تأثير phenylalanine في استحثاث الكالس في نبات عين البزون *Catharanthus roseus* .

بشير عبد الحمزة محمد ميسم حمزة مهدي

كلية العلوم- جامعة بابل

Roseviolets1986@gmail.com. basalwani@yahoo.com.

الخلاصة

هدفت الدراسة الى اجراء مجموعة تجارب شملت استحثاث انسجة الكالس لنبات عين البزون *Catharanthus roseus (L.)G.Don* خارج الجسم الحي على وسط MS باستعمال مختلف التوليفات النباتية الهرمونية 2,4-D بالتراكيز (0.5-1-1.5)mg/ L و BA بالتراكيز (0.5-1-1.5mg/L)) للوصول الى افضل توليفة واستعمالها في التجارب اللاحقة , وكانت افضل النتائج من الهرمونات والتي اعطت اعلى وزن طري هي1 mg/L BA + 1 mg/L 2,4-D . وتضمنت الدراسة ايضا تأثيراضافة الفنيل الانين بالتراكيز ppm (50,100 , 200) وكانت افضل النتائج والتي اعطت اعلى وزن طري هي 50ppm

الكلمات المفتاحية: نبات عين البز ون , القلويدات الآندولية ,phenylalanine زراعة أنسجة نباتية.

Abstract

The aim of this study is to induction callus form *catharanthus roseus* leaves in vitro on MS medium after treating it with different combinations. The results show that BA mg/L +2,4-D 1mg/L was the best combinations which gives highest callus compared to others. The effect of adding phenylalanine to medium in different concentrations ppm (50,100, 200)ppm were the best results, which gave the highest weight is 50ppm

Keywords: *Catharanthus roseus*, Indole alkaloids, phenylalanine, tissue culture

المقدمة

نبات عين البزون *Catharanthus roseus* L. (G.) Don ينتمي الى عائلة العائلة الدفلية هي شجرة معمرة دائمة الخضرة موجودة في المناطق الاستوائية ويعد من النباتات الطبية لكونه يحتوي على اكثر من 100 قلويدات تربينية احادية monoterpenoid indole في مختلف اعضاء النبات (Jordan *et al.* ,1991) . كما يحتوي على القلويدات التربينية الثنائية dimeric alkaloid indole . تحتوي الاوراق والساق على bisindole alkaloid (Vinblastine و Vincristine) وهي تعتبر من اهم القلويدات المضادة للسرطان اكتشف هذان المركبات في عام1958, فقد استخدم المركبان Vinblastineو Vincristine في العلاج الكيميائي كما يعدان من القلويدات ثنائية الصيغة الجزيئية dimeric indole alkaloidعزلت من نباتات عين البزون (Jaleel *et al.*, 2009)

ان الفعالية البايلوجية لهذين المركبين (Vinblastineو Vincristine) يمنعان او يثبطان نمو وتكاثر الخلية السرطانية , يعملان على تثبيط النبيبات الدقيقة microtubulesفي اثناء انقسام الخلية باتحادها مع البروتين tubulin وبالتالي تمنع الخلية السرطانية بالنمو في طور metaphaseمن الانقسام الخيطي mitosis. لذلك استعمل ك anticancer (Creasey, 1979).

يتواجد المركبان (Vinblastineو Vincristine) في اوراق عين البزون بكميات قليلة جدا بنسبة 0.005% من الوزن الجاف و تحظى باسعار مرتفعة جدا , لذلك شجع الباحثون على انتاج هذه المركبات باستخدام الزراعة النسيجية . (Moreno *et al.* , 1995)

الزراعة النسيجية تقنية تستخدم فيها زراعة خلية او نسيج او عضو من نبات في وسط غذائي تحت ظروف بيئية معقمة , تستخدم هذه التقنية للإنتاج الكالس من نسيج النبات المزروع المعامل بمنظمات النمو ومن ثم تقدير القلويدات(Soleimani *et al* ., 2013). اشار الباحثون Moreno وجماعته في عام 1995 و Jaleel وجماعته في عام 2007 ان منظمات النمو لها اثر كبير في البناء الحيوي للقلويدات الاندولية. ومن خلال الدراسات العديدة التي اجراها الباحثون تأكد نجاح استحثاث انسجة الكالس من اجزاء مختلفة من نبات عين البزون عند اضافة الاوكسين والسايتوكاينين على وسط الغذائي MS الذي يعتبر من افضل الاوساط الغذائية. وذكرKodij وجماعته في عام 1989 على ال cytokinins يعمل على تحفيز البناء الحيوي للقلويدات داخل خلايا نبات عين البزون .

