

## تأثير الإجهاد الملحي والحلوي في نمو الكالوس وعلى بعض الصفات البيوكيميائية لنبات الونكا (*Catharanthus roseus* L.)

سولاف نايف العاقل\* أيمن الشحاذه العوده\*\* يوسف العموري\*\*\*

### الملخص

نُفذت التجربة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية في سورية، مخبر التقانات الحيوية للنباتات الطبية، لمعرفة تأثير الإجهادين الملحي والحلوي في معدل نمو الكالوس، ونشاط بعض الأنزيمات المضادة للأكسدة، وبعض الصفات البيوكيميائية لنبات الونكا. وضعت التجربة وفق التصميم العشوائي التام (CRD)، بواقع ثلاثة مكررات. عُقدت البذور بمحلول هيبوكلوريد الصوديوم NaOCl (0.5%)، وزرعت في أنابيب اختبار تحتوي على الوسط المغذي (MS)، ثم نُقلت النبيتات إلى أوساط الإكثار المدعمة بالأكسينات NAA (1 مغ.ل<sup>-1</sup>) والسيتوكينينات BA (2 مغ.ل<sup>-1</sup>). تم الحصول على الكالوس من أوراق نبات الونكا باستعمال الوسط MS المدعم بكلٍ من NAA (1 مغ.ل<sup>-1</sup>) و Kin (2 مغ.ل<sup>-1</sup>)، ثم عُرض الكالوس إلى مستوياتٍ متزايدة من الإجهاد الحلوي المُصطنع بإضافة PEG-6000 (-0.2، -0.3، -0.4 Mpa)، والإجهاد الملحي (25، 50، 75، 100 mM NaCl). كان متوسط الوزن

\* طالبة دكتوراه، قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

\*\* أستاذ بيئة وفيزيولوجيا المحاصيل الحقلية، قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق (المشرف الرئيس).

\*\*\* باحث في الهيئة العامة للتقانات الحيوية، عضو هيئة تدريسية في الجامعة السورية الخاصة (المشرف المشارك).

الرطب والجاف للكالوس الأدنى معنوياً في المعاملة 100 mM NaCl (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). كانت نسبة الذائبات المتسربة عبر الأغشية الحيوية الأعلى معنوياً تحت ظروف الإجهادين الملحي والحلوي (28.04، 26.98% على التوالي) بالمقارنة مع الشاهد (8.563%). وكان محتوى خلايا الكالوس من مركب المالوندي ألدهيد الأعلى معنوياً تحت ظروف الإجهاد الملحي (102.3 ميكرومول.غ<sup>-1</sup> وزن رطب)، بالمقارنة مع الإجهاد الحلوي (79.41 ميكرومول.غ<sup>-1</sup> وزن رطب)، في حين كان الأدنى معنوياً في معاملة الشاهد (37.76 ميكرومول.غ<sup>-1</sup> وزن رطب). وازداد محتوى الكالوس من البرولين في كلا الإجهادين الملحي والحلوي (4.623، 4.243 ميلي مول.غ<sup>-1</sup> وزن رطب على التوالي) بالمقارنة مع معاملة الشاهد (2.477، 2.477 ميلي مول.غ<sup>-1</sup> وزن رطب). وازداد معنوياً نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة (CAT، SOD، APX) بشكل أكبر في معاملة الإجهاد الملحي (506.9، 12270.02، مول. د<sup>-1</sup> مغ<sup>-1</sup> بروتين، 191.4 وحدة.مغ<sup>-1</sup> بروتين على التوالي) بالمقارنة مع معاملة الإجهاد الحلوي (259.4، 7106.22 مول. د<sup>-1</sup> مغ<sup>-1</sup> بروتين 65.60 وحدة.مغ<sup>-1</sup> بروتين على التوالي)، في حين كان الأدنى معنوياً في الشاهد (126.9، 1800.38 مول. د<sup>-1</sup> مغ<sup>-1</sup> بروتين 36.03 وحدة.مغ<sup>-1</sup> بروتين على التوالي).

