دراسة الصفات الشكلية والتباينات الجسمية الوراثية في مزارع الكالوس لنبات الونكا (*Catharanthus roseus* L.)

الدكتور: يوسف العموري[1]

الملخص

نُفذت التجربة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية في سورية، خلال الفترة 2019–2021، لمعرفة تأثير الإجهادات اللاإحيائية في الوزن الرطب والجاف للكالوس، والكشف عن التباينات الجسمية الوراثية الحاصلة في مزارع الكالوس المجهد حلولياً وملحياً ومقارنتها مع النبات المحلي والنبات النامي في الزجاج *In Vitro*، وذلك باستخدام تقنية التكرارات الترادفية البينية البسيطة ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) باستعمال 21 مرئسة. عُقمت البذور بمحلول هيبوكلوريد الصوديوم (0.5%) NaOCl، وزرعت على الوسط المغذي MS، وبعد نجاح الزراعات التأسيسية، نُقلت النبيتات إلى وسط الإكثار المدعم بالأكسينات NAA (1 مغ.ل$^{-1}$) والسيتوكينيات BA (2 مغ.ل$^{-1}$). تمّ استحداث الكالوس من أوراق نبات الونكا باستعمال وسط MS المدعم بكلٍ من NAA و Kin، وانتخبت أفضل توليفة هرمونية كشاهد لتجارب البحث اللاحقة. تمَّ تعريض الكالوس لمستوياتٍ متزايدة بشكل تدريجي من الإجهاد الحلولي المُصطنع بإضافة سكر البولي إيثيلين جلايكول PEG-6000، والملحي NaCl بواقع مستوى أعلى كل 35 يوماً. أظهرت النتائج أنَّ متوسط الوزن الرطب والجاف للكالوس الأدنى معنوياً في المعاملة NaCl mM 100 (3.047، 0.250 غ على التوالي)، وفي المعاملة – 0.4 Mpa (2.35، 0.18 غ على التوالي)، بينما كان الأعلى معنوياً في الشاهد (بدون إجهاد) (6.207، 0.483 غ). أثبتت نتائج الدراسة الجزيئية فعّالية جميع المرئسات المستعملة (21 مرئسة) في إعطاء تعددية شكلية بين العينات المدروسة، وأظهر التحليل العنقودي انفصال النبات النامي في الزجاج عن الكالوس الناتج عنه، مما يؤكد أن مزارع الكالوس مصدراً مهماً للاختلافات الوراثية وأن تقنية ISSR أداة فعالة للكشف عن هذه الاختلافات.

الكلمات المفتاحية: الونكا، الكالوس، كلور الصوديوم، البولي إتيلين غليكول، التباينات الجسمية، ISSR.

(1) عضو هيئة تدريسية في الجامعة السورية الخاصة، باحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

Study of Morphological characteristics and Somaclonal Variations in Callus Cultures of Madagascar Periwinkle *(Catharanthus roseus L.)*

Youssef AL-Ammouri (1)

Abstract

The research was carried out in the Syrian National Commission for Biotechnology, in order to study effect of some abiotic stresses on fresh and dry weight in callus cultures of *Catharanthus roseus*, in addition to estimate somaclonal variation among callus cultures that osmotic and salinity stressed compared with local plant and in vitro plant, by application Inter Simple Sequence Repeats technique (ISSR) using 21 primers. The seeds were sterilized by NaOCl solution (0.5%), then planted on MS medium. Plantlets were transferred to MS medium enriched with NAA (1 mg L^{-1}) and BA (2 mg L^{-1}). Then callus was initiated from leaves using MS medium containing NAA and Kin. The best hormonal combination was selected as a control for the later experiments. Callus was transferred to MS medium supplemented with PEG-6000 and NaCl in succession. The results showed that the fresh and dry weight of callus was significantly lower in 100mM NaCl treatment (3.047, 0.250 g respectively) and at the osmotic stress level of -0.4 Mpa (2.35 and 0.17 g respectively), while it was significantly higher in the control (6.207, 0.483 g respectively). The results of molecular study showed that effectiveness of all used primers (21 primers) in giving polymorphism among studied samples. Cluster analysis showed that separation the in vitro plant out of callus cultures, confirming the fact that callus culture is a source of genetic variations, and the ISSR technique can be used as an effective tool in the detection of such differences.

Keywords: *Catharanthus roseus*, callus, NaCl, PEG, Somaclonal variations, ISSR.

(1) Lecturer at Syrian Private University, Researcher in National Commission for Biothecnology, Damascus, Syria

1- المقدمة Introduction

يعد نبات الونكا (*Catharanthus roseus* L.) من أهم النباتات الطبية المعترف بها ضمن دساتير الأدوية العالمية، ينتمي هذا النبات إلى الفصيلة الدفلية Apocynaceae [1]، وينتشر في المناطق الدافئة من العالم، كما يتسم بالمقدرة على تحمل درجات الحرارة المرتفعة، ويُزرع كنباتٍ للزينة في الحدائق والمنتزهات لتنوع ألوان أزهاره (الأبيض، الزهري والبنفسجي) [2] [3].

يوجد في نبات الونكا مجموعة من القلويدات تصل إلى قرابة 130 قلوياً يتركز معظمها في الأوراق والجذور، وتتواجد النسبة الأكبر في الجذور، حيث تصل نسبتها إلى نحو 2-3%، وأهمها قلويدي الريزربين Reserpine، الذي يُستعمل كمهدئ، ولعلاج ضغط الدم المرتفع، والأجماليسين Ajmalicine، الذي يُستعمل لعلاج الأمراض المعدية [4]، وبالنسبة للأوراق، تمكّنت الدراسات الحديثة من تحديد المكونات الفعّالة فيها مثل مركب الفندولين Vindoline، الذي يُستعمل في علاج مرض السكري Diabetes، ومركبي الفنكرستين والفنبلاستين، اللذين يتواجدان بتركيز 0.0003%، 0.0004% من الوزن الجاف على التوالي [5]، ويُستعملان كمانعاتٍ للانقسام الخلوي، وبالتالي علاج العديد من أمراض السرطان، مثل سرطانات الغدد اللمفاوية Lymphoma، وسرطان الجلد Skin cancer، والثدي Breast cancer، والرئة Lung cancer وداء هودجكين Hodgkin's lymphoma، وسرطان الدم Leukemia، وبخاصة سرطان الدم عند الأطفال، كما يُستعمل لمعالجة العنانة Impotence عند الرجال، بسبب ماتحتويه من مركبات اليوهمبين Yohimbine [6].

