= 8.73**	Pr.= 12.34**	Ex. × Pr.= N.S

أما بالنسبة لمركب catechin فقد أظهرت النتائج في الجدول (2) وجود إختلاف معنوي بين تراكيز حامض البرولين والجزء النباتي (الوريقة الفلقية والسويقة الجنينية السفلى) في إنتاجهِ، إذ حقق الكالس المُستحث من الوريقة الفلقية زيادة معنوية بلغت نسبتها 38.79% قياساً بالمنُتج من السويقة الجنينية السفلى. كما إختلفت تراكيز حامض البرولين فيما بينها معنوياً وحقق الكالس المُنمى في وسط غذائي متضمن حامض البرولين بالتركيز 20 أعلى معدل معنوي بلغ 47.2 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف إختلف معنوياً عن التركيز 30 ملغم.لتر$^{-1}$ الذي أعطى كمية إنتاج بلغت 23.3 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن جاف واختلف بدورهِ معنوياً قياساً بمعاملة المقارنة التي اعطت ادنى إنتاج للمركب بلغ 11.9 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن جاف. كما أثر التداخل بين العاملين معنوياً وحقق نسيج الكالس المُستحث من الوريقة الفلقية والمُنمى في وسط غذائي مزود بالبرولين بالتركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى معدل لإنتاج

جدول (2) تأثير الجزء النباتي وحامض البرولين في إنتاج مركب catechin من كالس نبات الحنطة التترية *Fagopyrum tataricum* L. بعد أربعة أسابيع من الزراعة في وسط نوع MS

تركيز حامض البرولين (ملغم.لتر$^{-1}$)	الجزء النباتي		المتوسط
	السويقة الجنينية السفلى	الوريقة الفلقية	
0	13.1	10.7	11.9
10	19.9	20.0	20.0
20	35.6	58.7	47.2
30	16.9	29.6	23.3
المتوسط	21.4	29.7	
L.s.d 0.05	Ex.= 6.87*	Pr.= 9.72**	Ex. × Pr.= 13.75*

مركب catechin بلغ 58.7 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن جاف في حين أعطى نسيج الكالس لذات الجزء النباتي وغير المعامل بالبرولين أدنى معدل لإنتاج هذا المركب بلغ 10.7 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن جاف.

يُظهر الجدول (3) بأن مركب resveratrol قد تأثر إنتاجهُ بفعل كلا عاملي الدراسة، إذ حقق الكالس المُنمى من الوريقة الفلقية زيادة معنوية في معدل إنتاجهِ بلغ 25.73 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف في حين حقق الكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى (11.03 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف). كما زاد معدل إنتاج المركب معنوياً بزيادة المعاملة بحامض البرولين، إذ حقق التركيز 30 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى معدل لإنتاج المركب بلغ 26.42 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف ومع أن ذلك التفوق لم يصل مستوى المعنوية قياساً بما تم إنتاجه عند المعاملة بالتركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ (24.19 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن جاف)، إلا أن كلاهما تفوقا معنوياً على معاملتي المقارنة والتركيز 10 ملغم.لتر$^{-1}$ الذين أعطيا معدلاً لإنتاج المركب بلغ 9.37 و 13.55 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف. وأدى التداخل بين عاملي الدراسة إلى ظهور زيادة معنوية في كمية المُنتج لهذا المركب بين المُعاملات قيد الدراسة، وحقق التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ عند تضمينهِ للوسط الغذائي المُعد لتحفيز الكالس المُستحث من الوريقة الفلقية أعلى معدل معنوي لإنتاج مركب resveratrol بلغ 36.67 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف متفوقاً بذلك معنوياً على أغلب المُعاملات قيد الدراسة، في حين أنتجت معاملة المقارنة للكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى بلغ 5.05 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف (جدول 3).