**الكلمات المفتاحية:** الإجهادات اللاأحيائية، البرولين، المالوندي ألدهيد، الأنزيمات المضادة للأكسدة، سلامة الأغشية.

## **Effect of Osmotic and Salinity Stress on allus Growth and Some Biochemical Traits in Catharanthus roseus L.**

**Solaf Alaakel\***

**Ayman Shehada AL-Ouda\*\* Yousef AL-Ammoury\*\*\***

### **Abstract**

The experiment was carried out in the Syrian National Commission of Biotechnology, to study the effect of osmotic and salinity stress on the callus growth and the activity of some antioxidant enzymes and some biochemical traits in *Catharanthus roseus*. The experiments was laid according to complete random desgin (CRD) with three replications. Seeds were sterilized by NaOCl solution (0.5% v/v), then planted on MS medium. Plantlets were transferred to MS medium enriched with NAA (1 mg L<sup>-1</sup>) and BA (2 mg L<sup>-1</sup>). The callus was initiated from leaves using MS medium containing NAA (1 mg L<sup>-1</sup>) and KIN (2 mg L<sup>-1</sup>). Callus then was transferred to MS medium supplemented with different concentrations of PEG-6000 (-0.2, -0.3, -0.4 MPa), and NaCl (25, 50, 75, 100 mM) in succession as stimulating agents. The results showed that the fresh and dry weight of callus

---

\* Ph.D. Student, second Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.

\*\* Professor, Dept. of Field Crops, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria (chairman).

\*\*\* Syrian Private University, researcher in national commission of biothecnology, Damascus, Syria (co-supervisor).

were significantly lower in the salinity stress treatment 100 mM, and in osmotic stress treatment -0.4 Mpa (3.047, 0.250; 2.35, 0.18 g respectively), while it was significantly higher in the non-stressed (control) treatment (6.207, 0.483 g respectively). The solutes leakage was significantly higher under salt and osmotic stress conditions (28.04 and 26.98% respectively) compared with the control (8.563%). MDA content was significantly higher under salt stress (102.3  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  FW) followed by the osmotic stress treatment (79.41  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  FW), while it was significantly lower in the control (37.76  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  FW). The proline content showed a remarkable increase in both the stress treatments (4.623, 4.243  $\text{mmol.g}^{-1}$  FW respectively) compared with the control (2.477  $\text{mmol.g}^{-1}$  FW). The activity of antioxidant enzymes (CAT, APX, and SOD) was significantly higher under salt stress treatment (506.9, 12270.02  $\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  protein, 191.4  $\text{U.mg}^{-1}$  protein respectively), followed by osmotic stress (259.4, 7106.22  $\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  protein, 65.60  $\text{U.mg}^{-1}$  protein respectively), while it was significantly lower in the control treatment (126.9, 1800.38  $\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  protein, 36.03  $\text{U.mg}^{-1}$  protein respectively).

**Keyword:** Abiotic stresses, MDA, Proline, Anti-oxidant enzymes, Membrane integrity.

## المقدمة Introduction

يُعد نبات الونكا (*Catharanthus roseus* L.) من النباتات الطبية المهمة، وموطنه الأصلي جزيرة مدغشقر. ينتمي إلى الفصيلة الدفلية Apocynaceae، ويُزرع كنباتٍ للزينة في الحدائق والمنتزهات لتتبع ألوان أزهاره (الأبيض، الزهري والبنفسجي)، ولطول فترة إزهاره التي تمتد من شهر حزيران حتى شهر تشرين الثاني (Mishra و Verma، 2017). يحتل نبات الونكا مكانة مهمة في قائمة النباتات الطبية لاحتوائه على أكثر من 130 عدداً من القلويدات الإندولية التربينية ومشتقاتها (van der Heijden وزملاؤه، 2004) التي استعملت في الطب التقليدي الصيني والهندي لمعالجة الملاريا، والسعال، ولدغات الدبور، وآلام المعدة، وفقدان الذاكرة، وكمنشطٍ عام للجسم والدورة الدموية (Punia وزملاؤه، 2014). واستعملت أيضاً كمضاداتٍ للبكتريا والفيروسات (Mathur و Tolambiya، 2016). تمكّنت الدراسات الحديثة من تحديد المكونات الفعّالة لنبات الونكا، وأهمها مركبي الرزيبين Risperpine، والأجماليسين Ajmalicine، الموجودين في الجذور، ويُستعملان لعلاج ارتفاع ضغط الدم (Sharma وزملاؤه، 2020)، بالإضافة إلى مركبي Vincristine (VCR)، و Vinblastine (VLB) اللذين يمتازان بخصائص مضادة للانقسام الخلوي، والتي تُستعمل في علاج العديد من أمراض السرطان، وبخاصة سرطان الدم Leukemia، وسرطانات الغدد اللمفاوية، وسرطانات الجلد والثدي، وداء هودجكين Hodgkin's lymphoma (Ahirrao وزملاؤه، 2017). تتواجد هذه المركبات (VLB، VCR) في الأوراق بنسبة ضئيلة جداً، حيث يلزم ما يُقارب 500 كغ من الأوراق الجافة لاستخلاص 1غ فقط من مركب Vinblastine (Barrales-Cureño، 2015)، لذلك تسعى المؤسسات العلمية البحثية ومختبرات صناعة الأدوية في العالم إلى استعمال التقانات الحديثة في مجال تصنيع هذه المركبات وتحويلها إلى أدويةٍ علاجية (Verpoorte وزملاؤه، 2002).