إنّ الفعّالية الطبية لعددٍ كبيرٍ من المركبات القلويدية Alkolides في نبات الونكا (*C. roseus*)، وندرتها، وارتفاع قيمتها جعلها جديرة بالاهتمام خلال السنوات الأخيرة، إذْ تركز الاهتمام على التصنيع الحيوي لهذه المركبات بواسطة تقانات زراعة الخلايا والأنسجة النباتية، لإنتاج كمياتٍ أكبر منها، ونظراً لانخفاض تركيز القلويدات الإندولية في النباتات المزروعة، وبسبب وجود عددٍ كبير من القلويدات، فإنّ عملية استخلاص كلٍ من Vinblastine (VLB)، وVincristine (VCR) عادةً ما تكون مكلفة ومتعبة،

الأمر الذي دفع الباحثين إلى ضرورة العمل على استخلاص هذه المركبات القيّمة طبياً بكمياتٍ أكبر من خلال وسائل التقانات الحيوية الحديثة، مثل زراعة الأنسجة، التي تعتمد على نظرية القدرة الكلية الكامنة للخلية Totipotency، حيث توجد المعلومات الوراثية المطلوبة لتصنيع نواتج الاستقلاب الثانوية في هذه الخلايا غير المتمايزة Callus للأنواع المعنية بالدراسة، ويمكن بتفعيل هذه المورثات إنتاج نواتج الاستقلاب الثانوية المطلوبة .[7]

إنَّ تطبيق التقانات الحيوية في زراعة نبات الونكا، وبخاصةٍ مزارع الكالوس سيفضي إلى الحصول على طرزٍ وراثية جديدة للأنواع النباتية ذات الخصائص الجيدة، معتمدةً في ذلك على التباينات الجسمية الوراثية الحاصلة في التجمعات الخلوية المزروعة في الزجاج *In Vitro* [8]، كما أنَّ تطبيق هذه التقانات بوجود العامل المجهد في وسط النمو سيؤدي إلى تحسين التحمل للإجهادات اللاأحيائية، مع زيادةٍ في الكفاءة الإنتاجية لنواتج الاستقلاب الثانوية، حيث توصف تقانة مزارع الكالوس من التقانات المهمة بأنها مصدراً جديداً لنواتج الاستقلاب الثانوية، وللحصول على التباينات الجسمية (التباينات الوراثية) الضرورية في برامج التربية، إضافةً إلى دورها في إنتاج عدد كبير من النبيتات المخبرية [9]، واستخدم مصطلح التباينات الجسمية Somaclonal variation مؤشراً للدلالة على التغيرات التي تحدث في النباتات المتجددة من زراعة الأنسجة والخلايا النباتية، ومن المعروف أنّ مثل هذه التغيرات تحدث بكثرة عند عزل البروتوبلاست وزراعة الكالوس [10]. تصف التغيرات الجسمية التغيرات الوراثية وغير الوراثية التي تحدث في النباتات (اختلاف السمات الفيزيولوجية، والكيمياحيوية، والوراثية بين الخلايا النامية مخبرياً)، ومن الممكن ظهورها إمّا خلال أو بعد الزراعة المخبرية لخلايا النبات وأعضائه، أو الكالوس[11]، ويمكن الكشف عن هذه التباينات باستعمال إحدى طرق الواسمات الجزيئية، وتُعد تقنية التكرارات الترادفية البسيطة البينية (ISSR) من الطرق الفعّالة للكشف عن التباينات الجسمية الوراثية المتوقع حصولها نتيجة الحصول على الكالوس بوجود العامل المجهد أو عدمه، حيث تعد أداة مفيدة في كشف مثل هذه التباينات [12]، وقد استعملت للكشف عن التباين الوراثي في العديد من المحاصيل مثل البطاطا Potato

(*Solanum tuberosum*) [13]، والشعير Barley (*Hordeum vulgare*) [14]، وللكشف عن التباينات الجسمية بين مزارع الكالوس النامية في الزجاج بالمقارنة مع النبات الأم للعديد من النباتات الطبية كما في نبات البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus* [15].

قام Lal [16] بدراسةٍ هدفها معرفة التباينات الوراثية بين 9 أصناف من الونكا (C. roseus) باستعمال تقانات RAPD، وISSR، SSR، حيث استعمل في تقانة RAPD 20 بادئاً استطاعت 6 بادئات منها تشكيل حزم من DNA، حيث أعطت 592 حزمةً منها 466 حزمة تحمل تباينات وراثية، وبالتالي قُدّرت نسبة التباين بين الأصناف المدروسة بنحو 78.71%. في حين استعمل في تقانة ISSR 6 بادئات أعطت 3 منها 342 حزمة، منها 270 حزمة تحمل تباينات وراثية بنسبة 78.94%. وقد انخفضت نسبة التباينات الوراثية بتطبيق تقانة SSR، حيث استعملت 5 بادئات اثنتان منها أنتجت 241 حزمة منها 177 حزمة متباينة بنسبة 76.62%. وقد اعتبرت هذه الدراسة أنَّ جميع هذه التقانات فعّالة في كشف التباينات الوراثية على الرغم من تفوق تقانة ISSR في نسبة التباينات التي كشفتها.

2- أهداف البحث Objectives:

- دراسة بعض الصفات الشكلية لكالوس نبات الوتكا ومعرفة تأثير الإجهاد الملحي والحلولي على معدل نمو الكتلة الخلوية المتشكلة.
- دراسة التباينات الجسمية الوراثية Somaclonal variations الحاصلة في مزارع الكالوس لنبات الونكا، والمعرضة للعوامل المجهدة وغير المجهدة بالمقارنة مع النبات الأم باستعمال تقنية التكرارات الترادفية البسيطة البينية ISSR .

3- مواد البحث وطرائقه Materials and methods:

3-1 مكان تنفيذ البحث Site of experimentation: نُفذ البحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق، قسم التقانات الحيوية للنباتات الطبية خلال الفترة الممتدة 2019-2021.

2-3 المادة النباتية Plant material: تمَّ الحصول على بذور نوع الونكا (*C.roseus*) من شركة Syngenta flowers الهولندية.

3-3 تطهير البذور وتحضيرها للزرع: غُمرت كمية كافية من بذور نبات الونكا في الكحول الإيتيلي (70%) مدّة دقيقة واحدة، ثمّ عُقمت بمحلول هيبوكلوريد الصوديوم (NaOCl) باستعمال التركيز 0.5% لمدة 5 دقائق ثمّ غُسلت بعدها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرّات متتالية بمعدّل 5 دقائق في كل مرّة، وتركت مكشوفةً مدّة 30 دقيقة حتى جفت هوائياً وأصبحت جاهزة للزرع. وجرت عمليتا الغسيل النهائي والزرع في شروط تعقيم صارمة تحت جهاز العزل الجرثومي (Laminar airflow hood) من النوع JSCR-1200 SB.

زرعت البذور بمعدل بذرة واحدة في كل أنبوب، وذلك باستعمال وسط الزراعة الأولي MS الخالي من منظمات النمو، وحُضنت الأنابيب عند درجة حرارة 2± 24 مْ حتى إنبات البذور، ثمّ حُضنت النبيتات النامية بظروف 16 ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام بالتناوب، ثمّ أُعيدت زراعتها على وسط الإكثار حيث استعمل الوسط MS المدعم بهرموني BA Benzyl adinien (2 مغ.ل$^{-1}$)، و Naphthalene acetic acid NAA (1 مغ.ل$^{-1}$) للحصول على كميةٍ كافية من المادة النباتية اللازمة لتنفيذ تجارب استحداث الكالوس.