جدول (3) تأثير الجزء النباتي وحامض البرولين في إنتاج مركب resveratrol من كالس نبات الحنطة التترية *Fagopyrum tataricum* L. بعد أربعة أسابيع من الزراعة في وسط نوع MS

تركيز حامض البرولين (ملغم.لتر$^{-1}$)	الجزء النباتي		المتوسط
	السويقة الجنينية السفلى	الوريقة الفلقية	
0	5.05	13.69	9.37
10	8.23	18.86	13.55
20	11.70	36.67	24.19
30	19.14	33.70	26.42
المتوسط	11.03	25.73	
L.s.d 0.05	Ex.= 4.27**	Pr.= 6.04**	Ex. × Pr.= 8.55*

كما يتضح من الجدول (4) وجود تأثير معنوي للجزء النباتي المُستعمل في مدى إنتاج مركب diboside، إذ تفوقت الوريقة الفلقية بإعطائها إنتاجاً بلغ 29.27 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف وهو أوفر لهذا المركب قياساً بما أنتجتهُ السويقة متمثله بالكالس المُستحث منها والتي بلغت 14.98 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف. كما أحدث المُعاملة بحامض البرولين زيادة معنوية في إنتاج diboside وحقق التركيز 30 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى معدل معنوي بلغ 29.11 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف مخُتلفاً بذلك معنوياً مع كافة المعاملات قيد الدراسة (0، 10، 20) ملغم.لتر$^{-1}$ والتي اعطت معدلاً لإنتاج المركب بلغ 25.03 و 21.38 و 14.38 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف بالتتابع. فضلاً عن التاثير المعنوي للتداخل بين الجزئيين النباتيين وتراكيز حامض البرولين، إذ حقق التركيز 20 ملغم.لتر$^{-1}$ المضاف للوسط الغذائي المُعد لتحفيز الكالس المُستحث من الوريقة أعلى معدل للمركب المُنتج على الإطلاق بلغ 34.54 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن جاف إختلف من خلالهِ معنوياً مع جميع التراكيز الداخلة في الدراسة في الوقت الذي أنتج فيهِ الكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى النامي في الوسط الغذائي غير المُتضمن بحامض البرولين أدنى معدل لإنتاج المركب بلغ 7.28 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$وزن جاف.

إن الدور الإيجابي الذي سلكهُ البرولين في زيادة إنتاج المركبات الأربعة قيد الدراسة قد يعزى إلى دورهُ في تحفيز المسالك الحيوية لإنتاج هذهِ المركبات، إذ تساهم تراكيز البرولين في تنشيط المسار الحيوي Proline–linked pentose phosphate الذي يحفز Shikimate ومسار بناء Phenyl propanoid والتي تعمل بدورها على تحفيز بناء المركبات الحيوية عامةً ومنها المركبات قيد الدراسة والتي تصنف من ضمن المركبات الفينولية وتتفق هذهِ النتائج مع ما أشارت اليهِ دراسات آخرى منها دراسة Sereitia وآخرون (1999) على نبات المريمية ودراسة Haq (2007) عندما أستعمل نباتات طبية محتلفة. أن القدرة التي تمتلكها الأجزاء النباتية في إنتاج بعض المركبات الكيميائية تختلف بحسب طبيعة الجزء النباتي وهذا ناتج من إختلاف الاصل الذي نمى منهُ هذا الجزء، فضلاً عن إختلاف تلك الأجزاء في محتواها الهرموني وتركيز تلك المركبات الثانوية فيها (Neamah و Almehemdi، 2017).

جدول (4) تأثير الجزء النباتي وحامض البرولين في إنتاج مركب diboside من كالس نبات الحنطة التترية *Fagopyrum tataricum* L. بعد أربعة أسابيع من الزراعة في وسط نوع MS

تركيز حامض البرولين (ملغم.لتر$^{-1}$)	الجزء النباتي		المتوسط
	السويقة الجنينية السفلى	الوريقة الفلقية	
0	7.28	21.47	14.38
10	10.92	31.85	21.38
20	15.52	34.54	25.03
30	26.21	32.00	29.11
المتوسط	14.98	29.97	
L.s.d 0.05	Ex.= 2.435**	Pr.= 3.443**	Ex. × Pr.= 4.869**

