

تأثير السكروز وفنيل ألانين في إنتاج بعض المركبات الطبية من الكالس المستحث من رويشة نبات عين البزون *Catharanthus roseus* L. G. Don خارج الجسم الحي

**أياد عاصي عبيد

*إخلاس متعب أحمد

كلية الزراعة – جامعة ديالى

Ekhl. Meteab86@ yahoo.com

المستخلص

اجريت دراسة تأثير كل من السكروز والـ Phenylalanine في تحفيز الكالس المستحث من رويشة نبات عين البزون في إنتاج بعض المركبات الطبية . استحث الكالس من زراعة الرويشة في الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 0.5 ملغم.لتر⁻¹ Kin. و 2.0 ملغم.لتر⁻¹ NAA وكان افضل وسط غذائي لإدامة واستحث الكالس والذي أضيف اليه مستويات مختلفة من السكروز بالتركيز 30،40،60،80غم.لتر⁻¹ و Phenylalanine بالتركيز 0،5،10،20،30،45 ملغم.لتر⁻¹ وكانت كل تجربة على حده . أظهرت النتائج إن أعلى زيادة في كمية الـ Vindoline و Catharantine و Vincristine قد حصلت عند تضمين الوسط الغذائي 80غم .لتر⁻¹ من السكروز أذ سجلت 220.33 و 269.6 و 147.12 مايكروغرام. ملغم⁻¹ وزن طري من الكالس وإن اضافة تركيز 60غم.لتر⁻¹ من السكروز كان الافضل في اعطاء أعلى كمية من Vinblastine بلغ (169.28) مايكروغرام .ملغم⁻¹ وزن طري ، وإن اضافة 10 ملغم .لتر⁻¹ من الفينيل ألانين كان الافضل في اعطاء كمية للمركبات Catharantine و Vincristine و Vinblastine بلغ 319.5 و 159.5 و 646.0 مايكروغرام. ملغم⁻¹ وزن طري من الكالس بينما التركيز 20 ملغم لتر⁻¹ من الفينيل ألانين أعطى افضل النتائج في زيادة مركب الـ Vindoline بلغ 213.0 مايكروغرام. ملغم⁻¹ وزن طري من الكالس.

الكلمات المفتاحية نبات عين البزون، السكروز، Phenylalanine ، المركبات الطبية

البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الأول

EFFECT OF SUCROS AND PHENYLALANINE IN THE PRODUCTION OF SOME MEDICAL COMPOUNDS FROM COLEOPTILES INDUCED CALLUS OF *CATHARANTHUS ROSEUS* L.GON IN VITRO

Ekhl. Meteab Ahmed

**Ayad Assi Obaid

College of Agriculture-University of Diyala

Ekhl. Meteab86@ yahoo.com

ABSTRACT

An experiment on the effect of Sucrose and Phenylalanine on coleoptiles induced callus of *Catharanthus roseus* on the production of Some medical compounds from *Catharanthus roseus* callus induction was achieved by culturing coleoptiles of the plant on Murashing and Skoog (MS) medium supplemented with 0.5 mg.l⁻¹ and 2.0 mg.l⁻¹ NAA the best medium to maintain callus when different levels were added to MS medium for each .sucrose ,30, 40,60,80 g.l⁻¹ and Phenylalanine ,0,5,10,20,30,45 mg.l⁻¹ alone experiments the results showed the medium supplemented with 80 g.l⁻¹ of sucrose gave the highest quantity of Vindoline , Catharantine and Vincristine reached 220.33,269.6 and 147.12 ug. mg⁻¹ fresh weight of callus. Murashing and Skoog(MS) medium content at the concentration 60 g.l⁻¹ of Sucrose gave the highest level of Vinblastine recording 169.28 ug. mg⁻¹ fresh weight of callus . Murashing and Skoog (MS) medium content at the concentration 10 mg.l⁻¹ Phenylalanine gave the highest quantity of Catharantine , Vincristine and Vinblastine amounted 319.5, 159.27 and 646.0 ug. mg⁻¹ fresh weight of callus .while MS medium the supplemented with 20 mg.l⁻¹ of Phenylalanine gave the highest quantity of Vindoline 213.0 ug.mg⁻¹ fresh weight of callus

Key Word :Catharanthus roseus ,Sucrose , Phenylalanine, medical compounds

•*Part of M.Sc.Thesis first researcher

المقدمة

والهندسية / الحارثية / بغداد استعملت بذور عين البزون صنف Pacifica Mix وتم الحصول عليها من شركة إنتاج البذور الأمريكية Pan American Seed.

