



المجلة العلمية لجامعة الملك فيصل

The Scientific Journal of King Faisal University

العلوم الأساسية والتطبيقية
Basic and Applied Sciences

Molecular Studies on the Effects of Auxins and Cytokinins on Vinca Rosae, Grown by Plant Tissue Culture

Sumayah I. Alsanie, Mohey Elden K. Beharry and Mona S. Alahmadi

Biology Department, Collage of Science, Imam Abdulrahman Bin Faisal University, Dammam, Saudi Arabia

دراسات جزيئية لتأثير الهرمونات النباتية على نبات الونكة النامية بواسطة الزراعة النسيجية

سمية إبراهيم الصانع ومحي الدين بحري ومنى الأحمدى

قسم الأحياء، كلية العلوم، جامعة الإمام عبد الرحمن بن فيصل، الدمام، المملكة العربية السعودية

KEYWORDS

الكلمات المفتاحية

genetic variations, protein patterns, polymorphism ratio, vinca rosea tissue culture

تباينات وراثية، زراعة أنسجة الونكة، نسبة التماثل، النمط البروتيني

RECEIVED

الاستقبال

25/09/2019

ACCEPTED

القبول

10/05/2020

PUBLISHED

النشر

01/12/2020

<https://doi.org/10.37575/sj/2120>

ABSTRACT

Vinca Rosea (Apocynaceae) is an important medicinal plant. In this study, the tissue culture propagation of vinca, using explants from stems and leaves, was investigated. Single and combined treatments of different phytohormones were added to Murashige and Skoog (MS) media. The genetic variation between cell lines derived from these explants was evaluated using protein electrophoresis and the determination of nucleic acids concentrations. The analysis of protein patterns showed that the number of protein bands in control was 16; indeed, in all treatments that number ranged between 4–33 bands, regardless of explant origin. The polymorphism ratio was high in stem explants treatments through the incubation period in comparison to the control, while that ratio decreased in leaves explants treatments. The treatment with Naphthalene acetic acid (NAA) hormone was the closest to the control sample. It was noticed that the level of protein concentration resulting from stems explants culture was notably higher than those recorded in leaves explants. Measurements of nucleic acids concentrations showed that the highest significant concentration for DNA and RNA resulted from stems explants treatments. In conclusion, it is recommended to use stem explants and NAA hormone to achieve a generation of plants similar to the origin when using tissue culture technique.

المخلص

يعد نبات الونكة Vinca Rosea أحد النباتات الطبية المهمة، وفي هذا البحث تم إكثار هذا النبات عن طريق مزارع الأنسجة النباتية وذلك باستخدام الساق والورقة كمستقطعات نباتية، وزراعتها في بيئة (MS) Murashige and skoog مضافاً لها أحد الهرمونات النباتية في حالة المعاملة المفردة، أو تكون المعاملة مشتركة بين هرمونين أحدهما أوكسين والآخر سيتوكينين؛ وذلك لدراسة تأثيرها على نمو هذا النبات في ظروف الزراعة النسيجية، فنتج عن ذلك تباين في الاستجابة، وتم تقدير هذه التباينات الوراثية عن طريق تحليل الأنماط البروتينية الناتجة من الهجرة الكهربائية للخطوط الخلوية بالإضافة إلى قياس تركيز الأحماض النووية. وأظهر تحليل البروتين أن عدد الحزم في العينة الضابطة هو 16 حزمة، وتراوح العدد بين (4-33 حزمة) في جميع المعاملات الهرمونية بصرف النظر إن كان منشأها من الساق أو الورقة. ولوحظ ارتفاع في نسبة التماثل للعينات الناتجة من مستقطعات السيقان مع العينة الضابطة خلال فترة التحضين، وعلى العكس من ذلك انخفضت بشدة نسبة التماثل هذه في معاملات مستقطعات الأوراق، وكانت المعاملة بهرمون Naphthalene acetic acid (NAA) هي الأكثر تماثلاً مع العينة الضابطة. وبشأن تركيز البروتين وجد أن العينات الناتجة من زراعة مستقطعات السيقان أظهرت تراكيز أعلى من نظائرها الناتجة من مستقطعات الأوراق. كما تم قياس تركيز الأحماض النووية، فظهر أن أعلى تركيز لكل من الـ DNA و RNA كان في العينات الناتجة من مستقطعات السيقان. لهذا نوصي باستخدام مستقطع الساق وهرمون NAA للحصول على نبات مشابه للنبات الأم في مزارع الأنسجة النباتية.

1. المقدمة

نبات الونكة *V. roseus* (Apocynaceae) ويطلق عليه أيضاً *Catharanthus roseus* ينتمي لعائلة من أهم النباتات الطبية عالمياً؛ حيث تعد أوراقه مصدراً للـ indolomonoterpenic alkaloids القلويدات الأندولية أحادية التربينات، مثل الفينيكستين vincristine والفينبلاستين vinblastin وهما من المركبات المضادة للسرطان anticancer التي ثبت نجاحها في علاج الكثير من الأمراض السرطانية، مثل مرض داء هودجكين lymphoma (Ferrerres *et al.*, 2010; Nita Hodgkin lymphoma neoplasms، سرطان الغدد اللمفاوية lymphomas *et al.*, 2013)، الأورام leukemias (Armstrong *et al.*, 1964; Sertel *et al.*, 2011).

استخدمت الونكة أيضاً لعدة قرون لعلاج مجموعة متنوعة من المشاكل الطبية مثل التهابات العين والتهاب الحلق والأورام (Crellin and Philpott *et al.*, 1997)، كما استخدمت كعلاج تقليدي لمرض السكري عند غلي أوراقها أو جميع أجزائها بالماء (Don, 1999)، وأيضاً في علاج الملاريا، وارتفاع ضغط الدم، وأمراض القلب في العديد من البلدان (Nita *et al.*, 2013). أما Naz *et al.* (2015) فدرسوا مدى فاعلية المواد المستخلصة من *Vinca rosea* ووجدوا أن لها تأثيراً قوياً في محاربة نشاط الكائنات الدقيقة ويمكن استخدامها ضد مختلف أنواع التهابات.

من جهة أخرى، تواجه النباتات الطبية وبشكل عام في السنوات الأخيرة انخفاضاً في كميتها وذلك لعدة أسباب. من أجل ذلك تم التوجه إلى تقنية زراعة الأنسجة النباتية Plant tissue culture في زراعة النباتات الطبية كحلٍ وطريقة لتجاوز تلك الصعوبات (Barz *et al.*, 1977). وقد تم استخدام تقنيات زراعة الأنسجة النباتية في العديد من الأبحاث الأكاديمية

لدراسة أدوار الهرمونات في التمايز الخلوي Cytodifferentiation والتعضي Organogenesis (Mineo, 1990)؛ ففي دراسة لـ Tyub *et al.* (2014) على نبات الونكة وجدوا استجابة جيدة للنبات عند زراعتهم لقمم السيقان ومناطق العقد كمستقطعات نباتية في بيئة MS مضاف لها الهرمون NAA وبنزول أمينوبورين BAP (BAP-6-Benzyl Amino Purine) حيث تكشف مباشرة إلى مجموع خضري وجذري.

إن حدوث التباينات في المستنسخات الجسدية somaclonal variation يعد نعمة ونقمة في الوقت نفسه، فعندما يكون الهدف هو مضاعفة المستنسخات clonal multiplication من المستنسخات المرغوبة، فمن الممكن أن ينتج عن ذلك طرز غير مرغوبة تقلل من القيمة التجارية لها، ومن ناحية أخرى فإن التباينات في المستنسخات الجسدية قد ينتج عنها خطوط خلوية ذات طرز وراثية مرغوبة زراعياً وتجارياً (Bhojwani and Dantu, 2013). وقد نوه Lo Schiavo *et al.* (1989) إلى دور الأوكسينات المحفوظة في مثيلة (methylation) المادة الوراثية DNA، وأن هذا قد يكون ضرورياً لإعادة برمجة الخلايا المتخصصة.