كما اشارة الباحثين Carewو Krueger في عام 1977 ان زيادة تركيز ال2,4-D في وسط الغذائي لنبات *Catharanthus roseus* ادى الى بطء في نمو الخلايا و زيادة في انتاج القلويدات الاندولية اما عند خفض تركيز ال2,4-D ادى الى زيادة في نمو الخلايا وانخفاض في انتاج القلويدات الاندولية . اما السايتوكاينين فانها تؤثر في انتاج وتراكم المركبات الثانوية ومن ضمنها القلويدات وذلك من خلال دور السايتوكاينين في تجميع المغذيات وزيادة العمليات البنائية داخل الخلية (مور , 1982) وقد بينت دراسات بان BA والzeatin في الوسط الغذائي في نبات الداتورة ونبات عين البزون يزيد انتاج وتراكم القلويدات (2000,Saaour) و (2005,Al-kalidy).

ان تقنية الزراعة النسيجية النباتية تعد مهمة لزيادة انتاج المركبات الثانوية مثل alkaloids, saponins, terpenoids, phenolics, steroids and flavonoids والحصول عليها بنقاوة عالية, وذلك باستجابتها للاجهاد مثل استخدام المحفزات Elicitors والبوادئ Precursors وتغيرات الظروف البيئية وتغيرات الوسط وغيرها .

يعد الفنيل الانين من الاحماض الضرورية هو حامض لا قطبي يوجد في معظم الكائنات الحية . ويوجد الفنيل الانين في النباتات يدخل في تركيب flavonoid. Lignin التي تعد من الاجهادات البيئية التي توثر في المركبات الثانوية .

و نظرا لوجود vinblastine ,vincristine بكميات قليلة في نبات عين البزون *C.roseus* لجأ الباحثون الى استخدام تقنية الزراعة النسيجية باضافة الاجهادات على النبات مثل الاملاح والاحماض الامينية لزيادة انتاج المركبين ويختلف تاثيرها باختلاف الوسط الغذائي والخواص الفسيولوجية لزراعة الخلايا (Hippolyte *et al* .,1992) . وقد اثبتت تجارب التي قام بها مجموعة من الباحثين ان اضافة الاحماض الامينية ومن ضمنها الفنيل انين والتايروسين الى الوسط الغذائيMs خارج الجسم الحي يعمل كمركب بادئ Precursors وكمحفز Elicitor لنمو الكالس (Ramawat ,2004) .

تهدف هذه الدراسة الى معرفة تأثير تراكيز مختلفة من 2,4-D و BA و تأثير phenylalanine على الاوزان الطرية والجافة لنبات عين البزون

المواد وطرائق العمل

جمع النبات وتعقيمه وزراعته

جمع النبات من المشاتل في محافظة بابل وشخص في معشب كلية العلوم / جامعة بابل . و استئصلت الاوراق الفتية والبتلات من النبات الاصل وغسلها في الماء المقطر ثلاث مرات للتخلص من الغبار والشوائب

المعلقة ثم نقلت الى كابينة انسياب الهواء الطبقي laminer air flow – cabinat `اذ جرى تعقيمها عن عن طريق غمرها ب 20٪ هيبوكلورات الصوديوم مع التحريك لمدة 10 دقائق. ثم غسلت بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقة واحدة لثلاث مرات وعقمت ايضا ب 70٪ الكحول الإثيلي ويهز لمدة 30ثانية ثم غسلت بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقة واحدة على ثلاث مرات لإزالة الكحول الاثيلي، ثم وضعت الاوراق في طبق بتري تحتوي على ورق الترشيح معقمة من أجل ازالة المياه العالقة (Awika and Rooney,2004) , وزرعت الاوراق الفتية المعقمة في انابيب الزراعة الحاوية على 10 ml من وسط MS ثم حضنت تحت ظروف الاضاءة (16 ساعة) يوميا في درجة حرارة$24\pm2^{\circ}C$.