تهيئة البذور وتعقيمها. عقت البذور باستخدام القاصر التجاري (NaOCl) والحاوي على نسبة 6% كلور من بتركيز 4.5% ولمدة (20) دقيقة وغسلت البذور بعدها (4) مرات بالماء المقطر لضمان إزالة بقايا المادة المعقمة من البذور، علما بان كافة خطوات التعقيم كانت تجري تحت ظروف معقمة في كابينة الزراعة Laminar air Flow cabinet مع التحريك المستمر للبذور لإزالة الفقاعات الهوائية، زرعت البذور على وسط MS 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 حرارة 25 ± 2 م° وبعد 4 اسابيع من الزراعة تم فصل الأجزاء النباتية (Explant) المستخدمة في الدراسة.

نشوء الكالس وادامته: زرعت الرويشة في انابيب زراعة زجاجية (Screw Glass Tube) سعة 125 مل و بواقع 20 مل. قنينة¹ حاوية على وسط MS والمجهز ب 0.5 ملغم.لتر⁻¹ من Kin. و 2.0 ملغم.لتر⁻¹ من NAA و بواقع 10 مكررات

تحفيز إنتاج المركبات الثانوية في الكالس. اخذ وزن ثابت من الكالس 100 ملغم، وزرع على وسط غذائي MS والمجهز بتركيز 0.5 ملغم.لتر⁻¹ من Kin. و 2.0 ملغم.لتر⁻¹ من NAA مع اضافة مستويات مختلفة وفي تجارب مستقلة لكل من السكرز 30، 40، 60، 80 غم.لتر⁻¹ و Phenylalanine بالتركيز 0، 10، 20، 30، 45 ملغم.لتر⁻¹ و بواقع عشر مكررات لكل تركيز حضنت الزروع في الظلام لمدة 5 أسابيع، وعلى درجة حرارة 25 ± 2 م°.

الاستخلاص والتقدير الكمي والنوعي للمركبات الفعالة من الكالس. لغرض استخلاص القلويدات تم اتباع طريقة (Fansong Mu وآخرون، 2012). وزن 5 غرام من الكالس الطري مزجت مع (200) مليلتر من محلول الايثانول (80%). تم اجراء عملية الاستخلاص بالحمام فوق الصوتي عند تردد (40) ميغاهيرتز وقدرة ادخال قصوى (250) واط بدرجة حرارة 45 م° ولمدة 30 دقيقة. يتم دمج المحاليل المستخلصة بعد كل عملية استخلاص وتجفيفها باستخدام مبخر دوار من نوع Shimadzu بدرجة حرارة 45 م°، تم اضافة الميثانول من الدرجة HPLC بحجم مليلتر واحد للبقايا المستخلصة من المبخر الدوار، ثم يحقن 50 مايكرو لتر في عملية عزل عالية الاداء. حقن المحلول القياسي في جهاز HPLC نوع Liquid Chromatography Shimadzu لغرض تحديد زمن الاحتجاز Retention time وارتفاع حزمة العينة Area لكل من المحلول القياسي للمواد الفعالة وعينة الكالس الذي فصل على عمود (Column) هو من نوع Zorbax EC model XDBC-18,3um particlesize (50x4.6mmI.D). الطور المتحرك (Mobile phase) للمركبات Vinblastine،