4-3 استحداث الكالوس: تمَّ استزراع أوراق نبات الونكا (*C.roseus*) على عدد من الأوساط المغذية المعتمدة على وسط MS والمدعم بمجموعة من الفيتامينات مثل ميوإينوزيتول (0.08 غ)، والكازئين (0.5 غ)، بالإضافة إلى عددٍ من منظمات النمو النباتية (NAA, Kin)، وفي نهاية هذه المرحلة تم انتخاب أفضل توليفة هرمونية لاستحداث ونمو الكالوس (1 مغ.ل$^{-1}$ NAA + 2 مغ.ل$^{-1}$ Kin) واعتبرت معاملة الكالوس الشاهد في تجارب البحث اللاحقة.

5-3 تطبيق الإجهاد على مزارع الكالوس: تمَّ تعريض الكالوس إلى مستوياتٍ متزايدة وبشكلٍ تدريجي من العامل المجهد (NaCl) (0، 25، 50، 75، 100 mM)، ومن

البولي إيثيلين جلايكول PEG-6000 (0، 0.2-، 0.3-، 0.4-، Mpa)، بواقع مستوى أعلى كل 35 يوماً.

3-6- دراسة التباينات الجسمية: تمّت دراسة التباينات الجسمية Somaclonal variations بين جميع العينات المدروسة، النبات المحلي، النبات الأم في الزجاج، الكالوس الشاهد، الكالوس المجهد ملحياً، والكالوس المجهد حلولياً، واستعملت تقنية ISSR كتقنيةٍ لا تتطلب جهوداً كبيرةً وغير مكلفة، ونُفذت دراسة هذه التباينات باتباع الخطوات الآتية [17]:

3-6-1- عزل DNA بطريقة CTAB (Ctyle Trimethyl Ammonium Bromide):

وضع قرابة 200 ملغ من المادة النباتية المجمدة والمطحونة في الآزوت السائل لجميع العينات المدروسة (النبات المحلي، النبات الأم في الزجاج، الكالوس الشاهد، الكالوس المجهد ملحياًوحلولياً) في إنبوب إبندورف سعة 2 مل. وأُضيف 750 ميكرو لتر من محلول الاستخلاص CTAB المسخن مسبقاً على درجة حرارة 65 م°، وحرك المزيج جيداً، ويتكون محلول الاستخلاص من المواد التالية:

(2% w/v) CTAB + 100 mM Tris-Hcl (PH=8) + 1.4 M NaCl + 20 mM EDTA (PH=8) + 0.2% mercaptoethanol (v/v).

ثمّ وضعت الأنابيب في حمام مائي على درجة حرارة 65 م° مدّة ساعة مع التحريك بالتقليب كل 15 دقيقة. ثمّ بُردت الأنابيب على درجة حرارة الغرفة مدّة 5 دقاق. وأُضيف 750 µL من الكلوروفورم إيزوميل الكحول بنسبة (1:24) ثمّ حرك المزيج جيداً بالتقليب حتى تشكّل الرغوة (قرابة 5 دقائق) لإزالة البروتينات والليبيدات. وثُفلت الأنابيب بجهاز الطرد المركزي من نوع Heraeus على سرعة (12000 rpm) مدّة 10 دقائق على درجة حرارة 4 م°، تمَّ في هذه المرحلة فصل المزيج إلى ثلاث أطوار، نُقل الطور المائي (الطبقة العليا) الناتج إلى أنبوب جديد، وأضيف (3/2) حجمه أيزوبروبانول Isopropanol مبرد (20- مْ) مع التحريك بلطف حتى ترسب DNA. وحُضن بالبراد على +4 م° لليوم التالي أو على −20 م° مدّة ساعة لترسيب DNA. وتُركت بعدها العينات لتذوب في حرارة الغرفة، ثمّ ثفلت الأنابيب بجهاز الطرد المركزي على سرعة

(12000 rpm) مدة 5 دقائق على درجة حرارة 4 م°. وتمّ التخلص من الرشاحة وأضيف 1 مل من محلول الغسيل Washing buffer (كحول إيتلي 70%) البارد المحفوظ بدرجة −20 مْ لراسب DNA، وحرك بلطف بالتقليب عدة مرات. ثمّ ثُفلت الأنابيب عند سرعة (10000 rpm) مدّة 5 دقائق على درجة حرارة 4 م°. وأُعيدت عملية الغسيل والتثفيل، ثمّ تمّ التخلص من محلول الغسيل، وجفف راسب DNA في حرارة الغرفة مدّة 30 دقيقة. ثمّ أُذيبت عينات DNA في 100 µl من محلول TE.

3−6−2− التقدير الكمي والنوعي للحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA:

استخدم جهاز (UV Spectrophotometer) نوع Hitachi U2900 لتقدير كمية DNA وتحديد نقاوته عند طول موجتي 260 و280 نانو متر [18] ، وحُسب تركيز DNA من المعادلة الرياضية الآتية [18]:

DNA concentration (µg/ml)= OD260 * معامل التمديد * 50 (ug/ml)

ثمّ مُددت عينات DNA للحصول على تركيز 50 ng.µl-1، كما تمّ التقدير النوعي على هلامة الأغاروز (0.8%)، إذْ يظهر الـ DNA ذو النوعية الجيدة على شكل حزمة Band بينما يكون DNA السيّيء النوعية ممشحاً وغير واضح الحدود Smear.

3−6−3− تضخيم الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA:

تمّ تضخيم DNA من خلال تفاعل بوليميراز التسلسلي (PCR) [19]، مع بعض التعديلات ليكون حجم التفاعل النهائي (25 µl)، يتكون من 2 µl من DNA بتركيز (50 ng.µl-1) لكل عينة، و 12.5 µl Master Mix (Kapa) و 1.25 µl من المرئسة بتركيز(10 pmol.µl-1)، ثمّ أكمل الحجم إلى 25 µl بالماء المقطر المعقم، وأُجري تفاعل الـ PCR باستعمال Kapa 2G fast ready Mix PCR kit وفق تعليمات الشركة المُصنّعة، ثمّ فصلت حزم الـ DNA بعد ذلك بالترحيل على هلامة الأغاروز (2%) في محلول TBE 1X [18].

3−6−4− تطبيق تقنية ISSR: تمَّ اختبار مجموعة من المرئسات من شركة BioNeer لدراسة التغيرات الوراثية والتباينات الجسمية الحاصلة في مزارع الكالوس، حُسبت بعدها نسبة التعددية الشكلية للمرئسات المستخدمة (الجدول، 1)، ورسمت شجرة القرابة الوراثية.

الجدول رقم (1): المرئسات المستعملة في تقنية ISSR ودرجة حرارة التحامها.