طور استحثاث الكالس

استخدمت تقنية زراعة الأنسجة النباتية وفقا ل Hirata وجماعته 1990 لغرض استحثاث الكالس من أوراق *C.roseus*. تم عمل مزرعة ثانوية subcultured الكالس في وسط جديدة لغرض تحفيز إنتاج الأيض الثانوية ودراسة بعض المؤشرات الحيوية للنبات مثل: فعالية انزيم Catalase، و فعالية انزيم SOD ومحتوى البرولين.

زرعت أوراق النبات المعقمة في أنابيب زجاجية وتحت ظروف معقمة. بعد تقطيعها على وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من منظمات النمو النبات، 2,4-Dبالتركيزmg/L(0.5-1-1.5) وBA بالتراكيز mg/L (0.5-1-1.5) بمعدل 25مكرر لكل توليفة من 2,4-D وBA لغرض استحثاث الكالس. وحضنت أنابيب الزراعة في غرفة النمو تحت ظروف الاضاءة (16 ساعة) يوميا في درجة حرارة$24\pm2^{\circ}C$ . . وقد قيس النمو، الوزن الطري و الجاف بعد 45 يوما من انتهاء نمو الكالس.

طور التراكمي

زراعة الكالس على وسط الفنيل الانين

اخذ 250mg من الكالس الطازج واعادة زراعته على اوساط حاوية على الفنيل الانين بالتراكيز المختلفة ppm(50,100,200). وقد تم عمل 15مكرر لكل تركيز من الفنيل الانين . جرت عملية الزراعة تحت ظروف معقمة وقياس الوزن الطري والجاف بعد 6 اسابيع من الزراعة .

وقد قيس النمو، الوزن الطري و الجاف بعد 45 يوما من انتهاء نمو الكالس.

المناقشة والنتائج

تراكم الفنكرستين والفنبلاستين باستخدام الزراعة النسيجية:

استخدم نظامان في استحثاث انسجة الكالس وتحفيز انتاج وتراكم القلويدات في انسجة الكالس المستحث من اوراق نبات عين البزون تشمل:

النظام الاول طور النشوء هو استحثاث انسجة الكالس من الاجزاء الورقية لنبات عين البزون *C.roseaus* باستخدام منظم النمو 2,4-Dو BA .

النظام الثاني طور التراكم في عملية انتاج وتراكم القلويدات في انسجة الكالس.

تأثير الهرمونات 2,4-D وBAعلى الوزن الطري والجاف (g):

درست مستويات مختلفة من هرمون 2,4-D و BA لاستحثاث انسجة الكالس من اوراق نبات عين البزون المزروعة على وسطMS تشير النتائج في الجدول(1) الى التأثير معنوي لتراكيز المختلفة من2,4-D وBA المضافة الى الوسط في معدل الوزن الطري لأنسجة الكالس المستحث من اوراق نبات عين البزون اذ