ذكر Priest and Austin (1993) أن البيانات المستقاة من تحليل البروتين الكلي للخلية بتقنية SDS-PAGE يمكنها أن تضاهي تقنية البصمة الوراثية DNA fingerprinting في بعض الحالات للتأكد من حدوث التغيرات في المستنسخات الجسدية somaclonal. فقد تم استخدام هذه التقنية في تقييم التباين والاستقرار الوراثي للنباتات المتجددة regenerated plants في نبات القمح (Kiarostami and Ebrahimzadeh, 2001)، والفربيط (EL- (Bekheet, 2004)، والثوم (Kazzaz and Taha, 2002)، وبنجر السكر (Bekheet *et al.*, 2007)، والحنظل (Mohamed *et al.*, 2011)، والزنجبيل (Taha *et al.*, 2013) واللوب الفلسطيني (Farid *et al.*, 2014).

تم استخدام Fisher BioReagents SurePrep RNA/DNA/Protein Purification Kit من شركة Fisher لاستخلاص كل من البروتين و RNA. كما تم استخلاص الـ DNA باتباع طريقة (Edwards *et al.*, 1991) مع التعديل، حيث تمت إضافة الإنزيمات لتفكيك الاستخلاص. وكانت الخطوات كالتالي: تم طحن 0.2 جم من النسيج النباتي بالاستعانة بالنيتروجين السائل، ثم تمت إضافة 800 ميكروليتر μ l من محلول الاستخلاص (200mM Tris-HCl PH 7.5 , 250 mM NaCl , 25 mM EDTA , 0.5 % SDS) مع الاستمرار في طحن النسيج. ينقل المستخلص كاملاً إلى أنبوبة جهاز الطرد المركزي سعة 2 مليلتر، ثم توضع في جهاز الطرد المركزي الثلجي عند درجة حرارة 4 درجة مئوية لمدة دقيقتين عند 5000 لفة بالدقيقة، ثم ينقل الرائق لأنبوبة طرد مركزي جديدة سعة 2 مل ويضاف للرائق 12 μ l من إنزيم RNase من شركة Promega، تغلب الأنابيب بلطف رأساً على عقب من 2-4 مرات، وبعدها تحضن الأنابيب في الحضان عند 37 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة. بعد فترة التحضين تخرج الأنابيب من الحضان، وتترك في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق ثم يضاف 800 μ l من محلول ترسيب البروتين Protein Precipitation من شركة Promega. يمزج الخليط جيداً ثم توضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي الثلجي عند 12,000 لفة بالدقيقة لمدة 3 دقائق. ينقل المعلق المحتوي على الـ DNA إلى أنبوبة طرد مركزي جديدة سعة 2 مليلتر، يضاف (600-700) μ l من كحول الأيزوبروبانول البارد، ثم يحضن في الثلج لمدة تتراوح من 5-10 دقائق. تنقل الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي الثلجي عند 5000 لفة بالدقيقة في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق. يلاحظ ظهور الـ DNA على شكل راسب في قاع الأنبوبة. يترك ليحفظ بالهواء. ثم يعاد تعليقه في 40 μ l من (Tris-EDTA) TE و يحفظ عند -20 درجة مئوية لحين الاستخدام.

2.3.2. فصل البروتين Protein Electrophoresis

تم فصل البروتين الكلي total protein باستخدام جهاز Automated Electrophoresis Station من شركة Bio-Rad، ولتجهيز العينات لعملية الفصل تم استخدام Experiopro260 analysis kit ورقمه 7007101 من شركة Bio-Rad وتم اتباع طريقة الكتل في الفصل.

2.3.3. قياس تركيز الـ DNA و الـ RNA: DNA and RNA Concentration

تم حساب التركيز باستخدام جهاز Nano Drop

2.4. الطرق الإحصائية المستخدمة لتحليل النتائج:

تضمن التحليل الإحصائي لنتائج هذا البحث استخدام برنامج IBM SPSS Statistics إصدار 19. تم استخدام البرنامج لحساب المتوسطات Means معنوية أو غير معنوية، واستخدام الخطأ القياسي، وتم استخدام المدى المتضاعف لدنكن (Duncan-test) لحساب معنوية المتوسطات (Norusis, 1990).

3. النتائج والمناقشة

3.1. تحليل البروتين:

لقد نتج تباين في استجابة المستقطع (ساق أو ورقة) للهرمونات النباتية المختلفة، فيظهر من الجدول (2) والشكل (1) أن هناك معاملات نتج عنها فقط نسيج خلوي callus وهناك أخرى نتج عنها نبات كامل (مجموع جذري وخضري). وتوضح الجداول (3-6)، والشكلان 2 و 3 زيادة في عدد الحزم bands الظاهرة على الهلام مترافقة مع الفترة الزمنية للتحضين في غالبية العينات الناتجة من زراعة مستقطعات السيقان أو الأوراق بالأخص لتلك التي كان النسيج الذي تم استخلاص البروتين منه يمثل مجموعاً خضرياً.

جدول (2): نتائج الزراعة النسيجية لمستقطعات السيقان باستخدام المعاملات الهرمونية المختلفة

المعاملات الهرمونية المفردة	النسيج الناتج	المعاملات الهرمونية المشتركة	النسيج الناتج
NAA	نبات كامل (مجموع جذري وخضري)	IBA+NAA	نبات كامل (مجموع جذري وخضري)
IBA	نبات كامل (مجموع جذري وخضري)	BAP+NAA	نسيج خلوي مع المجموع

ومنذ اكتشاف تقنية زراعة الأنسجة والخلايا النباتية قبل أكثر من نصف قرن مضى، يحاول العلماء فهم التغيرات المظهرية، والفسيولوجية، والكيموحيوية والوراثية المرتبطة بطريقة استجابة الأنسجة لهذه التقنية. ويعتقد أن مزارع الأنسجة تعمل على إنتاج جيل من المستنسخات الجسمية المتباينة (Neelakandan and generation of somaclonal variants (Wang, 2012).

يتمثل الهدف من هذا البحث في تعرف تأثير بعض الأوكسينات والستوكينينات في المزرعة النسيجية لنبات الونكة من خلال دراسة التحليل الجزيئي للأنماط البروتينية والأحماض النووية، بالإضافة إلى دراسة مقارنة لمستقطعات كل من السيقان والأوراق في إنتاج نبات مماثل للنبات الأم. وهذا البحث مستل من رسالة الدكتوراه للباحث الأول بعنوان دور بعض منظمات النمو النباتية في استحثاث التباينات الوراثية في نبات الونكة *Vinca rosea* L. تحت ظروف مزارع الأنسجة (Alsanie, 2016).

2. المواد وطرق العمل

2.1. النبات والبيئة المستخدمتين:

تم الحصول على بذور نبات الونكة *Vinca rosea* من موقع <http://www.outsidepride.com> من الولايات المتحدة الأمريكية. ثم زرعت البذور في الحقل بمدينة الدمام. وللزراعة النسيجية تم استخدام بيئة موراشيغ وسكوج Murashige and skoog basal medium with vitamins من شركة Phytotechnology Laboratories. وللمحد من التلوث تمت إضافة المبيد الفطري (Plant Preservative Mixture) PPM من شركة Phytotechnology Laboratories في البيئة، (Colgecen *et al.*, 2011). وأضيف إلى البيئة الهرمونات النباتية بنزيل أمينوبيورين Benzyl amino purine (BAP)، كينتين Kintine (Ki)، نفتالين حمض الخليك Naphthalene acetic acid (NAA)، إندول حمض البيوتريك Indole butyric acid (IBA)، حمض ثنائي كلوروفينوكسي الأستيك 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4D)، كمعاملات مفردة ومشتركة حسب الجدول (1) ووضح الجدول تراكيز كل معاملة، وتم توفير جميع الهرمونات النباتية من شركة سيجما Sigma.