المرئسة	التسلسل النيوكليوتيدي	درجة حرارة الالتحام (مْ)	المرئسة	التسلسل النيوكليوتيدي	درجة حرارة الالتحام (مْ)
A1	(CT)8TG	48.7	L12	(CAC)3GC	38
B2	(CT)8AC	47.7	M13	(GAG)3GC	38
C3	(CT)8GC	51.5	N14	(CTC)3GC	38
D4	(CA)6AC	42	P15	(GTG)3GC	38
E5	(CA)6GT	42	Q16	(GT)8C	52.3
F6	(CA)6AG	42	R17	(AC)8G	54.3
G7	(CA)6GG	44	S18	(AGG)6	57.2
H8	(GA)6GG	44	T19	(GA)9T	50
I9	(GT)6GG	44	U20	(GACA)4	47.9
J10	(GA)6CC	44	V21	T(GA)9	51.4
K11	(GT)6CC	44			

3-6-5- الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير: تمّ الترحيل على هلامة الأغاروز 2% في جهاز رحلان أفقي (Agarose Ultrapure Fingerprinting USA) بمرور حقل كهربائي قدره 90 فولت مدّة ساعتين وذلك لفصل حزم DNA الناتجة عن التضخيم، وباستخدام مؤشر الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (DNA marker -100 bp)، وذلك لتحديد الحجم الجزيئي للحزم الناتجة ليتم بعد ذلك الترحيل، ثم صورت الهلامة بجهاز تصوير هلامة الأغاروز Imag Analyzer (Agle Eye II taratagen).

3-7- التحليل الاحصائي statistical analysis:

نُفذت التجارب باستعمال التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (CRD)، وحُللت نتائج جميع التجارب باستثناء الدراسة الجزيئية باستخدام البرنامج الاحصائي Mstat -c، وقورنت المتوسطات حسب اختبار أقل فرق معنوي L.S.D عند مستوى معنوية 0.01. واستعمل برنامج Total

lab لتحليل نتائج الدراسة الجزيئية، حيث جُمعت نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب حزم DNA بين العينات. ودرست التباينات الجسمية بين الكالوس والنبات الأم باستعمال معامل Jaccard، ثمّ رسمت شجرة القرابة الوراثية Dendogram بتطبيق طريقة متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging) باستعمال برنامج Power marker.

4- النتائج والمناقشة Results and disscution:

4-1- الوصف الشكلي للكالوس الناتج على وسط MS الشاهد:

امتاز كالوس نبات الونكا (*C.roseus*) النامي في الأوساط المغذية المدروسة بقوامٍ متماسك إلى نصف متماسك، وذلك تبعاً للتوليفة الهرمونية المستعلمة في وسط النمو، وقد تدرج لون الكالوس بين اللون الأبيض الكريمي واللون الأصفر. عموماً، يمكن القول إنَّ قوام الكالوس كان متماسكاً وذي مظهرٍ حبيبي مرغوب على معظم الأوساط المغذية المدروسة، في حين تراوحت نسبة التماوت بين 8% كحدٍ أدنى و 17% كحدٍ أعلى.

يتصف الكالوس جيد النمو والمرغوب بالشكل الحبيبي المترافق مع القوام المتماسك صعب التفتت واللون الكريمي الفاتح، أما تدرج لون الكالوس من الكريمي إلى البني واسمرار الأنسجة النباتية يعود بشكلٍ رئيس إلى تراكم بعض نواتج الاستقلاب الثانوية عموماً، والفينولات خصوصاً في وسط الزراعة [20]، نتيجة نشاط بعض الأنزيمات مثل البولي فينول أوكسيداز Polyphenoloxidae (PPO)، والبيروكسيداز (POD) Peroxidase التي تُشارك في تحفيز أكسدة المركبات الفينولية واسمرار الأنسجة النباتية. انتخبت في نهاية هذه المرحلة التوليفة الهرمونية (1 مغ.ل-1 NAA + 2 مغ.ل-1 Kin) كأفضل توليفة لاستحداث الكالوس بناءاً على مئشرات النمو والكتلة الخلوية المتشكلة واعتبرت شاهداً في التجارب اللاحقة.

الجدول رقم (2): التوصيف الشكلي للكالوس الناتج على أوساط الاستحداث .

رقم الوسط	منظمات النمو مغ.ل-1		لون الكالوس	قوام الكالوس	قوة النمو	نسبة التماوت %
	NAA	BA				
MS1	0	0	أبيض كريمي	متماسك	++	14
MS2	0.1	0	أصفر	متماسك	++	17
MS3	0.5	0	أبيض كريمي	متماسك	++	12
MS4	1	0	أبيض كريمي	متماسك	++	10
MS5	0	1	أبيض كريمي	متماسك	++	13
MS6	0.1	1	أصفر	متماسك	++	12
MS7	0.5	1	أبيض كريمي	متماسك	+++	10
MS8	1	1	أبيض كريمي	متماسك	+++	8
MS9	0	2	أصفر	متماسك	++	13
MS10	0.1	2	أصفر	متماسك	++	13
MS11	0.5	2	أصفر	متماسك	++	11
MS12	1	2	أبيض	متماسك	++	12

+ نمو ضعيف، ++ نمو متوسط، +++ نمو جيد.

4-2- تأثير الإجهادين الملحي والحلولي في الوزن الرطب والجاف للكالوس:

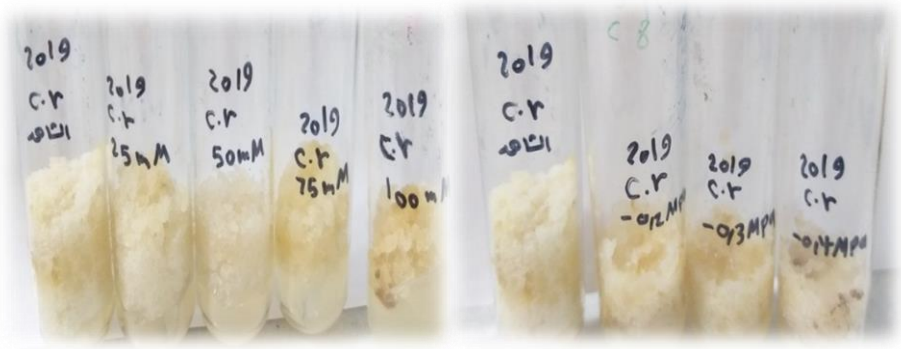
بيّنت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاتٍ معنوية في متوسط الوزنين الرطب والجاف للكالوس بين المعاملات المدروسة، حيث كان متوسط الوزن الرطب والجاف للكالوس الأدنى معنوياً في معاملة الإجهاد الحلولي -0.4 Mpa (2.35، 0.18 غ على التوالي) بالمقارنة مع الشاهد (6.207، 0.483 غ على التوالي). وكان متوسط الوزن الرطب الأدنى معنوياً في معاملة الإجهاد الملحي 100 NaCl Mm (3.047غ)، بالمقارنة مع الشاهد (6.207 غ)، في حين كان الوزن الجاف الأدنى معنوياً في المعاملتين 100 و75 Mm (0.250، 0.277 غ على التوالي) بالمقارنة مع المعاملة الشاهد (0.483غ) (الجدول، 3). عموماً، تؤدي إضافة العامل المجهد لوسط النمو إلى تثبيط استطالة الخلايا وانقسامها، الأمر الذي يؤثر سلباً في معدّل نمو خلايا الكالوس، سواءً من خلال التأثير الحلولي لكلٍ من الإجهاد الحلولي والملحي، حيث تعمل جزيئات