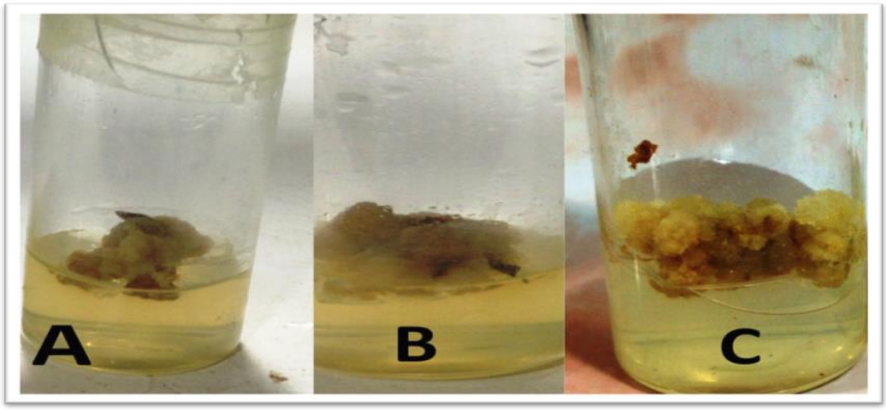
نلاحظ معاملة AB اعطت افضل وزن طري عند 1mg/L اذ بلغت القيمه 2.15g واختلفت معنويا عن المعاملات الاخرى اذ بلغ وزنg(1.74 , 1.73,)للمعاملات 0.5mg/L و 1.5mg/L على التوالي اما معاملة 2,4D اعطت افضل وزن طريا عند 1mg/lاذ بلغت القيمة 2.24g واختلفت معنويا عن المعاملات الاخرى اذ بلغ وزن g (1.91 , 1.46) للمعاملات 0.5mg/ L و 1.5mg/L على التوالي .واظهرت النتائج التداخل الهرموني بين 2,4-D وBA بتركيز mg/L (1+1) اعطى اعلى معدل من الوزن الطري اذ بلغ وزنه 3.23g ثم يله التوليفة 0.5+0.5mg/l اذ بلغ وزنه 2.42g واعطت التوليفة mg/L (1.5+1.5) مقدار 1.95g حيث اختلفت معنويا عن جميع المعاملات 2,4-D وBA.

اما الأوزان الجافة اظهرت قيم مختلفة كما هو موضح في الجدول (2) اذ نلاحظ معاملة AB عند 1mg/ L بلغت القيمة 0.14g وهي لاتختلف معنويا عن المعاملات الاخرى اذ بلغت القيمة g(0.13, 0.15) للمعاملات 0.5mg/L و 1.5mg/L على التوالي اما معاملة 2,4-D اعطت افضل وزن طري عند 1mg/Lاذ بلغت القيمة 0.52g واختلفت معنويا عن المعاملات الاخرى اذ بلغ وزنg(0.11,0.13) للمعاملات 0.5mg/L و 1.5mg/L على التوالي واظهرت النتائج التداخل الهرموني بين 2,4D وBA بتركيز 1+1 mg/l اعلى معدل بلغ وزنه 0.27g ثم يله mg/L (0.5+0.5)اذ بلغ وزنه 0.24g و 1.5+1.5 mg/l اذ بلغ وزنه 0.20 g واختلفت معنويا فيما بينهما عن جميع المعاملات 2,4-D وBA.

بينت النتائج التوازن الهرموني بين الاوكسين و السايتوكاينين ان لهما دور مهم للحصول على افضل وزن طري وجاف للكالس . ان اضافة منظمات النمو الى الوسط الغذائي MS مهمة في تحفيز الكالس فضلا عن تاثيرها الفسيولوجي والفعالية البيولوجية في انقسام ونمو الخلية النباتية (Davies, 2004). كما ذكر Centeno وجماعته في عام 1996 الى اهمية التوازن الهرموني في نمو وتكشف انسجة الكالس , اذ يفسر ذلك ارتفاع معدل الوزن الطري والجاف لأنسجة الكالس المستحث من اوراق نبات *C. roseus* في الوسط الغذائي المجهز بنسبة متوازنة من 2,4-D و BA والبالغةmg/L (1.5+1.5 , 0.5+0.5 , 1+1) لاوكسين له دور مباشر في توسع الخلية من خلال زيادة بعض فعاليات الانزيمية التي تستجيب لمرونة الخلية وزيادة النفاذية. اما السايتوكاينين فله دور في انقسام الخلايا وفي تصنيع بعض البروتينات المهمة ولتكوين RNA و له دور في زيادة امتصاص الماء والمغذيات مما يؤدي الى زيادة الكتلة الحيوية لانسجة الكالس (Mohamed, 1990). و ذكر George في عام 2008 ان التوازن بين الاوكسين و السايتوكاينين مهم لتحفيز الكالس . كما اشار Carewو Krueger في عام 1977 الى امكانية زيادة وتحفيز الكالس المستحث من نبات *C. roseus* عند استعمال 2,4-D و BA . و اشار Ethbaieb في عام 2010 ان افضل توليفة لتحفيز الكالس في نبات *C. roseus*كانت auxin mg/L 2 وcytokinins mg/L 2 .

