1 - تأثير السكروز والمانيتول في انتاج الاجماليسين من الكالس المستحث من اوراق نبات عين البزون L. *Catharanthus roseus* G. Don خارج الجسم الحي

Effect of sucrose and mannitol on Ajmalicine production from leaves induced callus of *Catharanthus roseus* L. G. Don *in vitro*

عماد حمدي جاسم سامي كريم محمد امين
مركز بحوث السوق وحماية المستهلك/ جامعة بغداد
كلية الزراعة/ جامعة بغداد
Emad H. Jassim **Sami K. M. Ameen**
Center for Market Research and Consumer Protection/ University of Baghdad
College of Agriculture/ University of Baghdad

المستخلص

اجريت دراسة تأثير كل من السكروز والمانيتول في تحفيز الكالس المستحث من اوراق نبات عين البزون في انتاج الـ Ajmalicine للفترة من شباط 2011/ولغاية مايس 2012 تم استحثاث الكالس بعد زراعة الاوراق الحقيقة على الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 0.5 ملغم/لتر 2,4-D و1 ملغم/لتر Kin وكان أفضل وسط غذائي لإدامة الكالس هوالوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 0.5 ملغم/لتر من 2,4-D و1.5 ملغم/ لترمن Kin والذي اضيفت اليه مستويات مختلفة من المانيتول بالتراكيز 0, 6000, 8000 ملغم/ لتر والسكروز 40, 60 ,80, 100 غم/ لتر كل على حده وكانت معاملة المقارنة هي إضافة 30 غم/ لتر من السكروز إلى الوسط الغذائيMS . اظهرت النتائج ان اضافة 100غم/لترمن السكروز كان الأعلى في إعطاء أعلى كمية لمركب الـ Ajmalicine بلغ 32.27 مايكروغم /100ملغم وزن طري من الكالس . بينما التركيز 8000 ملغم/لتر من المانيتول أعطى أفضل النتائج في زيادة تركيز مركب الـ Ajmalicine بلغت 120.19مايكروغم/100ملغم وزن طري من الكالس . وبينت النتائج إن تركيز الـ Ajmalicine المستخلص من أوراق النباتات عين البزون النامية بالاصص اقل بكثير من تلك التي قدرت بالكالس . فقد كان تركيز مركب Ajmalicine 0.047 مايكروغم /100ملغم وزن طري من الأوراق .

الكلمات المفتاحية: عين البزون ، اجماليسين ، المانيتول ، السكروز .

Abstract

An experiment on the effect of sucrose and mannitol on leave induced callus of *Catharanthus roseus* was conducted from February 2011 to May 2012. Callus induction was achieved by culturing leaves of the plant on MS medium supplemented with 0.5 mg /L 2,4-D and 1mg / L Kin, The best medium to maintain callus was on MS medium modified with 0.5 mg /L 2,4-D and 1.5 mg / L Kin. when different levels were added to MS medium for each Mannitol 0, 6000 ,8000 ,10000 mg /L and Sucrose 40, 60 ,80, 100 g /L in split experimental and control treatment was MS medium supplemented with 30 g/L sucrose. The results showed that medium supplemented with 100 g\L of sucrose gave the highest quantity of Ajmalicine 32.27 µg/100 mg fresh weight of callus,as well as medium supplemented with 8000 mg\L of Mannitol gave the highest value of Ajmalicine 120.19 µg/100 mg fresh weight of callus. The concentrations of Ajmalicine, derived from the leaves of the plants grown in pot, were lowest than the concentrations produced by the callus grown *in vitro* it was 0.047 µg/100 fresh weight of the leaves.

Key Word: *Catharanthus roseus*, Ajmalicine, Mannitol, Sucrose.

المـقدمة

يعد نبات عين البزون *Catharanthus roseus* L.G.Don الذي يعود للعائلة الدفلية Apocynaceae من النباتات العشبية المعمرة. يتكاثر بالبذور والعقل، ألوان إزهاره تتدرج من الأبيض إلى الأحمر ، يبلغ ارتفاعه 30–100 سم [1]. الأوراق متعاكسة مستطيلة الشكل وذات قمة مستديرة [2] . يحتوي على كثير من المواد القلويدية ومنها مركب Ajmalicine الذي يستخدم لعلاج مرض ارتفاع ضغط الدم [3] . ونواتج الأيض الثانوية تعد نواتج نهائية لعمليات الأيض الأولية التي تنتج من عملية التمثيل الضوئي كالكاربوهيدرات والليبيدات والبروتينات [4] هذه المركبات لها دوراً مهماً بوصفها مواداً فعالة دوائياً وفسلجياً، و توفر الجانب الآمن من الاستخدام الطبي والعلاجي [5].