البولي إتيلين غلايكول (PEG-6000)، وجزيئات الملح على مسك جزيئات الماء، مقللّةً بذلك من عدد جزيئات الماء الحرة والمتاحة للامتصاص من قبل خلايا الكالوس، الأمر الذي يؤثر سلباً في ضغط الامتلاء، الذي يُعد بمنزلة القوة الفيزيائية التي تدفع جدر الخلايا النباتية على الاستطالة، أو نتيجة التأثير السمي الأيوني لشاردتي الصوديوم والكلور في معاملة الإجهاد الملحي [21]. تتفق هذه النتائج مع نتائج الحجيمي وعبد الحسين [22]، حيث أظهرت نتائجهما تناقصاً في الوزنين الرطب والجاف لكالوس نبات *C.roseus* عند إضافة ملح كلور الصوديوم إلى وسط النمو، في حين لم تتفق مع ما توصل إليه [23]، الذين لاحظوا زيادة الوزنين الرطب والجاف تحت ظروف الإجهاد الملحي عند المستويات الملحية المنخفضة نسبياً (0، 25، 50، 100 Mm NaCl)، وبدأ الانخفاض عند التركيز الأعلى (200 Mm) بالمقارنة مع الشاهد. ويُعد انخفاض معدّل النمو بتأثير الإجهادات نوعاً من أنواع التأقلم للبقاء على قيد الحياة، وتتجه الخلايا نحو زيادة معدّل إنتاج مستقلبات النمو الثانوية وتراكمها بوصفها وسائلَ دفاعية على حساب معدّل النمو.

الجدول رقم (3): تأثير الإجهاد الملحي والحلولي في الوزنين الرطب والجاف لكالوس نبات الونكا.

الإجهاد الحلولي (Mpa)	الوزن الجاف (غ)	الوزن الرطب (غ)	الإجهاد الملحي (mM NaCl)	الوزن الجاف (غ)	الوزن الرطب (غ)
الشاهد	0.483^{a}	6.207^{a}	الشاهد	0.483^{a}	6.207^{a}
0.2 -	0.28^{b}	3.19^{b}	25	0.417^{b}	5.140^{b}
0.3 -	0.23^{c}	2.86^{bc}	50	0.323^{c}	4.060^{c}
0.4 -	0.18^{d}	2.35^{c}	75	0.277^{d}	3.563^{d}
المتوسط	0.298	3.652	100	0.250^{d}	3.047^{e}
			المتوسط	0.361	4.403
LSD (0.01)	0.030	0.524	LSD (0.01)	0.0274	0.287
CV (%)	6.74	6.57	CV (%)	3.48	2.36

ُشير الأحرف المتماثلة على مستوى الأعمدة إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية 0.01.



الشكل رقم (1): تأثير الإجهادين الملحي والحلولي في الوزن الرطب للكالوس.

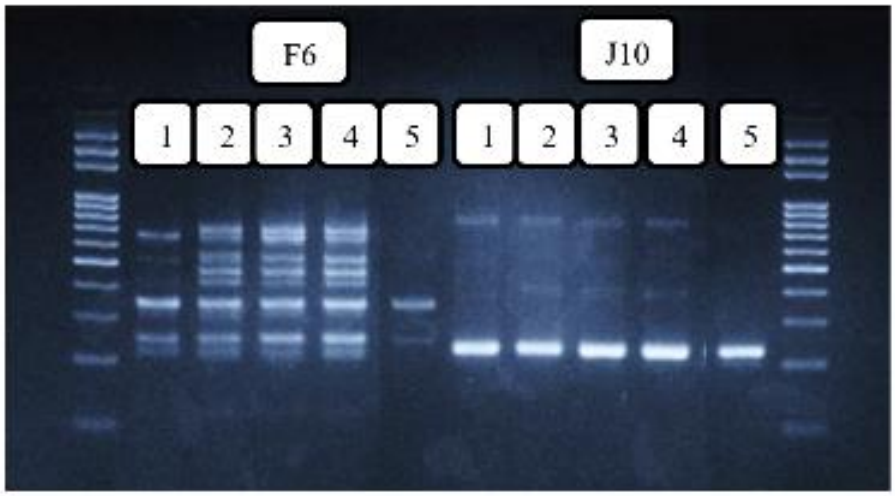
4-3- الدراسة الجزيئية Molecular study

4-3-1- التحديد الكمي والنوعي للـ DNA: قيس تركيز ونقاوة الـDNA المستخلص من 200 مغ من الكتلة الخلوية لكالوس نبات الونكا *C.* roseus الشاهد والمجهد ملحياً وحلولياً، والنبات المحلي، والنبات النامي في الزجاج *In Vitro* (بعمر 30 يوماً) بجهاز المطياف الضوئي (UV-Spectro-photometer)، حيث تراوحت التراكيز بين 357و 665 µg.µL-1، وتراوحت نقاوة العينات بين 1.75 و 1.88، ومُدد تركيز DNA ليصبح 50 µL.ng-1، وعند تطبيق عملية الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز بتركيز 0.8% لمعرفة نوعية DNA المستخدم، ظهر الدنا DNA بشكل حزمة واضحة وغير متقطع.

4-3-2- التعددية الشكلية Polymorphism الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR:

تضمّنت الدراسة الجزيئية استعمال 21 مرئسة، أثبتت جميعها فعّاليتها في إعطاء التعددية الشكلية بين العينات المدروسة (الجدول، 4)، حيث نتج عن استعمال هذه المرئسات نحو 140 حزمة، تراوح عدد الحزم بين 3 حزم للمرئسات (I9، M13، Q16) كحدٍ أدنى، و11 حزمة كحدٍ أعلى في المرئسة (T19)، بمتوسط قدره 6.67 حزمة لكل مرئسة. بلغ عدد الحزم ذات التعددية الشكلية Polymorphic قرابة 127 حزمة، تروح عدد الحزم المتعددة شكلياً بين 3 حزم للمرئسات (I9، M13، Q16) كحدٍ أدنى، و10

حزم للمرئستين (T19، A1)، بمتوسط قدره 6.05 لكل مرئسة، وبنسبة تعددية شكلية وصلت إلى 91.82%، أقلّها في المرئسة H8 (62.50%)، وأعلاها في المرئسات A1، B2 ، D4، I9، J10، L12، M13، N14، P15، Q16، S18، U20، إذْ وصلت إلى 100%.