جدول (1) تأثير 2,4D و BA على الأوزان الطرية للكالس نبات عين البزون
علما ان العامل A يمثل 2,4D,والعامل Bيمثل BA

BA / 2,4D	0.5 mg/l	1mg/l	1.5mg/l	means
0.5 mg/l	2.42	1.80	1.53	1.91
1mg/l	1.80	3.23	1.69	2.24
1.5mg/l	1.01	1.42	1.95	1.46
means	1.74	2.15	1.73	
LSD AB =0.44 , LSD A= 0.24 , LSD B= 0.24				



الشكل (١) كالس نبات عين البزون النامي في وسط MS المجهز بال 2,4D وBA

A: (1.5 2,4-D +1.5 BA) mg/L

B: (1 2,4D + 1 BA) mg/L

C:(0.5 2,4-D + 0.5 BA) mg/L

جدول (2) تأثير 2,4D و BA على الأوزان الجافة للكالس نبات عين البزون

BA / 2,4D	0.5 mg/l	1mg/l	1.5mg/l	means
0.5 mg/l	0.24	0.10	0.07	0.13
1mg/l	0.17	0.27	0.13	0.52
1.5mg/l	0.04	0.06	0.20	0.11
means	0.15	0.14	0.13	
LSD AB=0.03 , LSD A= 0.22 , LSD B = 0.22				

طور التراكمي:

تاثير phenylalanine على الاوزان الطرية و الجافة (g) :

اضيف phenylalanine الى الوسط الغذائي MS الخاص باستحثاث الكالس بالتراكيز (50 ,100, 200)ppm , وقد اعطت نتائج مختلفة من الاوزان الطرية والجافة للكالس في طور التراكمي accumulation phase كما هو موضح في الجدول (3) فكان اعلى معدل للأوزان الطرية عند تركيز 50 ppm حيث بلغ وزنه (3.54g) وهو لا يختلف معنويا عن معاملة السيطرة التي اعطت (3.23g) من الوزن الطري واختلفت معنويا عن بقية المعاملات وثم يله تركيز 100 ppm اذ بلغ وزنه (1.74g) , اما تركيز 200ppm فقد كان اقل وزن طري حيث بلغ من وزنه(1.38g) و تختلف معنويا كلا المعاملتين مقارنة مع معاملة السيطرة.

اما الاوزان الجافة المبينة في جدول (3)فكانت اعلى قيمة من الاوزان تركيز 50 ppm حيث بلغ وزنه(0.52g) وهي تختلف معنويا عن بقية المعاملات لا تختلف معنويا عن معاملة السيطرة الذي بلغ وزنه 0.27g ثم يله تركيز 100ppm اذ بلغ وزنه 0.14g , اما تركيز 200ppm كان اقل وزن طري حيث بلغ من وزنه 0.11g تختلف كلا المعاملتين مقارنة مع معاملة السيطرة.