يعد نبات عين البزون (L.) G. Don *Catharanthus roseus* من النباتات المهمة طبيا وهو يعود للعائلة الدفلية Apocynaceae يحتوي هذا النبات على الكثير من المركبات القلويدية أهمها مركبي Vincristine و Vinblastine اللذان يستعملان في علاج مرض السرطان (Ferrerres وآخرون، 2008) و (Leveque وآخرون، 1996) و (Van der Heijden وآخرون، 2004). إن استخدام المواد المحفزة يعد واحدا من العوامل المهمة والفعالة لزيادة إنتاج القلويدات في الخلايا النباتية عند تعرضها للإجهاد الذي يتمثل بإضافة عدة محفزات او بوادئ مثل المركبات العضوية والأملاح المعدنية التي تضاف إلى الأوساط الغذائية او رشها على النبات والتي تعمل بدورها على سرعة عملية السحب والامتصاص لمنتجات تمثيل القلويدات إضافة إلى إسهامها في بناء المواد الفعالة، او بناء مركبات (اولية والوسطية) التي تدخل في المسارات البنائية المؤدية لإنتاج مركبات معينة في النبات (ابو زيد، 2006، Karuppusamy، 2009). اشارت العديد من الدراسات إلى امكانية تحفيز انتاج المركبات الثانوية عند تعريضها للإجهاد الذي يتمثل بإضافة السكرز والفنيل الأنين إلى الوسط الغذائي. أذ اشار (Smith وآخرون، 1987) إلى إن زيادة تركيز السكرز في الوسط عند زراعة خلايا نبات عين البزون من 4-10% حفز من زيادة انتاج القلويدات، و اوضح (Shohji وآخرون، 2000) إن مستوى انتاج القلويدات يزداد إلى 26 مرة بوجود المحفز الملائم في الوسط أي يصل الى 29% من وزن الخلية مقارنة بالأوساط غير المجهزة. اشارت (Staba، 2000) إن زيادة تركيز السكرز في الوسط الغذائي من 2% الى 4% ادى إلى زيادة ملحوظة في تركيز مركب Polyphenol عند زراعة نسيج الكالس لنبات الورد الشجيري، وفي دراسة علمية حصل (Tsay و Mulabagal، 2004) على حامض rosmarinic acid عند اضافة الحامض الاميني Phenylalanine إلى معلق خلايا نبات *Salvia fruticosa*. و اوضحت (الخطيب وآخرون، 2009) إن استعمال بوادئ مثل Phenylalanine كان له نتائج أفضل من tryptophan في انتاج القلويدات لنبات عين البزون، يحتل نبات عين البزون أهمية طبية كبيرة لما يحتويه من مركبات ثانوية مهمة طبياً ولكن انتاجها قليل مقارنة بالحاجة الفعلية لهذه المركبات طبياً فقد أجريت هذه التجربة التي تهدف إلى تقدير كمية زيادة انتاج مركبات الأيض الثانوي وذلك عن طريق استخدام تراكيز مختلفة من ال- Phenylalanine والسكرز والكشف كما ونوعاً عن هذه المركبات المنتجة عن طريق التحليل الكروماتوغرافي باستعمال جهاز high performance liquid chromatography (HPLC) لعينات من الكالس.

المواد وطرائق العمل. نفذت هذه الدراسة في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع إلى قسم البستنة وهندسة الحدائق- كلية الزراعة - جامعة ديالى للفترة من شباط لغاية تشرين الاول 2015، فيما اجريت التحليلات المختبرية المتضمنة تقدير القلويدات في شركة الحقول البيضاء للاستشارات البيئية

مايكروغرام ملغم⁻¹ وزن طري. ولم تظهر نتائج التحليل الاحصائي فروقاً معنوية بين المعاملات. وإن أعلى كمية من مركب Vincristine فقد حصلت عند معاملة الوسط المجهز بتركيز 80 غم/لتر⁻¹ من السكروز وكانت قيمته 147.12 مايكروغرام ملغم⁻¹ وزن طري والتي اختلفت معنوياً عن معاملة الوسط المجهز بتركيز 30 غم/لتر⁻¹ من السكروز إذ بلغت قيمة المركب 32.45 مايكروغرام ملغم⁻¹ وزن طري. حصلت افضل كمية لمركب Vinblastine عند معاملة الوسط الغذائي المجهز بتركيزي 40 و 60 غم/لتر⁻¹ من السكروز وبلغت كمية (139.89 و 169.28) مايكروغرام ملغم⁻¹ وزن طري، وقد بلغ هذا المركب أدنى قيمة له عند تركيز 80 غم/لتر⁻¹ من السكروز إذ بلغت قيمته 54.56 مايكروغرام ملغم⁻¹ وزن طري. في حين لم يسجل اي قيمة لهذا المركب عند الوسط الغذائي المجهز بتركيز 30 غم/لتر⁻¹ من السكروز ولم تظهر نتائج التحليل الإحصائي فروقاً معنوية بين المعاملات رغم من الزيادة الكبيرة في القيم المركبات الناتجة.