الشكل رقم 2: ترحيل نواتج PCR مع المرئستين F6 و J10 وبوجود DNA Marker + 1000bp على هلامة أغاروز 2%.
الماركر من الأسفل للأعلى
(100، 200، 300، 400، 500، 600، 700، 800، 900، 1000، 1500، 2000، 3000 bp)

بلغ مجموع عدد الحزم الكلية 140 (93، 99، 100، 90، 29 حزمة) في كلٍ من: النبات المحلي *In vivo*، النبات الأم في الزجاج *In Vitro*، الكالوس الشاهد، الكالوس المجهد ملحياً، والكالوس المجهد حلولياً على التوالي، أمّا عدد الحزم ذات التعددية الشكلية فقد بلغ 91، 95، 97، 87، 22 حزمة في كلٍ من: النبات المحلي *In vivo*، النبات الأم في الزجاج *In Vitro*، الكالوس الشاهد، الكالوس المجهد ملحياً، والكالوس المجهد حلولياً على التوالي، كما يُلاحظ أنّ أعلى نسبة تعددية شكلية كانت في النبات المحلي (97.85%)، تلاها مباشرةً الكالوس غير المجهد بنسبة 97%، في حين بلغت نسبة

التعددية الشكلية في الكالوس المجهد ملحياً قرابة 96.67%، وفي الكالوس المجهد حلولياً نحو 75.86%، بينما كانت في النبات النامي في الزجاج *In Vitro* قرابة 95.96%.

الجدول رقم (4): عدد الحزم الناتجة وعدد الحزم الكلي وعدد الحزم المتعددة شكلياً والنسبة المئوية للتعددية الشكلية.

المرئسة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتعددة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية	النبات المحلي	النبات الأم في الزجاج	الكالوس الشاهد	الكالوس المجهد ملحياً	الكالوس المجهد حلولياً	المجموع
A1	10	10	100.00	8	6	7	6	2	29
B2	6	6	100.00	5	5	5	3	0	18
C3	8	7	87.50	3	7	7	5	1	23
D4	6	6	100.00	2	2	4	4	2	14
E5	8	8	100.00	6	6	4	4	1	21
F6	9	7	77.78	6	9	9	7	2	33
G7	9	7	77.78	6	9	9	7	2	33
H8	8	5	62.50	8	7	7	8	3	33
I9	3	3	100.00	1	3	2	2	0	8
J10	4	3	75.00	2	3	3	3	1	12
K11	10	9	90.00	9	6	7	7	1	30
L12	8	8	100.00	8	4	5	3	0	20
M13	3	3	100.00	1	3	3	3	0	10
N14	4	4	100.00	3	3	3	2	0	11
P15	6	6	100.00	4	4	5	4	0	17
Q16	3	3	100.00	2	2	2	3	0	9
R17	6	5	83.33	5	4	4	4	1	18
S18	5	5	100.00	1	2	1	3	3	10
T19	11	10	90.91	5	5	4	6	3	23
U20	7	7	100.00	4	5	5	3	3	20
V21	6	5	83.33	4	4	4	3	4	19
المجموع	140	127	-	93	99	100	90	29	411
المتوسط	6.67	6.05	91.82	4.43	4.71	4.76	4.29	1.38	
عدد الحزم ذات التعددية الشكلية	-	-	-	91	95	97	87	22	392
% للتعددية الشكلية			-	97.85	95.96	97.00	96.67	75.86	95.38

كما بينت النتائج وجود بعض المرئسات التي امتلكت المقدرة على تمييز التغيرات الوراثية بين النبات الأم والكالوس، وذلك من خلال وجود العديد من الحزم الفريدة سواءً الموجبة

منها أم السالبة (الغائبة)، ووصل عدد الحزم الفريدة إلى 71 حزمة، تراوحت بين 6 حزم في المرئسة A1، وحزمة واحدة في المرئسة M13.

ويُلاحظ من الجدول (5) وجود اختلافات في عدد الحزم الفريدة سواءً الموجبة أو السالبة بين العينات المدروسة، حيث لوحظ وجود أكبر عدد من الحزم الفريدة الموجبة في الكالوس المجهد ملحياً (11 حزمة)، وأقلّها في الكالوس غير المجهد (3 حزمة). أما بالنسبة إلى الحزم الفريدة السالبة، لوحظ عدم وجود أية حزم غائبة في النبات الأم (0 حزمة)، بينما وصلت إلى 41 حزمة في الكالوس المجهد حلولياً، وهذا يدل على التغير الوراثي الحاصل سواءً على مستوى الكالوس أو على مستوى الكالوس المعرّض للعامل المجهد، حيث استطاعت المرئسات المستعملة الكشف عنه.

الجدول رقم (5): عدد الحزم الفريدة في العينات المدروسة.

المرئسة	عدد الحزم الفريدة		المجموع
	الموجبة	السالبة (الغائبة)	
النبات المحلي	6	0	6
النبات الأم في الزجاج	4	1	5
الكالوس الشاهد	1	0	1
الكالوس المجهد ملحياً	11	2	13
الكالوس المجهد حلولياً	5	41	46
المجموع	27	44	71
المجموع الكلي	71		

وعند تطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement Values(PDV) (الجدول، 6)، حيث يدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود اختلاف وراثي ويزداد بازديادها التباين الوراثي، فقد تراوحت أقل قيمة لمعامل Jaccard 0.1402 بين النبات الأم في الزجاج *In vitro* والكالوس الناتج عنه، ما يعني أنّهما الأكثر تشابهاً وراثياً، بينما كانت أعلى قيمة نحو 0.8364 بين النبات الأم في الزجاج In Vitro والكالوس المجهد حلولياً، ما يدل على أنّهما الأبعد وراثياً.

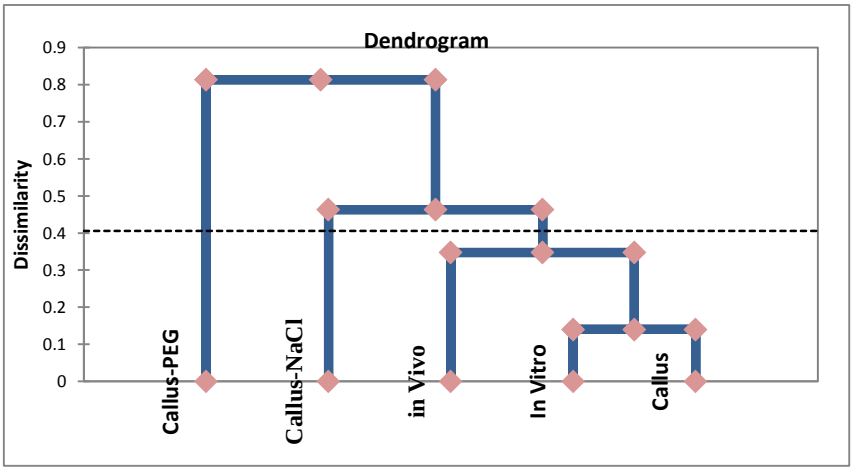
الجدول رقم (6): مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق PDV بين النبات المحلي والنبات الأم في الزجاج وكالوس نبات الونكا *C. roseus* استناداً إلى معامل Jaccard .