المصادر

1. Al-Aubaidi, S. S., (2009). Employment of Plant Tissue Culture to Increase Secondary Product (rosmarinic acid RA) in *Coleus blumei* Benth. M.Sc. thesis, Department of Biology, College of Science for women, University of Baghdad, pp: 91.
2. Al-Zubaidy, A. M., K. I. Hassan, and B. S. Jabbari (2016). Analysis of naturally occurring phenolic compound of the genera *Clinopdium* L., *Hymenocrater fish* and C. A. Mey. and *Melissa* L. The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 44(1): 343-384.
3. Cseke, L. J., A. Kirakosyan, P. B. Kaufman, S. L. Warber, J. A. Duke, and H. L. Brielmann. (2006). Natural Products from Plants. (2nd ed.). Taylor and Francis Group is the Academic Division of Informa plc. pp: 551.
4. Donsi, F. and Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. J. Biotechnol, 233: 106-120.
5. George, F. E., Hall, M. A. and De Klerk, G. (2007). Plant Propagation by Tissue Culture (3rd ed.). Springer.
6. Guo, X., Zhu K., Zhang H. and Yao H. (2007). Purification and charac terization of the antitumor protein from Chinese tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) water-soluble extracts. J. Agric. Food Chem. 55: 6958-6961.
7. Haq, N. (2007). *In vitro* production of bioactive compounds from medicinal and aromatic plant. ICUC. Univ. Southampton, U. K.
8. Li, C., Matsui T, Matsumoto K., Yamasaki R. and Kawasaki (2002). Latent production of angiotensin I-Converting enzyme inhibitors from buckwheat protein, Journal of Peptide science, 8: 267-274.
9. Neamah, S. I. and A. F. Almehemdi. (2017). Extraction of natural compounds from callus inducted of common sage plant *Salvia officinalis* L. and their evalution of antioxidant activity, Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 48 (6): 1541-1548.
10. Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant., 15:473-497.
11. Pacomel, O.A., D.N, .Bernard; D., Sekou; A., Joseph; G.J, David; K. Mongomake and K.T, Hilaire (2014). Phytochemical and Antioxidant Activity of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa*L.) Petal Extracts. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 5(2): 1453-1465.
12. Pandey, A.K.; Singh, P. and Tripathi, N.N. (2014). Chemistry and bioactivities of essential oils of some Ocimum species: An overview. Asian Pac. J. Trop. Biomed, 4, 682–694.
13. Sereitia, M. R., K. M. Abu-Amerb and P. Sena (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and it's therapeutic potentials. Ind. J. Exp. Bio., 37:124-131.

14. Shetty, K. and M. Wahlqvist (2004). A model for the role of the proline- linked pentose phosphate pathway in phenolic phytochemical biosynthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. J. Clin. Nutr., 13(1):1-24.
15. Suarez, B., N., Palacios, N., Fraga, and R., Rodriguez (2005). Liquid chromatographic method for quantifying polyphenols in ciders by direct injection. Journal of Chromatography, 1066: 105-110.
16. Tomotake H., Yamamoto N., Nitabayashi A., Kayashita J., Ohinata H., Karasawa H. and Kato N. (2007). Perparation of tartary buckwheat protin product and its improving effect on cholesterol metabolism in rats and mice fed cholesterol-enriched diet.Journal of food sience, 72: 528- 533.
17. Wink, M. (2010). Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. (2nd ed.). Vol. 39, Annual Plant Reviews. A John Wiley and Sons, Ltd., Publications.
18. Yao Y., Shan F., Bian J., Chen F., Wang M. and Ren G. (2008). D-chiroinositol- enriched tartary buckwheat bran extract lowers the blood glucose level in KK-Ay mice. J. Agric. Food Chem. 56: 10027-10031.
19. Zhang C, Lu Y, Guo G. and Zhang H. (2005). Studies on antifatigue of buckwheat protein. Journal of food science and Biotechnology, 24:78-82.
20. Zhang Z, Wang Z, Liu F. and Liu R. (1999). Studies on nutrition and antisenescence function of protein complex from tartary buckwheat. Acta Nutrimenta sinica, 21: 159-162.
21. Zhao, J., Lan Jiang, Xiaohui Tang, Lianxin Peng, Xing Li, Gang Zhao and Lingyun Zhong (2018). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Flower Volatile Oils of *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum* and *Fagopyrum Cymosum*, Molecules, 23: 182-191.