جدول (1): المعاملات الهرمونية المستخدمة في الدراسة وتركيبتها

المعاملات الهرمونية المفردة	التركيز ملجم/ل	المعاملات الهرمونية المشتركة	التركيز ملجم/ل
NAA	0.75	IBA+NAA	0.3+0.75
IBA	0.3	BAP+NAA	2+0.75
BAP	2	2,4D+NAA	1+0.75
2,4D	1	Ki+NAA	0.3+0.75
		IBA+ BAP	0.3+2
		IBA+2,4D	0.3+1
		BAP+2,4D	2+1
		Ki+2,4D	10.3+

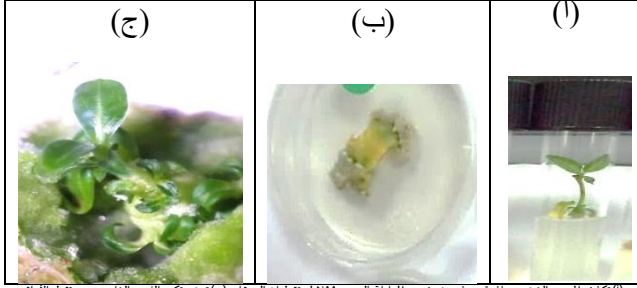
2.2. طريقة الإكثار الدقيق:

تم جمع عينات نبات الونكة *V. rosea* بعد مرور شهرين من الزراعة في الحقل، وتجهيزها للزراعة النسيجية في معامل الوحدات البحثية بكلية العلوم بالدمام في عام 2015م، حيث تم استخدام سيقان وأوراق النبات كمستقطعات نباتية وتم اتباع طريقة كلا من (Mineo, 1990; Fard *et al.*, 2008) في تجهيز العينات للزراعة. وتم التحضين عند درجة حرارة $25 \pm 2^\circ$ م تحت ظروف إضاءة بمصابيح بيضاء فلورسنتية تصل إلى 12 ساعة بشدة إضاءة 2000 لوكس (lux). وبعد مرور الفترة الزمنية المقترحة (شهر ونصف- 4 أشهر ونصف) تم أخذ العينات للفحص والتحليل. تم إجراء إعادة الزراعة sub culture مرة واحدة لمعاملات الفترة شهر ونصف، ومن مرتين إلى 3 مرات لمعاملات الفترة 4 شهور ونصف وذلك حسب احتياج العينة.

2.3. التحاليل الجزيئية:

2.3.1. استخلاص البروتين والأحماض النووية Protein, DNA and RNA Extraction

شكل (1): بعض نتائج المعاملات الهرمونية



(1) تكشف المجموع الخضري مباشرة بعد شهر ونصف من المعاملة بالهرمون NAA+IBA (ب) وتوضيح تكون النسيج الخلوي من مستقطع الأوراق بعد شهر ونصف من المعاملة المشتركة بالهرمون NAA+2,4D (ج). تكشف المجموع الخضري من الأجنة الجديدة somatic embryo بعد المرحلة النسيجية الخلوي في المعاملة المشتركة بالهرمون NAA+ BAP. استقطعات السيقان لمدة 4 أشهر ونصف. تم تصوير هذه الصورة بالمجهر النشري (بقوة تكبير 6.7x).

جدول (4): عدد الحزم وأوزانها الجزيئية بالكيلودالتون (KDa) للمعاملات الهرمونية المختلفة لمستقطعات السيقان بعد مرور 4 أشهر ونصف من الزراعة النسيجية، وموضح نوع النسيج المتكون

No.	L.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
		S++	C	S++	C	S++	C	S++	C	S++	C	S++	C	C
1	150	106.3	204.8	108.3	236.7	248.6	250.2	184.6	129.6	226.9	56.58	243.3	212.2	249.1
2	100	88.2	186.6	74.3	186.5	212.2	75.9	49.2	106.6	188	150.90	143.1	105	223.4
3	75	77.9	106.3	67.1	171	157	69	36.4	94.9	105	54.2	133.5	74.6	130.2
4	50	70.3	91.6	54.9	105.8	109.4	54.5	24.7	90.7	94.5	41	117.2	67.3	105.1
5	37	53.1	78.3	48.3	90.9	93.9	35.3	19.5	79.7	89.8	37.9	106.3	57	93.1
6	25	45.6	63.8	38.1	77.8	73.9	32.4	8.1	67.5	80.3	24.4	93.9	54.8	77.4
7	20	38.8	56.8	36.8	71.4	69.6	27.7	6.8	63.1	74.2	8.8	89.8	50.7	73.5
8	10	35.7	53.4	34.8	69.1	67.5	24.3	6.1	54.2	69.9	7.8	78.9	48.5	66.7
9	8.17	25.8	45.3	31.2	63.6	63.8	14.8		46.4	56.5	7.4	72	43.1	56.5
10	7.09	24	39	26.5	50.1	56.4	12.8		44.8	53.7		69.2	37.3	54.4
11		21.5	35.7	23.8	56.2	53.4	9.9		41.1	44.5		63	34.7	48.3
12		19.4	25.8	11.7	53	44.3	8.4		39.5	40.9		57.3	27.1	44.3
13		17.7	23.7	8.6	48.8	39.8	7.7		36.2	36.6		53.6	24.4	42.5
14		14.5	21.8	8	45.1	35.9	7.2		34.5	35.2		45.9	19.9	38.2
15		8.1	19.5	6.8	42.2	34.3			26.1	26.2		44.4	14.4	37
16		7	17.7	5.8	39.1	25.8			24.1	24.3		40.7	12.3	34.7
17			14.8		36.3	23.7			21.7	22.5		39.1	8.5	30.2
18			11.7		33.7	21.8			19.3	19.8		35.9	7.7	27
19			10.7		30.1	19.5			17.6	18.2		33.8	3.3	24.4
20			8.3		26.1	17.7			14.5	14.8		29.9		21.1
21			7.2		24.1	14.7			11.6	11.8		25.7		14.7
22			2.1		21.9	11.7			7.3	10.6		24		12.2
23					20.9	10.7				7.7		21.6		8.7
24					19.8	9.9						19.2		7.1
25					18.1	8.6						17.6		4.2
26					15	7.9						14.5		2
27					11.8							11.5		
28					10.9							10.6		
29					10							8.1		
30					9.3							7.1		
31					8.1							6.2		
32					2.1									
33					1.8									
Total bands		16	22	16	33	26	14	8	22	23	9	31	19	26
Unique bands		9	8	12	26	9	9	5	16	14	7	20	14	19
Polymorphic bands		7	14	4	7	17	5	3	6	9	2	11	5	7
% polymorphism		43.75	63.63	25	21.21	65.38	35.71	37.5	27.27	39.13	22.22	35.48	26.32	26.92

البيانات المظلة تمثل الحزم البروتينية المتماثلة

1- العينة الضابطة 5- المعاملة المشتركة NAA+ BAP 8- المعاملة المفردة BAP 11- المعاملة المفردة IBA

2- المعاملة المفردة NAA 6- المعاملة المشتركة NAA+KI 9- المعاملة المشتركة BAP+IBA 12- المعاملة المشتركة IBA+ 2,4D

3- المعاملة المشتركة NAA+2,4D 7- المعاملة المشتركة IBA+ 2,4D 10- المعاملة المشتركة NAA+KI 13- المعاملة المشتركة IBA+ 2,4D

4- المعاملة المشتركة NAA+IBA 14- المعاملة المشتركة IBA+ 2,4D 15- المعاملة المشتركة NAA+KI 16- المعاملة المشتركة IBA+ 2,4D

Shoots = s, Ladder = L, callus = c, roots = r

جدول (5): عدد الحزم وأوزانها الجزيئية بالكيلودالتون (KDa) للمعاملات الهرمونية المختلفة لمستقطعات الأوراق بعد مرور شهر ونصف من الزراعة النسيجية، وموضح نوع النسيج المتكون

No.	Ladder	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1	150	106.3	61.1	24.7	54.8	75.4	185.9	108.5	92.6	35.1	105.6	108.8
2	100	88.2	55.2	8.1	46.8	68.6	80.8	90.2	83.4	9.4	90.7	103.8
3	75	77.9	49.5	7.4	43.9	57.4	58.4	57.7	73	8.3	70.5	93.7
4	50	70.3	46.9	4.7	39.9	54.2	44.5	47.3	58.4	7	58.2	90
5	37	53.1	40.3		37	48	40.8	43.4	55.7		40.2	78.6
6	25	45.6	37.2		34.2	44.9	37.1	40.5	45.6		37	67.4
7	20	38.8	35.9		14.2	41.2	35.3	36.8	42.2		34.5	64.3
8	10	35.7	31.6		8.7	37.6	29.1	34.7	40.2		29.1	57.3
9	8.2	25.8	27.1		8.1	26.3	27.1	29.1	27.1		23.9	52.6
10	7.1	24	24		7.2	21.9	24	27	24.8		8.3	47.2
11		21.5	21.3		5.9	19.5	17.7	24.5	22.5		7.6	43.1
12		19.4	8.2			17.8	7.7	21.7	20.3		7.1	40.2
13		17.7	7.1			14.7	7.2	18.1	18.3			36.9
14		14.5				8.1		11.6	15.3			34.6
15		8.1				7.3		8.5	9.3			29.3
16		7						7.1	8.2			26.7
17									7.6			24.1
18												21.6
19												17.7
20												11.6
21												10.2
22												9.6
23												8.5
24												7.1
Total bands		16	13	4	11	15	13	16	17	4	12	24
Unique bands		11	9	3	8	14	7	12	11	2	6	19
Polymorphic bands		5	4	1	3	1	6	4	6	2	6	5
% polymorphism		31.25	30.76	25	27.27	6.66	46.15	25	35.29	50	50	20.83