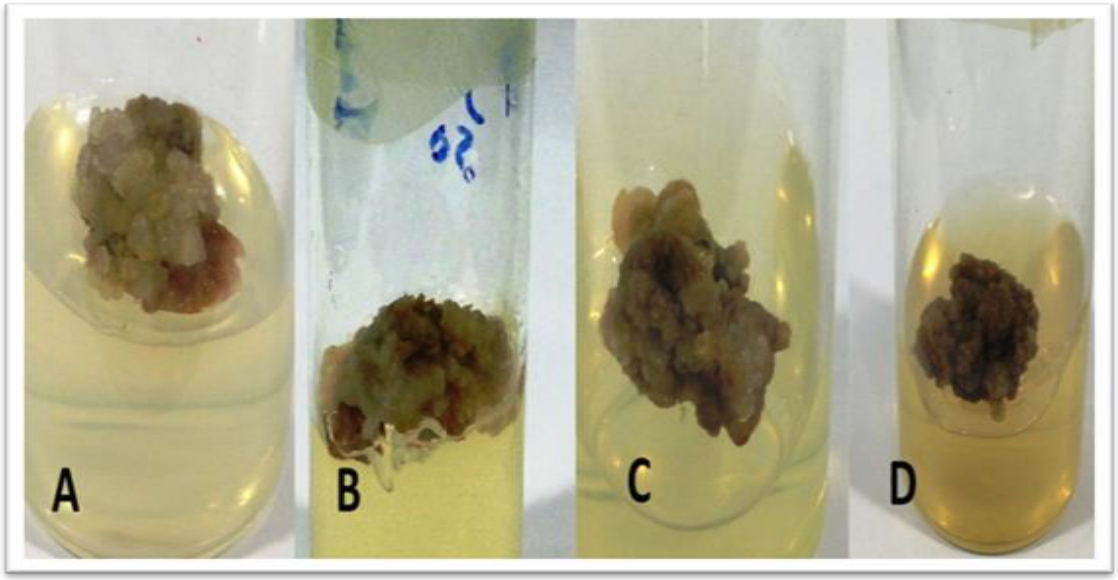
ان العوامل اللاحيائية او الاجهادات stress factor التي تشمل انواع عديدة مثل الاحماض الامينية ومن ضمنها phenylalanine عند اضافتها الى الوسط ادت التراكيز العالية من phenylalanine الى تقليل الوزن الطري والجاف المعرض للإجهاد وتفسر ذلك ان التراكيز العالية اكثر من المستوى الطبيعي تؤدي الى تغيرات في العلاقات المائية للخلايا فتسبب زيادة الشد المسلط عليها وبالتالي تسبب قلة في الماء وعليه يؤدي الى قلة في كمية المواد الغذائية الذائبة في الوسط الغذائي الذي تنمو فيه الخلايا(1997 , Rady و Saker) وبالتالي تقلل من نمو خلايا الكالس المعرضة للاجهاد وتقلل من انقسام الخلايا (Radman *et al* ., 2003). وربما يعود السبب في نقصان الوزن الطري والجاف للكالس بسبب اضافة الحامض الاميني الفنيل الانين الذي يعد البادئ البنائي ل SA الغذائي مما اثر سلبا "في نمو خلايا الكالس (Hayat&Ahmed,2007) (Wink& Zayed,2004)

وان زيادة وزن الطري والجاف للكالس في تركيز 50ppm بسبب تحفيز الفعالية الحيوية لدفاع والتكيف في تركيز 50ppm اضافة الى اهمية phenylalanine الذي يعتبر بادئ ومحفز لنمو خلايا الكالس (2004, Ramawat) .

كما ذكر Cheeseman (2006) عند تعرض الكالس لعوامل الاجهاد يؤدي الى تكوين الجذور الحرة التي تؤدي الى تغيرات فسيولوجيا وبالتالي تؤدي الى تقليل الاوزان الطرية والجافة في خلايا الكالس وهذه النتائج تتفق مع (Ethaieb *et a.,*/ 2010, Natas *et al.*, 2004).

جدول(3) **تأثير phenylalanineعلى الاوزان الطرية والجافة للكالس نبات عين البزون**

المعاملات	الوزن الطريg	الوزن الجاف g
control	3.23	0.27
Phenylalanine 50 ppm	3.54	0.52
Phenylalanine 100ppm	1.74	0.14
Phenylalanine 200ppm	1.38	0.11
L.S.D	0.453	0.20



الشكل (٢) كالس نبات عين البزون النامي في وسط MS المجهز بالphenylalanine

A:control (1 2,4-D +1 BA) mg/l
B: phenylalanine 50 ppm
C: phenylalanine100 ppm
D: phenylalanin

المصادر

مور , س توماس (1982).الهرمونات النباتية , فسلجتها وكيميائيتها الحيوية , وزارة التعليم العالي والبحث العلمي , جامعة الموصل.

Al-kalidy, M. S. S. (2005). Production of some alkaloids from Datura Stramonium and Datura innoxia by using plant tissue culture technique, Doctoral thesis, Sciences College, Baghdad University.

Awika, J. M. and Rooney, L. W. (2004). Sorghum Phytochemical and their potential aspects on human health.Photochemistry. 65(9):1199-1221.

Carew, D. P. and Krueger, R. J. (1977). *Catharanthus roseus* tissue culture: the effects of medium modifications on growth and alkaloid production. J. Nat. prod. 40(4): 326-336.