أشارت الدراسات إلى إمكانية تحفيز إنتاج المركبات الثانوية عند تعرضها للإجهاد الذي يتمثل بإضافة السكروز إلى الوسط الغذائي. لاحظ [6] إذ أشاروا إلى إن زيادة تركيز السكروز في الوسط عند زراعة خلايا نبات عين البزون من 4-10% حفز محتوى القلويدات. فيما أشارت [7] إن زيادة تركيز السكروز بالوسط من 3-5% ادى الى زيادة إنتاج قلويدات Theophylline في المزارع النسيجية لنبات الروجة .*Hypericum performatum* L . كما وجد [8] إن زيادة تركيز السكروز في الوسط من 3% إلى 6% أدى إلى زيادة نسبة القلويدات الكلية عند زراعة كالس نبات عين البزون .

البحث مستل من اطروحة دكتوراه الباحث الاول

يعدالمانيتول من السكريات الكحولية غير الحلقية [9] وتؤدي إضافته إلى زيادة تدريجية في الضغط الازموزي [10]. أكد [11] إن إضافة المانيتول بتركيز 250 مايكرو مول/ لتر إلى الوسط الغذائي الخاص بزراعة كالس عين البزون أدى إلى زيادة تركيز مركب Ajmalicine إذ بلغ 42.3 ملغم / لتر مقارنة بالمعاملة الخالية من المانيتول . ولاحظ [12] إن زيادة تركيز المانيتول من 20غم/ لتر الى 40 و60 غم/ لتر أدى إلى زيادة انتاج المادة الفعالة Thujone إذ بلغت 161.9 و157.2 مايكروغرام/غم وزن جاف للكالس على التوالي مقارنة بالتركيز 20 غم/ لترمن المانيتول والبالغة 125.4 مايكرو غم/غرام وزن جاف لكالس نبات المريمية. و أشار [13] إن إضافة 0.08 ،0.16 ،0.32 ، 0. 64 مول/لتر من المانيتول إلى وسط MS المزروع به الخلايا المعلقة لنبات *Justicia adhatoda* L. أعطى التركيز 0.32 مول/لتر أعلى زيادة في إنتاج المواد الفعالة بلغت 6.56 ملغم/مل مقارنة بالمعاملة المحايدة . تهدف هذه الدراسة الى معرفة تاثير اضافة نوعين من السكريات sucrose و Mannitol وبتواكيز مختلفة في تحفيز انتاج Ajmalicine من كالس نبات عين البزون المستحث من الاوراق .

المواد وطرائق العمل

نفذت هذه الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لقسم البستنة– كلية الزراعة - جامعة بغداد للفترة من شباط 2011 إلى مايس2012 فيما اجريت التحليلات المختبرية المتضمنة تقدير المواد الفعالة في شركة الحقول البيضاء للاستشارات البيئية والهندسة /الحارثية /بغداد.

زراعة البذور

استعملت بذور نبات عين البزون الصنف الأحمر Really Red من شركة إنتاج البذور الأمريكية Pan American Seed. زرعت البذور في طبق فليني بعد ملئه بالبيتموس و عند الإنبات وظهور من 2 -3 أزواج من الأوراق الحقيقية نقلت الشتلات إلى سنادين قطرها 15 سم مملوءة بـ 1 :1 بيتموس :زميج . وضعت شتلة واحدة في كل سندانة وتركت النباتات لتنمو بشكل طبيعي لحين أخذ عينات الأوراق النباتية الكافية لإجراء عملية التحليل كما موضحة بالفقرة 2-5.

التعقيم السطحي للبذور و زراعتها .

عقمت بذور عين البزون الصنف الاحمر سطحيا بالكحول الأثيلي Ethanol بتركيز 70% ولمدة 30 ثانية[14] ثم نقلت إلى محلول القاصر التجاري (فاس) والحاوي على نسبة 6%من هايبوكلورات الصوديوم NaOCl بتركيز 4.5 ولمدة 15 دقيقة غسلت البذور بعدها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات ،لضمان إزالة بقايا المادة المعقمة من البذور [15] . زرعت البذور على وسط (MS)[16] شبه الصلب والخالي من منظمات النمو وبقوة املاح كاملة. حضنت البذور في غرفة النمو على شدة اضاءة 1000 لوكس وفترة اضاءة 16 ساعة ضوء وعلى درجة حرارة25 ± 2 م. وبعد 4أسابيع من الزراعة تم استئصال الأجزاء النباتية Explant المستخدمة في الدراسة.