البيانات المظلة تمثل الحزم البروتينية المتماثلة

1- العينة الضابطة 2- المعاملة المفردة NAA 3- المعاملة المشتركة NAA+2,4D 4- المعاملة المشتركة NAA+IBA

5- المعاملة المشتركة NAA+ BAP 6- المعاملة المشتركة NAA+KI 7- المعاملة المشتركة KI+2,4D 8- المعاملة المشتركة BAP+IBA

9- المعاملة المشتركة IBA+ 2,4D 10- المعاملة المشتركة IBA+ 2,4D 11- المعاملة المشتركة IBA+ 2,4D 12- المعاملة المشتركة IBA+ 2,4D

Shoots = s, Ladder = L, callus = c, roots = r

الخضري	خضري وجذري	BAP
نسيج خلوي (كالس)	2,4D+NAA	سيقان وأوراق
نسيج خلوي و جذور	Ki+NAA	نسيج خلوي
سيقان وأوراق	IBA+ BAP	
نسيج خلوي	IBA+ 2,4D	
نسيج خلوي	BAP+ 2,4D	
نسيج خلوي	Ki + 2,4D	

وسجلت المعاملة الهرمونية المشتركة NAA+IBA (البروتين تم استخلاصه من المجموع الخضري والجذري للنبات المتكشف) (رقم 4) الناتجة من زراعة مستقطع الساق أعلى ظهور لعدد الحزم البروتينية على الهلام: فقد وصل إلى 33 حزمة بوزن جزيئي (1.8-236.7 kilodalton (kDa)) بعد مرور 4 شهور ونصف من الزراعة، أما في العينة الضابطة فقد وجدت 16 حزمة للبروتين بوزن جزيئي (7-106.3 kDa) ولوحظ أيضاً أنه أقل من الوزن الجزيئي لغالبية العينات الناتجة من الزراعة النسيجية، وهذا الاختلاف دليل على حدوث تباينات وراثية بسبب المعاملات الهرمونية في المزارع النسيجية، فقد ذكر Gutmann *et al.* (1996) أن دورة الخلية تحدث عن طريق تركيب عدة بروتينات جديدة والتي تكون سبباً في إحداث تغيرات مظهرية وكميحية في الخلية أثناء نشاط الانقسام الميتوزي mitotic activity. وذكر (Silveira *et al.* (2004) أن مستويات البروتين الخلوي Intracellular proteins ترتفع خلال مرحلة النمو الأسية exponential growth phase في المزارع المعلقة suspension cultures لنبات الصنوبر *Pinus taeda* المضاف لها هرموني Ki و 2,4D، وهذا ما أفاد به أيضاً Junaid *et al.* (2007) من أن الأحماض الأمينية والمحتوى البروتيني يزداد تدريجياً مع التقدم في مراحل تكوين الأجنة الجسدية stages of somatic embryogenesis النامية في بيئة MS مضاف لها هرموني NAA و BA لنبات الونكة *C. roseus*، ووجد (Naseer and Mahmood (2014) أنه عند زيادة تركيز هرمون BAP في بيئة الإكثار regeneration media لنبات الباذنجان *Solanum melongena* يزداد تبعاً له المحتوى البروتيني للنباتات المعاد إكثارها regenerated plants.

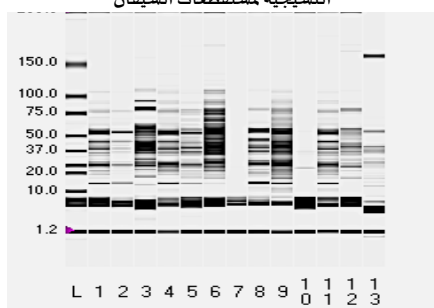
جدول (3): عدد الحزم وأوزانها الجزيئية بالكيلودالتون (KDa) للمعاملات الهرمونية المختلفة لمستقطعات السيقان بعد مرور شهر ونصف من الزراعة النسيجية، وموضح نوع النسيج المتكون

No.	L	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
		S++	C	S++	S+C	C+	C	S	S	C	S++	C	C	C
1	150	106.3	106.4	92.7	116.4	130	187.5	78.6	108.9	118.4	55.1	209.1	187.6	166.01
2	100	88.2	92.3	82.6	106	105	133.8	40.4	94.4	106.7	36.7	116.5	176.1	54.7
3	75	77.9	78.1	58.9	89	89.8	123.7	27.2	80.9	90.6	23.5	106	109.2	40.92
4	50	70.3	56.7	55.4	78.2	80.2	117.6	24.1	71.4	78.9	8.6	91.7	105.2	38.18
5	37	53.1	53.6	53.5	53.1	77.7	108.8	8	64.9	68.4	7.7	89	94	30.19
6	25	45.6	51.5	51.1	45.4	74.2	105.3	7.5	55.2	56.8	6.6	78.1	90.4	25.43
7	20	38.8	45.7	48.6	39.2	67.7	94.1		46.9	53.7		69.2	80.9	23.91
8	10	35.7	42	41.7	36.1	56.7	90.2		40.2	49.2		56.5	78.9	20.09
9	8.17	25.8	39.4	38.3	33.9	53.2	80.5		37.1	44.8		52.9	74.6	18.77
10	7.09	24	36.3	36.2	26.2	47	78.5		35.3	41.4		45.4	69.7	17.21
11		21.5	34.7	30	24.1	44.1	74.7		26.3	39.9		42.2	67.9	15.65
12		19.4	27.7	27.4	21.7	40.1	67.7		22.3	36.8		40.4	57.4	14.35
13		17.7	25.6	24.8	19.5	36.7	54.1		20.4	26.5		38.9	53.1	12.91
14		14.5	23.8	22.6	17.6	25.9	47.4		18.5	22.5		36.1	49.3	9.02
15		8.1	21.6	18.3	14.7	23.8	44.4		15.2	19.7		34.1	47.5	7.85
16		7	15	13.6	11.6	21.6	40.9	12	17.4			29.9	43.2	6.69
17			7.8	7.8	10.7	17.8	37.4		11.2	14.7		27.9	40.7	
18			7	7.3	8.3	14.8	35.3		10	11.8		25.9	39.1	
19					11.6	29.4		7.6	10.8			24	37.1	
20					7.7	27.4			9.9			21.8	34.6	
21					7.9	24.3			8.9			19.4	29.3	
22						7	21.7		7.7			17.7	26.8	
23							19.2					14.6	24.4	
24							17.6					11.5	21.7	
25							14.5					10.7	17.7	
26							7.2					8.4	14.6	
27												7.1	11.8	
28													8.6	
29													7	
Total bands		16	18	18	19	22	26	6	19	22	6	27	29	16
Unique bands		10	16	16	7	14	19	4	16	18	3	15	19	16
%Polymorphic bands		6	6	2	12	8	7	2	3	4	3	12	10	0
%polymorphism		37.5	33.33	11.11	63.15	25	26.92	33.33	15.78	18.18	50	44.44	34.48	0

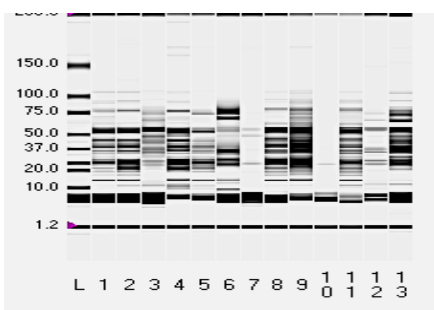
يزداد تركيز البروتين من قبل حدوث التمايز. وأضاف Singh *et al.* (2011) أنه في مزارع النسيج الخلوي لنبات ستيفيا *Stevia rebaudiana* وُجد خلال مرحلة تمايز الجذور والسيقان انخفاض في نواتج الأيض، بينما يزداد البروتين الكلي الذائب في مزارع النسيج الخلوي.