إن تأثير السكروز في انتاج المركبات الثانوية من الكالس لنبات عين البزون قد تباينت باختلاف تراكيز السكروز المضافة للوسط الغذائي، إذ إن زيادة السكروز في الوسط أدت إلى زيادة المركبات الثانوية Vindoline وCatharanthine

وVincristine وVinblastine. قد يعزى السبب في ذلك لكون الكربوهيدرات من المكونات الاساسية لأي وسط غذائي بوصفها مصدر للطاقة فضلاً عن دور الكربوهيدرات في تنظيم العملية الأزموزية للوسط (George ، 2008). وهذا يتفق مع ما توصلت إليه ساعور وآخرون، 2000 التي ذكرا اضافة تراكيز عالية من السكروز (40 و 60 و 80 و 120) غم/لتر إلى الاوساط الغذائية لمزارع كالس نبات عين البزون قد حفز على زيادة إنتاج قلويد Vincristine إذ بلغ كمية القلويد بالنسبة وزن الكالس المنتج (7.68، 39.1، 120.75 و 129.6) جزء بالمليون على التتابع، وبين هادي في النتائج التي حصل عليها إن استخدام السكروز في الاوساط الزراعية بتركيز مختلفة (40 و 60 و 80 و 120) غم/لتر أدى إلى زيادة انتاج مركبي Vincristine و Vinblastine في خلايا كالس نبات عين البزون بتراكيز (6.822 و 47.2 و 51.4 و 63.8) Ppm لمركب Vinblastine (0.295 و 0.91 و 2.1 و 2.7) Ppm لمركب Vincristine وعلى التتابع، قد يعود السبب إلى التراكيز العالية من السكروز تؤدي إلى تحفيز انتاج المركبات الثانوية ومن ثم تراكمه في الخلايا.

Vincristine، خليط يتكون من 14 مايكرومول محلول دارئ الفوسفات ذات pH: 7.2 acetonitrile: 4:1 وينسبة 1.8 مل/ دقيقة وقيست القراءات على (UV Detection) طول موجي قدره 220 nm وبدرجة حرارة 25 م°. سجلت القراءات على الاطوال الموجية وحسب زمن الاحتجاز Retention time (RT) للمحالييل القياسية والعينات المدروسة: قدرت تراكيز المواد الفعالة كميّاً بمقارنة مساحة حزمة المادة القياسية مع مساحة حزمة النموذج تحت نفس الظروف أعتامادا على القانون التالي :

$$\text{تركيز النموذج} = \text{مساحة النموذج} \times \text{تركيز المحلول القياسي} \times \text{معامل التخفيف}$$

مساحة المحلول القياسي

التصميم التجريبي والتحليل الإحصائي.

اخضعت جميع البيانات إلى التحليل الاحصائي كتجارب بسيطة باستعمال التصميم العشوائي الكامل CRD لتجارب ذات عامل واحد Completely Randomized Design (CRD) وحللت النتائج باستخدام البرنامج الإحصائي (SAS, 2004) وتمت مقارنة المتوسطات وفق اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى احتمال 0.05

النتائج والمناقشة

تأثير السكروز في إنتاج المركبات الثانوية . أظهرت النتائج المبينة في جدول(1) إلى زيادة في كمية مركب Vindoline عند اضافة السكروز إلى الوسط الغذائي، إذ تفوق الوسط الغذائي المجهز بتركيز 80 غم/لتر⁻¹ معنوياً إذ أعطى أعلى كمية من مركب Vindoline بلغت 220.33 مايكروغرام ملغم⁻¹ وزن طري وبفارق معنوي على جميع المعاملات ، في حين بلغ أدنى كمية من المركب عند الوسط الغذائي المجهز بتركيزي 30 و 40 و 60 غم/لتر⁻¹ إذ بلغت كمية المركب (71.05 و 45.90 و 58.44) مايكروغرام ملغم⁻¹ وزن طري في حين إن اضافة تركيز 80 غم/لتر⁻¹ من السكروز إلى الوسط الغذائي كانت الأفضل معنوياً في زيادة كمية مركب Catharanthine المنتجة من قبل الكالس وبلغت كمية 269.6 مايكروغرام ملغم⁻¹ وزن طري والذي لم يختلف معنوياً عن الوسط الغذائي المجهز بتركيز 60 غم/لتر⁻¹ من السكروز لكمية المركب إذ بلغت كميته 144.7 مايكروغرام ملغم⁻¹ وزن طري، في حين سجلت معاملة الوسط الغذائي المجهز بتركيزي 30 و 40 غم/لتر⁻¹ من السكروز أقل كمية من هذا المركب بلغت (28.9 و 35.0)