نشوء الكالس وادامته

زرعت الاوراق الحقيقة في انابيب زراعة زجاجية Screw Glass Tube سعة 26 ml قياس 85 mm x 28، حاوية على وسط MS بمقدار10 ml لكل أنبوب والمجهز بتراكيز الأوكسين 2,4–D (1.0, 0.5,0) ملغم / لتر أما السايتوكاينين Kin فأضيف بالتراكيز 2.0,1.0,0 ملغم/لتر وكان عدد المكررات عشرة وتمثل كل أنبوبة اختبار مكرر واحد فكان افضل وسط للاستحثاث المجهز بالتركيز 0.5ملغم\لتر من 2,4–D و 1.0 ملغم\لترمن Kin. حيث اجريت تجربة ادامة للكالس باخذ 150 ملغم من الكالس والمستحث من الورقة الحقيقية بالتراكيز 0،0.25،0.5،0.75 ملغم /لتر من الـ 2,4-D والـ Kin بالتراكيز 0،0.5 ،1،1.5 ملغم /لتر لمعرفة أفضل وسط لإدامة الكالس وكان الوسط المجهز 0.5ملغم\لتر من 2,4–D و 1.5 ملغم\لتر منKin الافضل الذي اعطى اعلى وزن طري وجاف للكالس.

تحفيز إنتاج مركب Ajmalicine في الكالس.

اخذ وزن ثابت من الكالس 150 ملغم وزرع على الوسط MS والمجهز بتركيز 0.5 ملغم/ لتر من 2,4-D ،1.5 ملغم/ لترمن Kin مع إضافة مستويات مختلفة وفي تجارب مستقلة لكل من المانيتول بالتراكيز 0,6000, 8000 ,10000 ملغم \ لتر والسكروز بالتراكيز 80,60,40,100غم \ لتر وكانت معاملة المقارنة هي إضافة 30 غم \ لتر من السكروز إلى الوسطMS . كان عدد المكررات عشرة لكل تركيز ومعاملة و حضنت الزروعات ولكافة المعاملات في الظلام على درجة حرارة 25 ±2 م ثم بعد خمسة أسابيع أجريت لها عملية استخلاص المواد الفعالة.

الاستخلاص والتقدير الكمي والنوعي للمادة الفعالة من الكالس

اخذ 100 ملغم وزن طري من عينة الكالس وجفدت لمدة 8 ساعات، ثم سحق بهاون، المادة الفعالة استخلصت باضافة 2مل من الكحول المثيلي الى المسحوق لمدة 60 دقيقة في حمام مائي و بدرجة حرارة الغرفة. نقل المستخلص إلى جهاز الطرد المركزي Centrifuged عند 1500دورة ولمدة 5 دقائق وبدرجة حرارة الغرفة. رشح الرائق من خلال مرشح من نوع PTFE قطره0.45 مايكروميتر في قنينة زجاجية مظللة لل HPLC، بعد ذلك حقن 20 µL مايكرولتر في جهاز HPLC تبعا لظروف الفصل المثالية [17]. حقن كل من المحلول القياسي والعينة في جهاز HPLC نوع Shimadzu 10AV-LC لغرض تحديد زمن الاحتجاز Retention time وارتفاع حزمة العينة Area لكل من المحلول القياسي للمواد الفعالة و لعينة الكالس استخدم عمود من نوع (50x4.6mmI.D) وطورمتحرك (mobile phase) للمركب Ajmalicine خليط يتكون من 100 مايكرومول محلول دارئ الفوسفات ذا pH (2.0):Acetonitrile وبنسبة 85:15 حجم/ حجم وكانت سرعة جريان الجهاز 1مل / دقيقة وقيست القراءات على طول موجي قدره238nm وبدرجة حرارة 25 م. اما عينة الأوراق الحقيقية للنبات النامي في الاصص اخذ 100ملغم وزن طري من الأوراق لتقدير المادة الفعالة وهو نفس وزن العينة للكالس فلم يؤشر الجهاز اية قيمة للمركبات المدروسة وعند الزيادة التدريجية لوزن العينة لحين الوصول إلى وزن 7غم وزن طري بدا الجهاز بتسجيل كمية ونوع المواد الفعالة. حسب تركيز كل عينة حسب المعادلة الآتية:-

$$\text{تركيز النموذج} = \frac{\text{مساحة النموذج}}{\text{مساحة المحلول القياسي}} \times \text{تركيز المحلول القياسي} \times \text{عدد مرات التخفيف}$$