أيضاً لوحظ من النتائج أن الوزن الجزيئي للبروتين الكلي في العينة الضابطة (7- 106.3 kDa) أقل من الوزن الجزيئي لغالبية العينات الناتجة من الزراعة النسيجية، وهذا ما أشار إليه Sachs and Ho (1986) بأن النشاط الجيني الناتج بسبب المحفزات البيئية يؤدي دوراً مهماً في تكيف النباتات وتحفيزها لإنتاج بروتينات خاصة لمقاومة هذا الإجهاد، وأفاد Mohamed *et al.* (2011) بأن النسيج الخلوي callus والمزارع الخلوية تعد مصدراً غنياً للبروتينات.

شكل (2) : التفريد الكهربائي للبروتين protein electrophoresis للعينات الناتجة من الزراعة النسيجية لمستقطعات السيقان



(أ)



(ب)

في (أ) بعد شهر ونصف من الزراعة، وفي (ب) بعد 4 شهور ونصف من الزراعة، والعينات كالتالي:

1- العينة الضابطة	5- المعاملة المشتركة NAA+	8- المعاملة المفردة BAP	11- المعاملة المفردة IBA
2- المعاملة المفردة NAA	BAP	9- المعاملة المشتركة BAP+IBA	12- المعاملة المشتركة
3- المعاملة المشتركة	6- المعاملة المشتركة NAA+Ki	10- المعاملة المشتركة	13- المعاملة المفردة
4- المعاملة المشتركة	7- المعاملة المشتركة	11- المعاملة المفردة 2,4D	14- المعاملة المفردة
	Ki+2,4D	12- المعاملة المشتركة BAP+2,4D	15- المعاملة المفردة 2,4D

ولوحظ أن نسبة تماثل العينة الضابطة (رقم 1) مع العينات الناتجة من مستقطعات السيقان ارتفعت بنهاية فترة التحضين (من 37.5 إلى 43.75%)، وعلى العكس من ذلك انخفضت بشدة نسبة التماثل هذه في معاملات مستقطعات الأوراق (من 31.25 إلى 1%). وذلك يتفق مع Krsnik- *et al.* (2001) Rasol حيث ظهرت لديهم اختلافات بحزم محددة عند مقارنة البروتين الخلوي لأربع خطوط نسيجية مختلفة المنشأ لنبات بنجر السكر *Beta vulgaris* L. var. *altissim*. وأيضا ذكر Mohamed *et al.* (2011) أن اختلاف الاتحادات بين منظمات النمو النباتية ينتج عنه اختلافات في الحزم البروتينية للنسيج الخلوي لنبات الحنظل *Citrullus colocynthis*. ووجد Kazmi *et al.* (2015) أن نسب عدد الحزم البروتينية المتماثلة بين العينات الناتجة لديهم من الزراعة النسيجية كان 29% لنبات المندرين *Citrus reticulata blanco*.

وقد كان أكثر المعاملات الهرمونية تشابها بالعينة الضابطة هي المعاملة بهرمون NAA بواقع 4 حزم بروتينية مشتركة بينهما عند زمن 4 شهور ونصف، والتي نتج عنها تكون للمجموع الجذري والخضري. ووجد بشأن التركيز الكلي للبروتين، كما يظهر في الجدول (7) والشكل (3)، أن العينات الناتجة من زراعة مستقطعات السيقان أظهرت تراكيز أعلى من نظائرها الناتجة من مستقطعات الأوراق. وقد أشار Taghian و Fahmy (1998) إلى أن التباينات في المستنسخات الجسدية somaclonal variation في نبات قصب السكر تعتمد على التباينات في المحتوى البروتيني، وذلك لا يتفق مع Ali *et al.* (2010) حيث وجدوا عند الزراعة النسيجية لنبات *Stevia rebaudiana* أن أعلى محتوى للبروتين الكلي المذاب total soluble protein contents كان في مستقطعات الأوراق، يليها مستقطعات العقد ثم السلاميات.

جدول (6) : عدد الحزم وأوزانها الجزيئية بالكيلودالتون (kDa) للمعاملات الهرمونية المختلفة لمستقطعات الأوراق بعد مرور 4 أشهر ونصف من الزراعة النسيجية، وموضح نوع النسيج المتكون.

No.	Ladder	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1	150	106.3	98.7	241.3	213.9	241.6	234.8	238.2	172.4	186.4	187.3	117.2
2	100	88.2	81.9	131.5	40.5	75.5	187.5	155.9	159.4	146.2	68.2	105.2
3	75	77.9	75.6	103.2	37.3	68.8	124.4	124.6	107.9	142.9	58.2	93.9
4	50	70.3	69	96.4	19.8	34.8	116.4	121.8	95.7	133	54.8	89.9
5	37	53.1	56	80	17.8	7.8	108.3	90.4	90.9	124.5	24.2	80.8
6	25	45.6	49.5	74.9	8.7	6.9	105	80.4	80	117	8.2	78.4
7	20	38.8	37.7	67.3	8		93.5	56.7	70.7	108.5	6.8	75.2
8	10	35.7	34.7	55.4	7.2		90.1	48.6	54.2	93.8		67.5
9	8.2	25.8	32.1	43.8			86.8	39.8	46.4	90		57.7
10	7.1	24	27.6	40.2			80.4	36.7	41.3	78.2		54
11		21.5	24.7	37.2			74.6	26.6	39.7	75.3		51.2
12		19.4		34.7			68	23.9	36.7	69.4		45.9
13		17.7		23.8			53.4	21	34.3	56		42.8
14		14.5		21.3			48.7	11.6	30.6	50.2		40
15		8.1		19.3			47.1	8.3	26.4	47.5		36.9
16				14.4			44.2	7.4	24.4	41		32.6
17				7.9			40.9		22	35.1		30.1
18				6.9			39.3		19.7	29.4		26.7
19							37.4		17.9	27.1		24.3
20							35.4		14.9	24.9		21.2
21							29.1		11.9	22.6		17.7
22							27.4		10.1	14.6		11.9
23							24.6		9	9.5		7.1
24							22.5		7.5	8		
25							18.1			7.4		
26							14.9					
27							12.7					
28							9.5					
29							7.9					
Total bands		16	12	18	8	6	29	16	24	25	7	23
Unique bands		15	9	14	7	5	25	13	20	21	7	21
Polymorphic bands		1	3	4	1	1	4	3	4	4	0	2
% polymorphism		6.25	25	22.22	12.5	16.66	13.79	18.75	16.66	16	0	8.69

العينات المظلة تمثل الحزم البروتينية المتماثلة

1- العينة الضابطة	5- المعاملة المشتركة NAA+	8- المعاملة المشتركة	10- المعاملة المشتركة IBA+
2- المعاملة المفردة NAA	BAP	9- المعاملة المشتركة	11- المعاملة المفردة 2,4D
3- المعاملة المشتركة	6- المعاملة المشتركة NAA+Ki	10- المعاملة المشتركة	12- المعاملة المفردة 2,4D
4- المعاملة المشتركة	7- المعاملة المشتركة	11- المعاملة المفردة 2,4D	13- المعاملة المفردة

وبشكل عام اتضح في هذا البحث أن تركيز البروتين الكلي المستخلص من الأنسجة الخلوية calluses فقط كان أقل مقارنة بالمستخلص من المجموع الجذري والخضري الناتج من المعاملات الهرمونية. وهذا يتفق مع ما لاحظته Singh *et al.* (2011); Mohapatra and Rath (2005) من أن إجمالي البروتين المذاب في النسيج الخلوي الناتج من الجذر والساق يكون أعلى خلال تمايز ذلك النسيج الخلوي إلى جذر وساق مقارنة بالنسيج الخلوي كعينة ضابطة، فمند بدء تمايز الخلايا يبدأ تكوين بروتينات جديدة وبالتالي

وهذا يتفق لما ذكره Kieber (2002) بأن وجود السيبتوكينيات يشجع على الانقسام الخلوي أو الانقسام السيتوبلازمي في جذور وسقان النباتات، وهي تشارك في المقام الأول في نمو الخلايا والتمايز. ووجد Tiwari *et al.* (2012) أن عزل المادة الوراثية DNA من نبات الونكة باستخدام طريقة CTAB أظهر أن تركيزه كان عالياً في الورقة، يليه في الساق، ثم في الأنسجة المرستيمية. وظهر من مقارنة التركيز بين العينة الضابطة والعينات الناتجة من المعاملات الهرمونية أن العينة الضابطة احتلت الصدارة حيث سجلت 383.8 ng/μl، وهو يختلف بفارق بسيط عن أعلى تركيز لـ DNA الناتج من المعاملة الهرمونية المشتركة BAP+IBA، وهذا يتوافق تقريباً مع ما نتج من دراسة (Obae and West, 2010; Choudhury *et al.*, 2014) بأنه لا توجد فروق معنوية لمحتوى المادة الوراثية DNA content بين النبات الأم والنبات النامي في المعمل الناتج من الزراعة النسيجية.