Centeno, M. L.; Rodviques, A.; Feito, I. and Fernade, s. (1996). Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in Actinideliciosa tissue culture. Plant-cell-Rep. 16:58-62.

Cheeseman , J.M. (2006). Hydrogen peroxide concentration in leaves under natural condition . J. Experiment botany ,57(10): 2435-2444 .

Creasey, W.A. 1979. The vinca alkaloids. In Antibiotics. Vol. 5, ed. Hahn, F.E., pp. 414- 438. New York: Springer-Verlag.

Davies, P.J.(2004), Plant hormones . biosynthesis , signals Transduction , action. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.pp:1-11.

Ethbaieb , E . G. (2010). Using of tissues culture for vinblastine and vincristine production in *C.roseus* in vitro , University of Kufa Agriculture college .

George ,E.F .; M.A . Halland G.D. Klerk .(2008). Plant propagation by tissues culture . 3rd edation . By spring pp: 1-479.

Hayat ,S. and A ,Ahmed .2007. Salicylic acid – A plant Hormone.Springer .ISBN, 1402051832.

Hippolyte I, B Marin ,JC Baccou, R Jonard(1992). Growth and rosmarinic acidproduction in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. Plant CellRep. 1992; 11:109-112.

Hirata, K.; Yamanaka, A.; Karano, N.; Miyamoto, K. and Miura, Y., (1990). Production of indol alkaloids in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus*. Agric. Biol. Chem. 51:1311-1317.

Jaleel , C.A. ; Gopi, R.; Manivavannan , P.; and Panneerselvam ,R.(2007). Respones of antioxidant defense system of *C. roseus* (L).G . Don to paclobutrozol treatment under salinity . Acta physiol , plant ., 29: 205-209.

Jaleel , C.A.(2oo9). Changes in non enzymatic Antioxidant and Ajmalicine production in *C.roseus* different soil salinity Regimes research international,2(1): 1-6.

Jordan,A.M ., Thrower.D , and Wilson.L(1991). Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids," Cancer *Research*, vol. 51, no. 8, pp. 2212–2222.

Kodij HP, Liu D, M~rillun JM, Andreau F, Rideau M & Clnieux JC (1989). Stimulation par les cytokinines de I'accumulation d'alcalodes indoliques darts des suspensions ceilulaires de *Catharanthus roseus* G. Don. C R Acad. Sci. Par. Str. III 309: 453-458.

Mohamed, A. K. (1990). Plant Physiology, second part, Higher Education Press, Baghdad University, Iraq .

Moreno ,P.R.H. ; Vander Heijden , R, and Verpoorte ,R.(1995). Cell and tissue culture of *C. roseus* : a literature survey ll. Updating from 1988 to 1993. Plant cell tissue organ cult., 42: 1-25 .

Natas , A ,B .; Dunia ,L.L and Sibila,J.(2004) . Rosmarinic acid synthesis in transformed callus culture of *Coleus blumei* Benth . Zagreb ,Crotia.

Radman , R., Seazt Bucke C., Keshararz T.(2003) . Elicitation plants and microbial cell systems . Biotech applied Biochem .37 : 91-102.

Ramawat , K.G.(2004). Plant Biotechnology , Printed in India,pp :50-62.

Saaour, K. J.; Sabah, M. and Ali, S. M. (2000). Detection, purification and quantification of vincristine in Callus of *Catharanthus roseus*, Journal of Technology Research. 2(1): 35-52.

Saker ,M.M. and M.R.Rady ,.(1997). Elicitation of tropane alkaloids in suspension culture of *Hyoscyamus ,Datura* and *Atropa belladonna* by osmotic stress .fitoterapia ,68: 338-342.

Soleimani F.1, Zarghami R.2,Ebrahimzadeh M.3 (2013). Effects of 2,4-D and Kinetin concentrations on Vinblastine and Vincristine alkaloid contents in callus of periwinkle (*Catharanthus roseus*) . International Journal of AgriScience Vol. 3(10):759-765.

Zayed, R. and M .Wink . 2004 .Introduction of Tropane AlkaloidsFormation In transformed root culture of *Brugmansia Suaveolens*(Solanaceae) . 59 P: 863-867.