- علما إن تركيز المحلول القياسي =25 مايكروغرام/ مل، عدد مرات التخفيف = 1

التصميم الإحصائي

استخدم التصميم التام التعشية CRD وكان عدد المكررات عشرة وتمثل كل أنبوبة اختبار مكرر واحد. وقورنت المتوسطات باستعمال اقل فرق معنوي L.S.D لبيان الفروق الإحصائية بين المعاملات وعلى مستوى احتمال 0.05 [18].

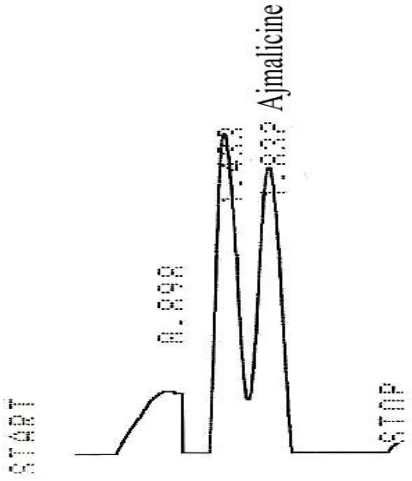
النتائج والمناقشة

تأثير السكروز في إنتاج المادة الفعالة Ajmalicine من الكالس

يلاحظ من النتائج المبينة في جدول (1) أن هناك زيادة معنوية في كمية الـ Ajmalicine المستخلصة من كالس الورقة لنبات عين البزون أستجابة لزيادة تراكيز السكروز المضافة للوسط الغذائي ، اذ بلغت أعلى قيمة من Ajmalicine في الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 100 غم/لترمن السكروز 32.27 مايكروغرام /100ملغم وزن طري . وسجلت المعاملة 30 غم\لتر من السكروز اقل كمية منAjmalicine بلغت 9.11 مايكروغرام /100ملغم وزن طري . وكما في شكل (1- D,C,B,A).

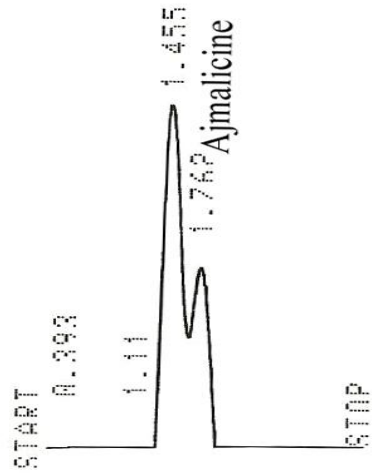
جدول (1): تأثير السكروز في إنتاجAjmalicine (مايكروغرام /100ملغم وزن طري) من كالس نبات عين البزون المزروع في الوسط الغذائي MS بعد خمسة أسابيع من الزراعة .

تراكيزالسكروز غم/لتر	30	40	60	80	100	L.S.D. 0.05
Ajmalicine	9.11	12.66	26.20	29.60	32.27	* 4.65



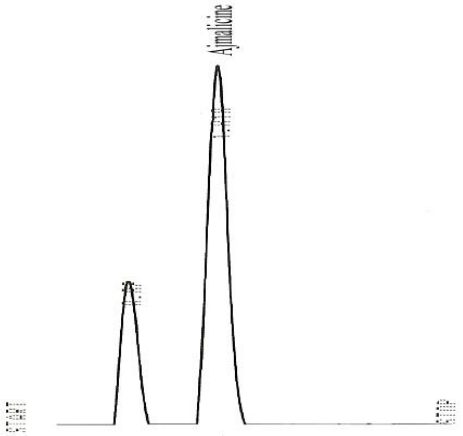
شكل (1-A): معاملة المقارنة الخالية من المحفزات لإنتاج Ajmalicine من نسيج الكالس