ولوحظ من جدول (9) أن غالبية الأنسجة التي تم استخلاص الـ RNA منها بتراكيز عالية كانت تضم الأوراق والسيقان، وقد أفاد Niklas *et al.* (2005) بأن حاجة النبات إلى بناء معدلات عالية من البروتينات التي تعوض الضرر الناتج من البناء الضوئي في الأوراق قد يفسر ارتفاع مستويات بناء الـ RNA في الأوراق مقارنة بالكامبيوم الوعائي vascular cambium. ولوحظ أن التراكيز المرتفعة معنوياً لكل من الـ DNA و الـ RNA كانت في غالبية المعاملات قيد الدراسة بعد 4 شهور ونصف من الزراعة النسيجية؛ أي إن التركيز يزداد بالتناسب مع زمن التحضين، وهذا يتفق مع Kato and Asakura (1981) حيث ذكروا أن معدل الـ DNA و الـ RNA يزداد خطياً مع معدل النمو في المزارع الخلوية لنبات التبغ tobacco، وذكر Miguel and Marum (2011) أن هذا التسلسل للأحداث مصحوب بتغيرات على مستوى الكروماتين وإعادة برمجة التعبير الجيني، وإبراز دور تنظيم فوق الجينات epigenetic regulation في هذه الأحداث. كما أفاد Reef *et al.* (2010) بوجود علاقة بين معدل RNA:DNA ومعدل الزيادة في النمو، وذلك بسبب أن بناء البروتين ضروري أثناء النمو النشط واستطالة الخلايا.

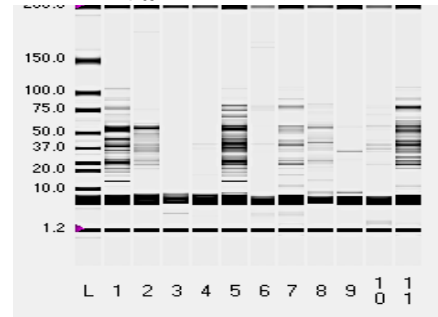
وبينت هذه الدراسة أن تركيز الـ RNA في المعاملة الهرمونية المفردة IBA لمستقطعات السيقان أعلى من تركيزه في العينة الضابطة، وهذا يتفق مع نتائج تحليل البروتين؛ حيث كان متوسط التركيز الكلي للبروتين في العينة الضابطة (1067.2 ng/μl) أقل من متوسط التركيز الكلي للبروتين في المعاملة IBA (2577.40 ng/μl)، وهذا ما أفاد به Mohamed *et al.* (2011) من أن النسيج الخلوي callus والمزارع الخلوية تعد مصدراً غنياً للبروتينات.

جدول (8): تركيز الـ DNA (ng/μl) في العينات الناتجة من مستقطعات السيقان والأوراق ونوع النسيج الذي تم استخلاصه للمعاملات الهرمونية المختلفة خلال فترتي التحضين شهر ونصف و 4 شهور ونصف

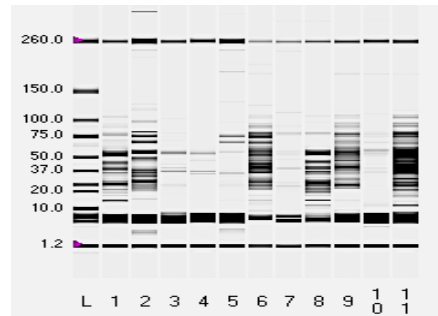
مستقطعات الأوراق (ng/μl)			مستقطعات السيقان (ng/μl)			المعاملة الهرمونية وتركيزها (مغم/ل)
شهر ونصف	شهر ونصف	شهر ونصف	شهر ونصف	شهر ونصف	شهر ونصف	
383.8			383.8			العينة الضابطة
72.5	32.6	نسج خلوي callus	90	38	نبات كامل	NAA 0.75
45.1	54.7	نسج خلوي	91.6	111	نسج خلوي	NAA+2.4D 0.75+1
94	43.7	نسج خلوي	86.6	54.8	نبات كامل	NAA+IBA 0.75+0.3
44.1	29.4	نسج خلوي	54.8	39.8	نسج خلوي مع المجموع الخضري	NAA+ BAP 0.75+2
103.1	95.1	نسج خلوي مع جذور	176.4	159.1	نسج خلوي وجذور	NAA+Ki 0.75+0.3
44.3	26.1	نسج خلوي	157.5	78.4	نسج خلوي	Ki+2.4D 0.3+1
0	0	نسج خلوي	94	65.3	سيقان وأوراق	BAP 2
55.9	53.4	نسج خلوي مع المجموع الخضري	300.4	107.6	سيقان وأوراق	BAP+IBA 2+0.3
40.8	59.3	نسج خلوي	17.9	17	نسج خلوي	BAP+2.4D 2+1
0	0	نسج خلوي	102.3	67	نبات كامل	IBA 0.3
22	23.5	نسج خلوي	43.2	34.7	نسج خلوي	IBA+2.4D 0.3+1
44.3	37.9	نسج خلوي	99.1	61.9	نسج خلوي	2.4D 1

الأحرف الصغيرة المرفقة بالتركييزات دليل على وجود فروقات معنوية بداخل الصف عند مستوى معنوية 0.05.

شكل (3): التفريد الكهربائي للبروتين protein electrophoresis للعينات الناتجة من الزراعة النسيجية لمستقطعات الأوراق



(i)



(ب)

في الشكل (i) بعد شهر ونصف من الزراعة، وفي الشكل (ب) بعد 4 شهور ونصف من الزراعة، والعينات كالتالي:

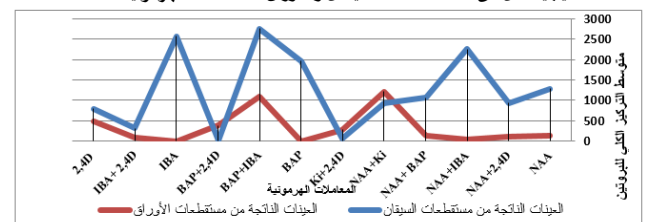
1- العينة الضابطة	5- المعاملة المشتركة BAP+IBA	10- المعاملة المشتركة IBA+2,4D
2- المعاملة المفردة NAA	6- المعاملة المشتركة NAA+Ki	11- المعاملة المفردة 2,4D
3- المعاملة المشتركة NAA+2,4D	7- المعاملة المشتركة Ki+2,4D	
4- المعاملة المشتركة NAA+IBA		

جدول (7): متوسط التركيز الكلي للبروتين total concentration of protein (ng/μl) للعينات الناتجة من زراعة كل من مستقطعات السيقان والأوراق في المعاملات الهرمونية المختلفة

المعاملة الهرمونية	التركيز (مغم/ل)	التركيز الكلي للبروتين (ng/μl)	مستقطعات الأوراق (ng/μl)
العينة الضابطة	0	1067.2	126.93
NAA	0.75	1286.03	108.20
NAA+2.4D	0.75+1	939.87	30.63
NAA+IBA	0.75+0.3	2257.30	133.40
NAA+ BAP	0.75+2	1067.06	1215.30
NAA+Ki	0.75+0.3	933.76	279.10
Ki+2.4D	0.3+1	62.16	000
BAP	2	1966.63	000
BAP+IBA	2+0.3	2759.60	1090.43
BAP+2.4D	2+1	251.77	390.53
IBA	0.3	2577.40	000
IBA+2.4D	0.3+1	319.06	90.57
2.4D	1	792.49	481.10

الأحرف الصغيرة المرفقة بالمتوسطات دليل على وجود فروقات معنوية بداخل العمود عند مستوى معنوية 0.05.