جدول (1) تأثير السكروز في إنتاج المركبات الثانوية (مايكروغرام .ملغم⁻¹ وزن طري) من كالس نبات عين البزون بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS .

المركبات الثانوية				تراكيز السكروز غم.لتر ⁻¹
Vinblastine	Vincristine	Catharanthine	Vindoline	
0.00	32.45	35.0	71.05	30
a	b	a	b	
139.89	107.26	28.9	45.90	40
a	a b	a	b	
169.28	128.46	144.7	58.44	60
a	a	a	b	
54.56	147.12	269.6	220.33	80
a	a	a	a	

الاحرف المتشابهة لا تختلف معنوياً حسب اختبار دنكن 0.05

الغذائي المجهز بتركيزي 30 و40 ملغم.لتر⁻¹ الفينيل الأنين أدنا قيمة للمركب بلغت (2.71 و 9.17) مايكروغرام .ملغم⁻¹ وزن طري . ولم تظهر نتائج التحليل الاحصائي فروقاً معنوية بين المعاملات وان أعلى قيمة للمركب Vinblastine في معاملة 10 ملغم.لتر⁻¹ الفينيل الأنين بلغت 646.0 مايكروغرام.ملغم⁻¹ وزن طري وتفوقت معنوياً على معاملة المقارنة ومعاملي 5 و20 ملغم.لتر⁻¹ الفينيل الأنين إذ بلغت قيمة المركب (139.9 و 246.1 و 195.7) مايكروغرام .ملغم⁻¹ وزن طري .

قد يعزى سبب زيادة إنتاج المركبات الثانوية عند التراكيز المناسبة من الحامض الاميني المضافة إلى الوسط الغذائي إلى كونه البادئ البنائي لهذه المركبات (Aziz وآخرون، 2002، Khanna وآخرون، 2005). فمن الوظائف المهمة للأحماض الامينية هو توفير الهيكل الكربوني والمكونات النايتروجينية للقلويدات (Sarin، 2005). تتفق هذه النتائج مع Fett وآخرون (1995) الذي وجدو إن اضافة تراكيز مختلفة من الفينيل الأنين إلى وسط مزارع كالس نبات *Taxus cupsidat* قد ادى إلى زيادة إنتاج مركبات فعالة مضادة للسرطان Taxol و anticancer مقارنة بالأوساط الخالية من اي اضافة وتوصل Ballica وآخرون (1993) إن وسط مزارع كالس نبات *Datura stramonium* يزيد من إنتاج القلويد 5 مرات أكثر من الوسط الخالي منها عند إضافة مادتي الفينيل الأنين و Orthine وتتفق ايضاً مع Aziz وآخرون (2002) وجواد وأحمد (2014).

تأثير الفينيل الأنين في إنتاج المركبات الثانوية

يلاحظ من النتائج الإحصائية في الجدول (2) عدم وجود فروقاً معنوية في كمية الـ Vindoline المستخلص من كالس نبات عين البزون استجابة لنسبة تراكيز الفينيل الأنين المضافة للوسط الغذائي، إذ بلغت أعلى قيمة للمركب Vindoline في الوسط الغذائي المجهز بتركيز 20 ملغم.لتر⁻¹ الفينيل الأنين بلغ 213.0 مايكروغرام .ملغم⁻¹ وزن طري، في حين أعطت معاملة المقارنة قيمة بلغت 45.9 مايكروغرام .ملغم⁻¹ وزن طري ولم يسجل وسط MS المجهز بتركيز 45 ملغم.لتر⁻¹ الفينيل الأنين اي قيمة للمركب. أظهرت نتائج التحاليل الإحصائية إن تضمين الوسط MS بتركيزي 5 و10 ملغم.لتر⁻¹ بحامض الفينيل الأنين ادى إلى زيادة إنتاج مركب الـ Catharanthine إذ بلغت كمية المركب (218.9 و 319.5) مايكروغرام.ملغم⁻¹ وزن طري وانخفضت قيمة هذا المركب إلى (1.8 و 0.7) مايكروغرام .ملغم⁻¹ وزن طري عند معاملي 30 و45 ملغم.لتر⁻¹ الفينيل الأنين، ولم تظهر نتائج التحليل الاحصائي فروقاً معنوية بين المعاملات رغم انها زيادة كبيرة في القيم المركبات الناتجة . إن أعلى استجابة للمركب Vincristine حدثت عند تركيز 10 ملغم.لتر⁻¹ بحامض الفينيل الأنين المضاف للوسط الغذائي إذ بلغ 159.5 مايكروغرام .ملغم⁻¹ وزن طري ،في حين أعطت معاملة المقارنة كمية للمركب بلغت 107.26 مايكروغرام .ملغم⁻¹ وزن طري وسجلت معاملي الوسط