المركب	زمن الاحتجاز/ دقيقة	المساحة
Ajmalicine	1.832	15090



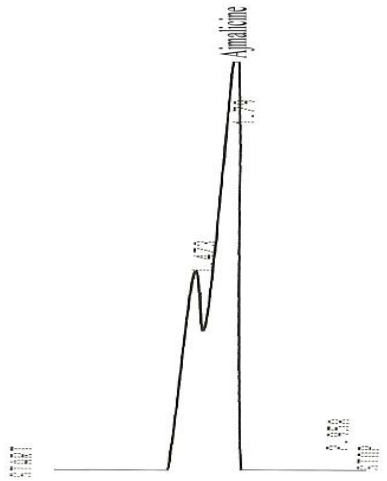
شكل (1-B): تأثير السكروز بالتركيز 40 غم\لتر في إنتاج Ajmalicine من نسيج الكالس

المركب	زمن الاحتجاز/ دقيقة	المساحة
Ajmalicine	1.762	20972



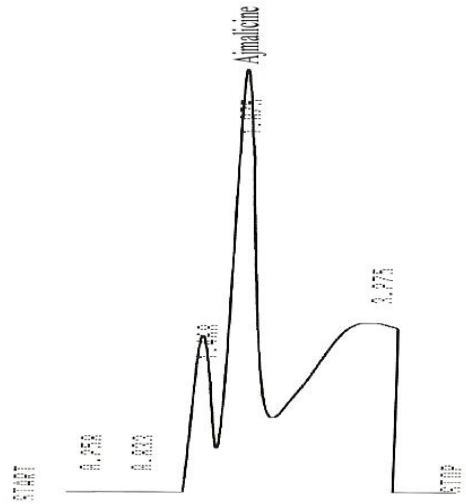
شكل (C-1): تأثير السكروز بالتركيز 60 غم\لتر في إنتاج Ajmalicine من نسيج الكالس

المركب	زمن الاحتجاز/ دقيقة	المساحة
Ajmalicine	**1.818**	**43390**



شكل **(D-1):تأثير السكروز بالتركيز 80 غم\لتر في إنتاج Ajmalicine من نسيج الكالس**

المركب	زمن الاحتجاز/ دقيقة	المساحة
Ajmalicine	**1.79**	**49030**



شكل (E-1): تأثير السكروز بالتركيز 100 غم\لتر في إنتاج Ajmalicine من نسيج الكالس

المركب	زمن الاحتجاز/ دقيقة	المساحة
Ajmalicine	**1.875**	**53447**

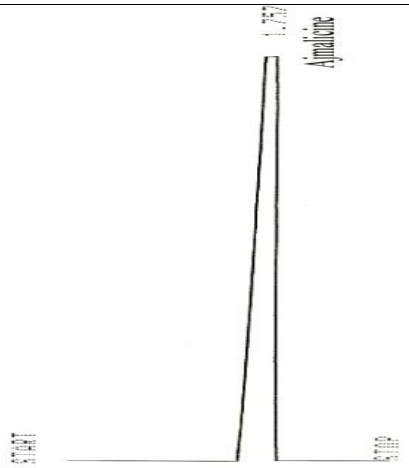
تشير نتائج جدول (1) إن زيادة تراكيز السكروز أدت إلى زيادة تدريجية في كمية قلويد Ajmalicine وقد يعزى السبب إلى إن الكاربوهيدرات وهي من المكونات المهمة لأي وسط غذائي و يتحدد تأثيرها على الجزء النباتي المزروع في كونها مصدر إلى الطاقة والكربون فضلا عن دورها في تنظيم ازموزية الوسط [19]. إلا إن الزيادة في كمية السكروز تؤدي إلى التعرض التدريجي للإجهاد والذي يؤثر على الأنزيمات وذلك بسبب عملية سحب الماء Dehydration من البروتوبلازم [20]، مما يحفز الخلايا على أنتاج مركبات الأيض الثانوي. أن هذا يتفق مع ما توصل إليه كل من [8,6] عند زيادة تركيز السكروز المضاف إلى الوسط الغذائي لكالس نبات عين البزون أدى الى زيادة نسبة القلويدات الكلية. و ما توصلت اليه [7] عند زيادة تركيز السكروز بالوسط من 3-5% ادى الى زيادة إنتاج قلويدات Theophylline في المزارع النسيجية لنبات الروجة L. *Hypericum performatum*.