شكل (4): العلاقة بين متوسط التركيز الكلي للبروتين (ng/μl) في العينات الناتجة من الزراعة النسيجية لكل من مستقطعات السيقان والأوراق للمعاملات الهرمونية المختلفة.



3.2. تقدير كمية الأحماض النووية:

لوحظ من جدول (8) أن أعلى محصول لـ DNA (300.4 نانوجرام/ميكروليتر (ng/μl)) للمعاملة الهرمونية المشتركة BAP+IBA نتج عن استخلاصه من نسيج السيقان والأوراق المتكشفة من مستقطع الساق،

المحتوى البروتيني للعوائل النباتية بالملكة العربية السعودية، كذلك تعريف السلالات الميكروبية (بالأخص البكتيريا) المتواجدة في التربة. تم نشر العديد من الأبحاث في مجلات علمية مصنفة في قائمة NCAAA السعودية، وتحكيم العديد من الأبحاث للمجلات العلمية في مجال التخصص.

المراجع

- Ali, A., Gull, I., Naz, S., and Afghan, S. (2010). Biochemical investigation during different stages of in vitro propagation of *Stevia rebaudiana*. *Pakistan Journal of Botany*, 42(4), 2827–37.
- Alsanie, S. (2016). *Role of Some Plant Growth Regulators in Inducing Genetic Variability in Vinca Rosea L. Plant under Tissue Culture Conditions*. PhD thesis, Imam Abdulrahman Bin Faisal University, Dammam, Saudi Arabia.
- Armstrong, J.G., Dyke, R.W., and Fouts, P.J. (1964). Vinblastine sulfate treatment of Hodgkin's disease during a pregnancy. *Science*, 143(3607), 703.
- Barz, W., Reinhard, E., and Zenk, M.H. (Eds.). (1977). Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application. In: *Proceedings of the First International Congress on Medicinal Plant Research, Section B*, Springer Science & Business Media, University of Munich, Germany, 6–10/9/1976.
- Bekheet, S. A. (2004). Micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Annals Agric.Sci., Ain Shams Univ.*, Cairo, 49(1), 223–32.
- Bekheet, S. A., Taha, H. S., and Matter, M. A. (2007). In vitro regeneration of sugar beet propagules and molecular analysis of the regenerates. *Arab Journal of Biotechnology*, 10(2), 223–32.
- Bhojwani, S.S., and Dantu, P.K. (2013). Plant tissue culture: An introductory text. India. *Springer*, 51(4), 39–50.
- Choudhury, R. R., Basak, S., Ramesh, A. M., and Rangan, L. (2014). Nuclear DNA content of *Pongamia pinnata* L. and genome size stability of in vitro regenerated plantlets. *Protoplasma*, 251(3), 703–9.
- Colgecen, H., Çalişkan, U.K., and Toker, G. (2011). Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turkish Journal of Biology*, 35(4), 513–20.
- Crellin, J. K., and Philpott, J. (1997). *A Reference Guide to Medicinal Plants: Herbal Medicine Past and Present*. Durham, NC: Duke University Press.
- Don, G. (1999). *Catharanthus roseus. Medicinal Plants of the World*. Totowa, N.J.: Humana Press.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19(6), 1349.
- El-Kazzaz, A. A., and Taha, H. S. (2002). Tissue culture of broccoli and molecular characterization. *Bull. NRC. Egypt*, 27(4), 481–90.
- Fard, F.R., Moieni, A., and Omidbaigi, R. (2008). Effects of different concentrations of α -naphthaleneacetic acid and 6-benzylaminopurine on shoot regeneration of *Vinca minor* L. *J. Agric. Sci.*, 10(4), 337–44.
- Farid, M.M., Hussein, S.R., Ibrahim, L.F., El-Desouky, M.A., Elsayed, A.M., and Saker, M.M. (2014). Shoot regeneration, biochemical, molecular and phytochemical investigation of *Arum palaestinum* Boiss. *African Journal of Biotechnology*, 13(34), 3522–30. Available at: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/122212> (accessed on 6/3/2020)
- Ferreres, F., Pereira, D.M., Valentão, P., Oliveira, J. M., Faria, J., Gaspar, L., Sottomayor, M., and Andrade, P. B. (2010). Simple and reproducible HPLC–DAD–ESI-MS/MS analysis of alkaloids in *Catharanthus roseus* roots. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(1), 65–9.
- Gutmann, M., von Aderkas, P., Label, P., and Lelu, M.A. (1996). Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *Journal of Experimental Botany*, 47(12), 1905–17.

جدول (9): تركيز RNA (ng/µl) في العينات الناتجة من مستقطعات السيقان والأوراق ونوع النسيج الذي تم استخلاصه للمعاملات الهرمونية المختلفة خلال فترتي التحضين شهر ونصف و 4 شهور ونصف.

العاملة الهرمونية وتركيزها (ملغم/ل)	النسيج الناتج والذي تم استخلاصه	مستقطعات السيقان (ng/µl)		مستقطعات الأوراق (ng/µl)	
		شهر ونصف	4 شهور ونصف	شهر ونصف	4 شهور ونصف
العينات الضابطة			98.7		
NAA 0.75	نبات كامل	44.7	68.9	41.8	48.9
NAA+2,4D 0.75+1	نبات كامل	88.1	16.1	17.3	27.4
NAA+IBA 0.75+0.3	نبات كامل	30.2	68.8	15.4	48.9
NAA+BAP 0.75+2	نسيج خلوي مع المجموع الخضري	41.7	50.2	53.1	32
NAA+Ki 0.75+0.3	نسيج خلوي و جذور	42.9	45.7	55	66.4
Ki+2,4D 0.3+1	نسيج خلوي	29.35	60	18	42.7
BAP 2	سيقان وأوراق	75.8	94.7	0	0
BAP+IBA 2+0.3	سيقان وأوراق	66.3	76.4	31.9	37.5
BAP+2,4D 2+1	نسيج خلوي	21.6	43	16.19	27.7
IBA 0.3	نبات كامل	44.9	132	0	0
IBA+2,4D 0.3+1	نسيج خلوي	50.7	60.4	42.2	32
2,4D 1	نسيج خلوي	15.4	33	22.6	38.4

الأحرف الصغيرة المرفقة بالتركيبات دليل على وجود فروقات معنوية بداخل الصف عند مستوى معنوية 0.05.

شكر وتقدير

نشكر مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية على تمويلها هذا البحث برقم P-S-12-0669.

نبذة عن المؤلفين

سمية إبراهيم الصانع

قسم الأحياء، كلية العلوم، جامعة الإمام عبد الرحمن بن فيصل، الدمام، المملكة العربية السعودية، 00966503495357، sualsanea@iau.edu.sa

أستاذ مساعد في تخصص الوراثة، عضو هيئة تدريس بقسم الأحياء، بكلية العلوم في جامعة الإمام عبد الرحمن بن فيصل بالدمام. تم الحصول على درجة البكالوريوس في العلوم والتربية تخصص نبات من جامعة الأميرة نورة بالرياض، والماجستير تم الحصول عليه من نفس الجامعة عن بحث في مجال الوراثة الميكروبية، وتم الحصول على الدكتوراه من جامعة الإمام عبد الرحمن بن فيصل بالدمام، الاهتمامات البحثية في علم النبات، الوراثة الخلوية، الأحياء الجزيئية، زراعة الأنسجة النباتية، تصنيف النباتات و الوراثة الميكروبية.