	النبات المحلي	النبات الأم في الزجاج	الكالوس غير المجهد	الكالوس المجهد ملحياً	الكالوس المجهد حلولياً
النبات المحلي	**0**				
النبات الأم في الزجاج	**0.3590**	**0**			
الكالوس غير المجهد	**0.3362**	**0.1402**	**0**		
الكالوس المجهد ملحياً	**0.4359**	**0.5118**	**0.4426**	**0**	
الكالوس المجهد حلولياً	**0.8155**	**0.8364**	**0.8165**	**0.7857**	**0**

يُلاحظ وجود اختلافات وراثية بين النبات المحلي والنبات الأم في الزجاج والكالوس الناتج عنه، وذلك لأنَّ خلايا الكالوس فقدت صفة التمايز وعادت للحالة المنقسمة المريستيمية غير المتمايزة، فأصبحت تختلف عن النبات النامي في الزجاج مورفولوجياً (شكلياً)، وفيزيولوجياً ووراثياً [24]، تتفق هذه النتائج مع نتائج Ikeuchi [24] التي تؤكد اختلاف أنواع مزارع الكالوس وراثياً والعائدة للنبات نفسه، وذلك لأنَّ عملية تنشئة الكالوس تتضمن تغييرات هائلة في التعبير المورثي نتيجة لتغير مستوى تمايز الخلايا وفقد التمايز بعد التحول إلى الحالة المريستيمية (غير المتمايزة) المنقسمة [25]، مما يؤكد أنَّ خاصية التباينات الوراثية في مزارع الكالوس Callus Cultures محدودة بالتفاعل ما بين البيئة والتركيب الوراثي، حيث تُعزى هذه التباينات إلى مجموعةٍ من الآليات أهمها تغيرات في مثيلة عدد من تتاليات الـ DNA، تغير في كمية المخزون الوراثي ونمط توزيعه على الصبغيات، إطلاق المادة الوراثية خارج حدود الخلايا أو ما يُعرف بالقذف، تبادل المادة الوراثية بين الخلايا، فقد كمية كبيرة من الـ DNA النووي (خاصة في الخلايا متعددة الصيغة الصبغية حيث يحدث نقص بعدد الصبغيات أو الكروماتينات) [26].

4-3-3- التحليل العنقودي Cluster Analysis للخطوط الخلوية Cellular Lines لكالوس نبات الونكا C.roseus والنبات المحلي In Vivo والنبات الأم في الزجاج In Vitro:

يظهر التحليل العنقودي انفصال العينات المدروسة حسب درجة تشابهها الوراثي، حيث انفصلت العينات إلى عنقودين أساسيين، احتوى العنقود الأوّل الكالوس المجهد حلولياً، في عنقود منفصل وكان الأبعد وراثياً عن العينات الأخرى بمسافة قدرها 0.84، في حين انفصل العنقود الثاني إلى تحت عنقودين، ضمَّ تحت العنقود الأوّل الكالوس المجهد ملحياً إذْ انفصل بمسافة وراثية قدرها 0.46، بينما ضمَّ تحت العنقود الثاني النبات المحلي *In Vivo* والذي انفصل بمسافة وراثية قدرها 0.36، والنبات الأم في الزجاج *In Vitro*، والكالوس غير المجهد حيث كانا الأقرب إلى بعضهما وراثياً بمسافة قدرها 0.14 (الشكل، 3).



الشكل رقم (3): شجرة القرابة الوراثية للعينات المدروسة الناتج عن تطبيق تقنية ISSR.

يُلاحظ من خلال التحليل العنقودي وجود اختلافات وراثية بين نبات الونكا الذي تنتشر زراعته في البيئة المحلية وبين النبات النامي في الزجاج، الذي كان مصدره البذور المستوردة من شركة Syngenta flowers، وهذا يؤكد ضرورة استعمال البذور من

مصدر موثوق لضمان النقاوة الوراثيّة للصنف المطلوب تنفيذ الدراسات عليه. كما يُلاحظ حدوث اختلافات وراثية بين النبات الأم في الزجاج وبين الكالوس الناتج عنه. ما يؤكد على أهمية مزارع الكالوس بوصفها مصدراً مهماً للاختلافات الوراثية وفعّالية تقانة ISSR في كشف هذه الاختلافات، وأنّ تقانة زراعة الكالوس هي تقانة مفيدة في عمليات الانتخاب الخلوي للوصول إلى سلالاتٍ خلوية يمكن أن تكون مرتفعة الإنتاجية من المواد الفعّالة حيوياً. تتوافق هذه النتائج مع نتائج [27] في دراستهم التي تناولت التباينات الوراثية المُحرّضة بزراعة الأنسجة لأنواع الجنتيانا *Gentiana spp*، كما تتوافق هذه النتائج أيضاً مع ما توصلت إليه [15]، حيث أظهرت دراساتهم على نبات البنج الذهبي (*H. aureus*) حدوث تغيرات وراثية بين النبات النامي في الزجاج والكالوس الناتج عنه، حيث انفصل الكالوس بمسافة قدرها 0.33 عن النبات الأم. وقد ذكر Wang [28] أنّ الإجهادات اللاأحيائية تؤثر في الصفات المورفولوجية (الشكلية)، والفيزيولوجية، والكيميائية، والجزيئية، كما تؤثر سلباً في النمو والإنتاجية. بالإضافة إلى العديد من الدراسات التي تحدثت عن الضرر الذي تحدثه الجذور الحرة الناتجة عن الإجهادات اللاأحيائية على المستوى الخلوي [29] [30] [31]، وجاءت هذه الدراسة متوافقة مع نتائج Saputro [32] الذين بيّنوا تأثير الوسط الملحي في إحداث تغيرات وراثية في الكالوس المستحدث من أوراق محصول الذرة الصفراء Corn (*Zea mays* L.).

5-الاستنتاجات والتوصيات:

- امتاز الكالوس بقوامٍ متماسكٍ وذي مظهرٍ حبيبي مرغوب ولون أبيض كريمي على معظم الأوساط المغذية المدروسة.
- تُقلل الإجهادات اللاأحيائية مثل الملوحة والإجهاد الحلولي من معدّل نمو الكالوس لنبات الونكا وتؤثر سلباً في معدّل النمو بزيادة شدّة الإجهاد.
- تقانة مزارع الكالوس مصدراً مهماً للتباينات الوراثية التي يمكن استغلالها في انتخاب خطوط خلوية ذات مورثات مسؤولة عن صفات محددة ومستهدفة.
- أظهرت تقانة ISSR فعّالية في الكشف عن التباينات الوراثية الموجودة بين العينات المدروسة بالاعتماد على نتائج (21) مرئسة نتج عنها ما مجموعه (140) حزمة حيث كانت نسبة التعددية الشكلية 91.82%.
- أظهر التحليل العنقودي وشجرة القرابة الوراثية وجود اختلافات وراثية بين العينات المدروسة وانفصالها إلى عنقودين رئيسيين.
- اظهرت المرئسات المستعملة القدرة على تمييز التغيرات الوراثية بين النبات الأم والكالوس، وذلك من خلال وجود العديد من الحزم الفريدة الموجبة (27 حزمة)، والسالبة (44 حزمة).
- سبّبت إضافة العامل المجهد إلى وسط الزراعة تغيرات وراثية بين الكالوس غير المجهد والكالوس المجهد ملحياً وحلولياً.
- نوصي بالتوجه لاستثمار تقنية مزارع الكالوس Callus culture كبديلٍ عن النبات الكامل للحصول على المركبات البيولوجية الفعّالة وكمصدر للتباينات الوراثية، دون التعرض للنبات أو إلحاق الأذى ببيئة نموه.
- الاعتماد على تقنية ISSR التي أعطت نسبة مرتفعة من التعددية الشكلية في تقييم التباينات الوراثية.
- تحديد مواقع المورثات للصفات الشكلية، والفيزيولوجية، والبيوكيميائية المرتبطة بتحسين مستوى التحمل، وزيادة كفاءة إنتاج القلويدات، وبخاصةٍ الفنكرستين والفنبلاستين.