تأثير Mannitol في إنتاج المادة الفعالة Ajmalicin من الكالس

أظهرت النتائج زيادة كميات المادة الفعالة من مركب Ajmalicin عند إضافة الـ Mannitol إلى الوسط الغذائي. وتفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 8000 ملغم/لتر من Mannitol معنويا في أعطاء أعلى كمية من مركب Ajmalicine بلغت 120.19 مايكروغم /100ملغم وزن طري للكالس على التوالي في حين بلغ ادنى كمية من المركب عند الوسط الغذائي الخالي من Mannitol إذ بلغت 9.11 مايكروغم /100ملغم وزن طري للكالس على التوالي . جدول (2) وشكل 2(C,B,A).

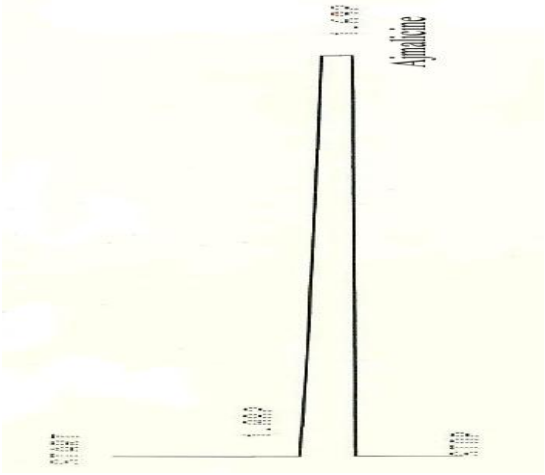
جدول (2): تأثير Mannitol في إنتاج Ajmalicine (مايكروغرام / 100ملغم وزن طري) من كالس نبات عين البزون المزروع في الوسط الغذائي MS بعد خمسة أسابيع من الزراعة

تراكيز Mannitol ملغم/لتر	0	6000	8000	10000	L.S.D. 0.05
Ajmalicine	9.11	35.44	120.19	86.07	*24.94



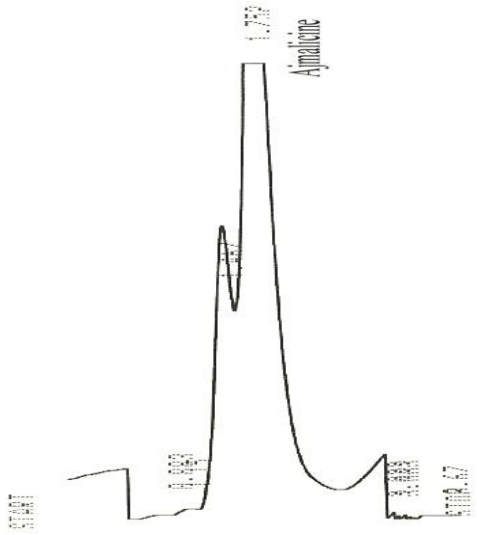
شكل (2-A): تأثير Mannitol بالتركيز 6000 ملغم\لتر في إنتاج Ajmalicine من نسيج الكالس

المركب	زمن الاحتجاز/ دقيقة	المساحة
Ajmalicine	1.757	58700



شكل (2-B): تأثير Mannitol بالتركيز 8000 ملغم\لتر في إنتاج Ajmalicine من نسيج الكالس

المركب	زمن الاحتجاز/ دقيقة	المساحة
Ajmalicine	1.692	199070



شكل (C-2): تأثير Mannitol بالتركيز 10000 ملغم\لتر في إنتاج Ajmalicine من نسيج الكالس