محيي الدين كامل محمد بحيري

قسم الأحياء، كلية العلوم، جامعة الإمام عبد الرحمن بن فيصل، الدمام، المملكة العربية السعودية، 00966501283255، 00966564273113، mbeharry@iau.edu.sa، moheykamel@gmail.com

أستاذ مشارك في كلية العلوم بقسم الإحياء جامعة الإمام عبد الرحمن بن فيصل، التخصص العام نبات (تصنيف نباتات زهرية)، والتخصص الدقيق تصنيف خلوي. دكتوراه بنظام الإشراف المشترك بين جامعتي المنيا (جمهورية مصر العربية) ومعهد نبات جامعة فينا (النمسا)، اشترك بعدة مشروعات بالتعاون مع معهد نبات جامعة فينا وأكاديمية البحث العلمي بمصر (القاهرة) وعمادة البحث العلمي جامعة الإمام عبد الرحمن بن فيصل. حضر العديد من المؤتمرات. أشرف على ستة رسائل ماجستير وعدد اثنان من رسائل الدكتوراه.

محيي سعود عباس الاحمدي

قسم الأحياء، كلية العلوم، جامعة الإمام عبد الرحمن بن فيصل، الدمام، المملكة العربية السعودية، 00966505907018، malahmadi@iau.edu.sa

أستاذ الوراثة الخلوية المساعد، عضو هيئة تدريس بقسم الأحياء بجامعة الإمام عبد الرحمن بن فيصل بالدمام. تم الحصول على درجة البكالوريوس بتخصص النبات والأحياء الدقيقة من جامعة الملك سعود بالرياض والماجستير من قسم الأحياء بجامعة الملك عبد العزيز بجدة. اتقان اللغة الانجليزية بالإضافة إلى اللغة الام العربية. مجالات الاهتمامات البحثية التركيز على تأثير المبيدات المستخدمة بالمجال الزراعي، دراسة وتعريف

USA: Library of Congress.

- Obae, S.G., and West, T.P. (2010). Nuclear DNA content of *Hydrastis canadensis* L. and genome size stability of in vitro regenerated plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **102**(2), 259–63.
- Priest, F.G. and Austin, B. (Eds.). (1993). *Modern Bacterial Taxonomy*. 2nd edition. London, United Kingdom: Chapman and Hall.
- Reef, R., Ball, M.C., Feller, I. C., and Lovelock, C.E. (2010). Relationships among RNA: DNA ratio, growth and elemental stoichiometry in mangrove trees. *Functional Ecology*, **24**(5), 1064–72. Available at: <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2435.2010.01722.x> (accessed on 6/3/2020)
- Sachs, M.M., and Ho, T. H.D. (1986). Alteration of gene expression during environmental stress in plants. *Annual review of plant physiology*, **37**(1), 363–76.
- Sertel, S., Fu, Y., Zu, Y., Rebacz, B., Konkimalla, B., Plinkert, P. K., Krämer, A., Gertsch, J., and Efferth, T. (2011). Molecular docking and pharmacogenomics of *Vinca* alkaloids and their monomeric precursors, vindoline and catharanthine. *Biochemical Pharmacology*, **81**(6), 723–35. DOI: 10.1016/j.bcp.2010.12.026.
- Silveira, V., Floh, E. I. S., Handro, W., and Guerra, M. P. (2004). Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **76**(1), 53–60.
- Singh, N., Yadav, K., and Kumari, S. (2011). Metabolic changes during differentiation in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Journal of Phytochemistry*, **3**(3), 63–67. Available at: <https://updatepublishing.com/journal/index.php/jp/article/view/2228> (accessed on 6/3/2020)
- Taghian, A.S., and Fahmy, F.G. (1998). Genetical studies on sugarcane plants derived from tissue culture. *Assiut J Agric Sci*, **9**(1), 113–31.
- Taha, H.S., Abbas, M.S., Aly, U.I., and Gaber, E.I., (2013). New aspects for callus production, regeneration and molecular characterization of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Med Aromat Plants*, **2**(141), 2167–412. DOI: 10.4172/2167-0412.1000141.
- Tiwari, K.L., Jadhav, S.K., and Gupta, S. (2012). Modified CTAB Technique for Isolation of DNA from some Medicinal Plants. *Research Journal of Medicinal Plant*, **6**(1), 65–73. DOI: 10.3923/rjmp.2012.65.73.
- Tyub, S., Kamili, A. N., and Mansoor Bhat, M. (2014). Rapid micropropagation and conservation method, in the face of changing climate for *Vinca rosea* L. A potential plant of high medicinal value. *Green India: Strategic Knowledge For Combating Climate Change—Prospects And Challenges*, n/a, 69–75.
- Junaid, A., Mujib, A., Sharma, M. P., and Tang, W. (2007). Growth regulators affect primary and secondary somatic embryogenesis in Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* L. G. Don at morphological and biochemical levels. *Plant Growth Regulation*, **51**(3), 271–81. DOI:10.1007/s10725-007-9171-5.
- Kato, A., and Asakura, A. (1981). Relationships between nucleic acid, nitrogen, and growth rate of tobacco cells in suspension culture. *European Journal of Applied Microbiology and bBiotechnology*, **12**(1), 53–7.
- Kazmi, K., Khan, S., Mirbahar, A., and Kayani, H. (2015). Comparative protein production profiling of (*Citrus reticulata* blanco) among tissue culture stages by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). *The Natural Products Journal*, **5**(3), 186–190. DOI: 10.2174/2210315505999150911120554.
- Kiarostami, K. H., and Ebrahimzadeh, H. (2001). Changes of proteins and oxidative enzymes in seeds and in vitro regenerated plants of three Iranian cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Botany (Pakistan)*, **33**(3), 257–66. Available at: http://www.sciencepub.net/report/report0612/002_27653report061214_8_19.pdf (accessed on 6/3/2020)
- Kieber, J.J. (2002). Tribute to Folke Skoog: Recent advances in our understanding of cytokinin biology. *Journal of Plant Growth Regulation*, **21**(1), 1–2. DOI: 10.1007/s003440010059.
- Krsnik-Rasol, M., Cipic, H., Poljuha, D., and Hagege, D. (2001). Electrophoretic protein patterns of sugar beet tissue lines. *Phyton-Horn*, **41**(1), 13–20.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S., and Terzi, M. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics*, **77**(3), 325–31.
- Miguel, C., and Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, **62**(11), 3713–25. Available at: <https://academic.oup.com/jxb/article/62/11/3713/508854> (accessed on 6/3/2020)
- Mineo, L. (1990). Plant tissue culture techniques. *Tested studies for laboratory teaching*, **11**(n/a), 151–74.
- Mohamed, A.A., El-Baz, F.K., Ali, S.I., Saker, M.M., and Hegazy, A.K. (2011). Alteration of protein patterns in callus cultures of *Citrullus colocynthis* in relation to plant growth regulators. *Insight Biotechnology*, **1**(1), 1–6. Available at: <https://insightknowledge.org/fulltext/?doi=IBIOT-IK.2011.1.6> (accessed on 6/3/2020)
- Mohapatra, H.P., and Rath, S.P. (2005). In vitro studies of *Bacopa monnieri*: An important medicinal plant with reference to its biochemical variations. *Indian J Exp Biol*, **43**(4), 373–6.
- Naseer, S., and Mahmood, T. (2014). Tissue culture and genetic analysis of somaclonal variations of *Solanum melongena* L. cv. Nirrala. *Open Life Sciences*, **9**(12), 1182–95. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0354-6>.
- Naz, S., Haq, R., Aslam, F., and Ilyas, S. (2015). Evaluation of antimicrobial activity of extracts of in vivo and in vitro grown *Vinca rosea* L. (*Catharanthus roseus*) against pathogens. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **28**(3), 849–53.
- Neelakandan, A.K., and Wang, K. (2012). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant cell reports*, **31**(4), 597–620. DOI: 10.1007/s00299-011-1202-z.
- Niklas, K.J., Owens, T., Reich, P.B., and Cobb, E.D. (2005). Nitrogen/phosphorus leaf stoichiometry and the scaling of plant growth. *Ecology Letters*, **8**(6), 636–42.
- Nita, R.D., Pandya, T.N., and Pillai, A.P. G. (2013). A comparative pharmacognostical evaluation of *Catharanthus Roseus* L. G. Don (pink and white flower varieties) roots. *Global Journal of Research on Medicinal Plants and Indigenous Medicine*, **2**(11), 745.
- Norusis, M.J. (1990). *SPSS/PC+Statistics 6.0 for the IBM PC/XT/AT and PS/2*.