6-المراجع References

1- YANG, L., WEN, K. S., RUAN, X., ZHAO, Y. X., WEI, F., & WANG, Q. 2018- Response of plant secondary metabolites to environmental factors. Molecules, 23(4): 762.

2- MISHRA, J. A., VERMA, N. A., 2017- A brief study on *Catharanthus Roseus*: A review. Int. J. Res. Pharm. Sci, 2(2): 20-23 .

3- DUBEY, A., TIWARI, D., SRIVASTAVA, K., PRAKASH, O., & KUSHWAHA, R. 2020- A discussion on vinca plant. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. *9*(5): 27-31.

4- KARTHIKEYAN, B., JOE, M. M., JALEEL, C. A., & DEIVEEKASUNDARAM, M. 2010- Effect of root inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on plant growth, alkaloid content and nutrient control of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Natura Croatica, 19(1): 205.

5- ATAEI-AZIMI, A., HASHEMLOIAN, B. D., EBRAHIMZADEH, H., & MAJD, A. 2008- High in vitro production of ant-canceric indole alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus*) tissue culture. African Journal of Biotechnology, 7(16).

6- SANDEEP, P., JAGJIT, K., RAMAN, K., & KULDEEP, K. 2014- *Catharanthus roseus*: a medicinal plant with potent anti-tumor properties. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. *5*(6): 652-656.

7- EVANS, W. C. 2002- Trease and Evans' Pharmacognosy. 15 th edition, W. B.Sauders Company Ltd. Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto

8- KUNAKH, V. A. 2005- Biotechnology of medical plants. Genetic, physiological and biochemical basis.–Kyiv: Logos:730.

9- HAQUE, A. U., SAMAD, M. E., & SHAPLA, T. L. 2009- In vitro callus initiation and regeneration of potato. Bangladesh Journal of Agricultural Research, 34(3): 449-456.

10- NISTOR, A., GH, C.; NICOLETA, C and DIANA, K. 2009- Effect of auxine and cytokinine on callus induction in potato (*Solanum tuberosum* l.) explants. Agricultura -Ştiinţă şi practică. 1(2), 69-7.

11- KAEPPLER, S. M., KAEPPLER, H. F., & RHEE, Y. 2000- Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant gene silencing. 59-68.

12- LEROY, X. J., & LEON, K. 2000- A rapid method for detection of plant genomic instability using unanchored-microsatellite primers. Plant Molecular Biology Reporter, *18*(3), 283-283.

13- BOMET, B., GORAGUER, R., JOLY, G., & BRANCHARD, M. 2002- Genetic diversity in European and Argentinean cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. tuberosum) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Genome, 45: 481-484.

14- FERNÁNDEZ, M.E., FIGUEIRAS, A.M., BENITO, C. 2002- The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theoretical and Applied Genetics. 104: 845–851.

15- BESHER, S.; YAQOUB, R.; Al-AMMOURI, Y. 2019- Chemical, Cellular and molecular study for tropane alkaloids production in callus cultures of Golden Henbane (*Hyoscyamus aureus*). PhD thesis, Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Damascus University, PP:175.

16- LAL, S., MISTRY, K. N., SHAH, S. D., THAKER, R., & VAIDYA, P. B. 2011- Genetic diversity assessment in nine cultivars of *Catharanthus roseus* from Central Gujarat (India) through RAPD, ISSR and SSR markers. Journal of Biological Research, 1(8), 667-675.

17- DOYLE, J. J and DOYLE. J. L. 1990- Isolation of plant DNA from fresh tissue, Focus. 12:13-15.

18- SAMBROOK, J., FRITSH, E. & MANIATIS, T. 1989- Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

19- WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., & TINGEY, S. V. 1990- DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic acids research, 18(22), 6531-6535.

20- ALI, N., MULWA, R. M., MORTAN, M. A. & SKIRVIN, R. M. 2003- Micropropagation of guava (*Psidium guajava L.*). Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 78, 739-741.

21- BEKHEET, S. A. 2015- Effect of cryopreservation on salt and drought tolerance of date palm cultured in vitro. Sci Agric, 9(3): 142-149.

22- ALHUJAMY. A.J., ABDALHUSEN M. A., 2012- Effect of NaCl on Callus growth of Catharanthus roseus and its vincristine and vinblastine alkaloids content. kufa journal of biological science. (4):1. In arabic

23- MISHRA, M. R., SRIVASTAVA, R. K., & AKHTAR, N. 2019-Abiotic stresses of salinity and water to enhance alkaloids production in cell suspension culture of *Catharanthus roseus*. Global Journal of Bio-Science and Biotechnology 9(1): 7-14.

24- IKEUCHI, M., SUGIMOTO, K., & IWASE, A. 2013- Plant callus: mechanisms of induction and repression. The plant cell, 25(9), 3159-3173.

25- OHTANI, M., & SUGIYAMA, M. 2005- Involvement of SRD2-mediated activation of snRNA transcription in the control of cell proliferation competence in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 43(4), 479-490.

26- KUNAKH, V. A. 2013- Evolution of cell populations in vitro: peculiarities, driving forces, mechanisms and consequences. Biopolymers and Cell, 29(4), 295–310.

27- KUNAKH, V. A., MEL'NYK, V. M., DROBYK, N. M., ANDREEV, I. O., SPIRIDONOVA, K. V.,

TWARDOVSKA, M. O., & ADONIN, V. I. 2015- Genetic variation induced by tissue and organ culture in Gentiana species. In The Gentianaceae. Biotechnology and Applications, (2), 199-238. Springer, Berlin, Heidelberg.

28- WANG, W. X., VINOCUR, B., SHOSEYOV, O., & ALTMAN, A. 2001- Biotechnology of plant osmotic stress tolerance physiological and molecular considerations. In IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, *560*, 285-292.

29- WISEMAN, H., & HALLIWELL, B. 1996- Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochemical Journal, 313(Pt 1), 17.

30- SIES, H. 2000- What is oxidative stress?. In Oxidative stress and vascular disease (pp. 1-8). Springer, Boston, MA.

31- GILLE, G., & SIGLER, K. 1995- Oxidative stress and living cells. Folia Microbiologica, 40(2), 131-152.

32- SAPUTRO, T. B., DIANAWATI, S., SHOLIHAH, N. F., & ERMAVITALINI, D. 2017- Genetic diversity of improved salt tolerant calli of maize (*Zea mays* L.) using RAPD. In AIP Conference Proceedings (Vol. 1854, No. 1, p. 020033). AIP Publishing LLC.