المساحة	زمن الاحتجاز/ دقيقة	المركب
142558	1.752	Ajmalicine

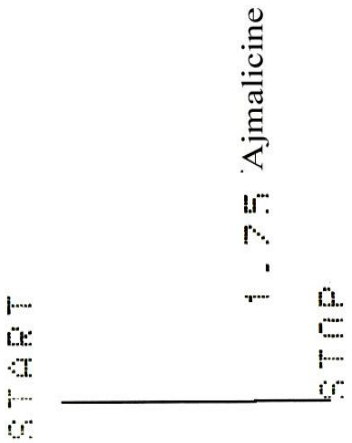
نستنتج من جدول (2) زيادة تراكيز الـ Mannitol المضاف إلى الوسط الغذائي أظهرت استجابة واضحة للكالس لإنتاج المركبات القلويدية Ajmalicine. وقد يعزى السبب في زيادة إنتاج القلويدات معنويا بزيادة تراكيز السكر الكحولي الـ Mannitol إلى إن السكريات الكحولية تستعمل في زراعة الأنسجة بكثرة وهي من مصادر الإجهاد الازموزي [21] مما يسبب في زيادة الشد مؤديا إلى زيادة تكون مركبات الأحماض الامينية [22] وبالتالي تدخل من خلال مسارات البناء الحيوي shikmate لتصنيع مركبات ثانوية مختلفة [23]. وكانت النتائج متفقة مع ما توصل إليه [11]عند إضافة المانيتول بتركيز 250 مايكرو مول/ لتر إلى الوسط مما أدى إلى زيادة تركيز مركب Ajmalicine إذ بلغ 42.3 ملغم /لتر مقارنة بمعاملة المحايدة ومع ما أكده [12] ان إضافة المانيتول الى الوسط الغذائي المزروع فيه كالس نبات المريمية أدى إلى زيادة انتاج مركب Thujone. واوضح [13] إن إضافة المانيتول إلى وسط MS للخلايا المعلقة لنبات *Justicia adhatoda* L. أدى إلى زيادة إنتاج المواد الفعالة مقارنة بالمعاملة المحايدة.

تقدير Ajmalicine في أوراق نبات عين البزون

يبين جدول (3) كمية مركب Ajmalicine في الأوراق للنبات النامي في الأصص إذ لم يسجل جهاز HPLC قياس المادة الفعالة المدروسة إلا عند اخذ وزن 7غم طري من الأوراق وقد يعود السبب في ذلك إلى انخفاض كميتها بالنبات الطبيعي إذ ينتج النبات المركبات الثانوية وخاصة القلويدات بتراكيز واطئة جدا تبلغ 0.0005% [24]. كما يبين نفس الجدول كمية المادة الثانوية عند تحويلها إلى وزن 100ملغم المعتمد لتحليل الكالس. ويستنتج من مقارنة كمية المادة الفعالة المدروسة في النباتات المزروعة في الأصص عند وزن 100 ملغم أوراق مع تلك التي تم الحصول عليها من 100ملغم كالس والخالي من إضافة إي محفزات سواء أكانت المانيتول أو السكروز للكالس المستحث من أوراق النبات المزروعة خارج الجسم الحي تفوق الكالس على نبات عين البزون المزروع بالأصص. ويبين شكل (3) كمية المواد الفعالة المستخلصة من أوراق نبات عين البزون.

جدول (3): إنتاج Ajmalicine والمقدرة من أوراق نبات عين البزون المزروع في الأصص .

وزن العينة الطري	7 غم أوراق	100 ملغم أوراق	100ملغم كالس بدون محفزات مقارنة
Ajmalicine مايكروغرام	3.27	0.047	9.11



شكل (3): كمية Ajmalicine لاوراق نبات عين البزون النامي في الأصص

المساحة	زمن الاحتجاز/ دقيقة	المركب
5412	1.75	Ajmalicine

إما في حالة مقارنة المادة الفعالة المدروسة في النباتات المزروعة في الأصص عند وزن 100 ملغم من أوراق النبات النامي بالأصص مع التراكيز المختلفة للمحفزات المضافة إلى الكالس النامي في الوسط الغذائي فوجد إن تركيز مركب الـ Ajmalicine في أحسن معاملة للكالس المزروع في الوسط MS المضاف إليه 8000 ملغم/لتر من Mannitol بلغت 120.19 مايكروغرام/100ملغم وزن طري من الكالس جدول (2) وشكل (2-B) في حين إن تركيزها في أوراق النبات المزروعة في الأصص بلغ 0.047 مايكروغرام /100ملغم غم وزن طري من الأوراق جدول(3) شكل (3).