جدول (2) تأثير الفينيل الأنين في إنتاج المركبات الثانوية (مايكرو غرام .ملغم⁻¹ وزن طري) من كالس نبات عين البزون بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS

المركبات الثانوية				الفينيل الأنين Phenylalanine ملغم.لتر ⁻¹
Vinblastine	Vincristine	Catharanthine	Vindoline	
139.9 b	107.26 a	28.9 a	45.9 a	0
246.1 b	83.12 a	218.9 a	6.2 a	5
646.0 a	159.27 a	319.5 a	3.3 a	10
195.7 b	53.99 a	92.9 a	213.0 a	20
22.9 b	2.71 a	1.8 a	5.2 a	30
0.5 b	9.17 a	0.7 a	0.0 a	45

الاحرف المتشابهة لا تختلف معنوياً حسب اختبار دنكن 0.05

Catharanthus roseus Leaves,
Molecules,(17):8742-8752

المصادر

Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell Culture. J. Med. P. Res., (3): 1222-1239.

Leveque, D.; Wihlm, J. and Jehl, F. 1996. Pharmacology of Catharanthus alkaloids. Bull. Cancer, (83):176-186.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A resived medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, (15): 473-497.

Mulabagal, V.and H-S. Tsay .2004.Plant Cell Cultures-An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites .Int .J.Appl .Sci.Eng.,2(1) 29-48.

الخطيب، أقبال، نبيل خلف العاني، بان عبد الجبال .2009. دراسة بعض العوامل للكشف عن القلويدات في نبات عين البزون بالزراعة النسيجية. المجلد(22) والعدد (2) 2009.

ابو زيد، الشحات نصر. 2006. فسيولوجيا وكيمياء القلويدات في النباتات الطبية وأهميتها الدوائية والعلاجية. دار الكتب العلمية للنشر و التوزيع ، القاهرة.

Ferreres, F.; D.M. Pereira ; P.C. Valent; P.B. Andrade; R.M. Seabra and M S.mayor. 2008. New Phenolic Compounds and Antioxidant Potential of *Catharanthus roseus*. J. Agric. Food Chem. American Chemical Society, 56 (21): 9967– 9974.

Fansong Mu , L. Yang , W. Wang , M. Luo,Y. Fu,X. Guoand Y. Zu . 2012.

Negative – Pressure Cavitation Extraction of Four Main Vinca Alkaloids from

- Shohji, T.; Yamada, Y. and Hashimoto ,T. 2000. Jasmonate induction of putrescine N-Nicotiana sylkvesferase genes in the root of Nicotiana sylvestris . Plant Cell Physiol . 41: 831-839.
- Van der Heijden, R.; D.I. Jacobs; W. Snoeijer; D. Hallard and R. Verport 2004.The Catharanthus alkaloids: Pharmacognosy and biotechnology. Curr. Med. Chem., 11(5): 607-628.
- Staba,E.J. 2000.Plant tissue culture as a source of bio chemicals .CRC Press ,Inc .Boca raton ,Florida :1-271.
- Smith,J.I., Smart, N.S.,Kurz,W.G.W.and Nisawa.M. 1987.Elicitors effect on secondary Products.Plant Med.53:470-474
- SAS. 2004.SAS /STAT Users Guide for personal computer, SAS Institute Inc, Cary, N.C. USA.