المصادر

1. Aslam, J., Sheba, H. K., Zahid, H.S., Zohra, F., Mehpara, M. and Mukthar, A. (2010). *Catharanthus roseus* Don. L an Important DrugIT'S Applications and Production, Pharmacie Globale. (IJCP), 4 (12).
2. المنظمة العربية للتنمية الزراعية- جامعة الدول العربية. (1988). النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي، الخرطوم.
3. **3.** Jennifer, L.G. (2004). Increasing alkaloid production from *Catharanthus roseus* suspensions through methyl jasmonate elicitation .The official J.of ISPE . Vol.24(4): p6.
4. Taiz and Zeiger, E. (2006). Plant physiology. Sinaure Assciates, Inc. Publishers. Sunderland.
5. Davuluri, G.R., Tuinen, A.V. and Fraser, P.D. (2005). Fruit- specific RNAi - mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoidcontent in tomatoes. Nature Biotechnology. 23 (7): 890- 895.
6. Smith, J.I., Smart, N.S., Kurz,W.G.W. and Nisawa, M. (1987). Elicitors effect on secondary products. Planta Med. 53: 470-474
7. روزبه ياني، شيرين عبد الكريم امين. (2007). استحداث وتحفيز زيادة انتاج بعض نواتج الايض الثانوي في المزارع النسيجية لنبات الروجة *Hypericum performatum L*. اطروحة دكتوراه كلية العلوم. الجامعة المستنصرية. العراق.
8. Verma, A. K., Singh, R. R. and Seema, S. (2012)**.** Improved alkaloid content in callus culture of *Catharanthus roseus***.** Botanica SERBICA**.** vol. 36 (2):124.
9. Burger, A., Hetz, J-O. S., Rollinger, J. M., Weissnicht, A. A. and Stotner, H. (2000). behavior of the polymorphs Energy/temperature diagram and compression of *D*- mannitol. J. Pharm. Sci. 89, 457 –468.
10. فهمي، فكري جلال محمد. (2003). زراعة الانسجة النباتية –كلية الزراعة جامعة أسيوط.
11. Zhao, J., Hu, Q., Guo, Y. and Zhu, W. (2001). Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthus roseus*. 55(6): 8-693.
12. المرسومي، حيدر عماد رشيد. (2010). تأثير مكونات الوسط الغذائي والجزء النباتي المزروع في تكوين الكالس وانتاج بعض المركبات ذات الاستعمالات الطبية في نبات المريمية *Saliva officinalis* رسالة ماجستير قسم البستنة– كلية الزراعة – جامعة بغداد
13. Pa, R. and Mathew, L. (2012). The Effect of Eelicitors on the production of Vasicine from *Justicia adhatoda* L. Cell suspension cultures. Int J Pharm Sci Res. 3(10); 3923-3926.
14. Taha, H. S., El-Bahr, M. K. and Seif-El-Nasr, M.M. (2009). *In vitro* studies on Egyptian *Catharanthus roseus* (L.). Ii. Effect of Biotic and Abiotic stress on Indole Alkaloids Production. Journal of Applied Sciences Research. 5(10): 1826-1831.
15. جاسم، نورا جبر . (2011). انتاج بعض قلويدات التروبان من كالس نبات البلادونا L *Atropa belladonna* خارج الجسم الحي *In vitro* رساله ماجستير قسم البستنة – كلية الزراعة – جامعة بغداد.
16. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497
17. Tikhomtroff, C. and Jolicoeur, M. (2002). Screening of *Catharanthus roseus* secondary metabolite by HPLC, j Chromatogr A. 955:87-93.
18. الساهوكي ،مدحت ووهيب ،كريمة احمد .(1990) . تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب. وزاره التعليم العالي والبحث العلمي .العراق .
19. George , E. F., Hall, M. A. and Klerk, G. D. (2008). Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Published by spring. pp:1- 479.
20. محمد، عبد المطلب سيد. (1983). البناء الضوئي. جامعة الموصل. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي/ العراق.
21. Al-Khayri, J. M. and AL-Bahrany,A. M. (2002). Callus growth and proline accumulation in response to sorbitol and sucrose induced osmotic stressing rice. Biol. Plant, 45: 609-611.
22. Gautam, S., Mishra, A., Tiwari, A. (2011). Catharanthus Alkaloids And Their Enhanced Production Using Elicitors: A Rev. International Journal of Pharmacy&Technology. Rev. Vol. 3Issue No.1: 713-724.
23. Liu, X.N., Zhang, X.Q., Zhang, S.X. and Sun, S.S. (2007). Regulation of metabolite production by precursors and elicitors in liquid cultures of *Hypericum perforatum*. Plant Cell Tissuses. Organ Cult. 91:1-7.

24. Ebrahimzadeh, H., Ataei-Azimi, A., Noori-Daloi, M. (1996). The distribution of indole alkaloids in different organs of *Catharanthus roseus* L G. Don. *Vinca rosea* L, Daru, J. Sch. Pharm. 6(1&2): 11-24 Persian.