إنَّ تعرض نباتات الونكا للإجهادات اللاإحيائية Abiotic stresses، مثل الملوحة، والجفاف، والحرارة المرتفعة، والصقيع، وغدق التربة Waterlogging، وسمية العناصر المعدنية Ion toxicity (Lesk وزملاؤه، 2016)، يزيد من تراكم المستقلبات الثانوية في النبات (Isah، 2019) مثل الفينولات والتربينات والمركبات النتروجينية كالكلويدات والجليكوزيدات السيانونجينية (Kleinwächter و Selmar، 2013)، إضافةً إلى زيادة معدّل حدوث الطفرات الوراثية Mutations الذي يساهم في توسيع القاعدة الوراثية والقيام بعمليات الانتخاب (Lorena وزملاؤه، 2015). يزداد تشكل العديد من جذور الأوكسجين الحرة الضارة تحت ظروف الإجهاد (Reactive oxygen species (ROS)، في كلٍ من الميتوكوندريا، والبيروكسيزوم، والسيتوبلازم، التي يمكن أن تخزّب المواد الدهنية والبروتينات الداخلة في تركيب الأغشية السيتوبلازمية، والأحماض النووية (Turkan و Demiral، 2009). تتكون الجذور الحرة بشكلٍ رئيسٍ من جذر الأوكسجين الحر (Superoxide radicals  $(O_2^-)$ )، والماء الأوكسجيني (Hydrogen peroxide  $(H_2O_2)$ )، وجذر الماءات (Hydroxyl radical  $(OH^-)$ )، وجذر الأوكسجين المفرد (Singlet oxygen  $(^1O_2)$ ). وعادةً ما تحوي خلايا النباتات المتحملة أنظمة دفاع أنزيمية Enzymatic، منها (Super oxide dismutase (SOD)، Catalase، (GPX) Glutathione peroxidase، (APX) Ascorbate peroxidase، (CAT) (GR) Glutathione reductase (Per وزملاؤه، 2018)، بالإضافة إلى قدرتها على تصنيع بعض الذائبات العضوية التوافقية، مثل البرولين Proline، والسكروز Sucrose، و Polyols، والتريهالوز Trehalose، والجليسين بيتين Glycine betaine (Ahmad وزملاؤه، 2018). ويُعد الحمض الأميني الحر البرولين من أكثر هذه الذائبات العضوية أهميةً، حيث يؤدي دوراً مهماً في وقاية النباتات من الإجهاد الحلوي ويُشكل أيضاً مصدراً للكربون والأزوت الذي يُستعمل في استعادة النمو بعد زوال العامل البيئي المحدد للنمو (Rai وزملاؤه، 2010؛ Parida وزملاؤه، 2008). بيّنت العديد من الدراسات وجود

تباين وراثي في مستوى التعبير الوراثي Gene expression، ونشاط تلك الأنزيمات، التي عادةً ما تترافق مع زيادة المقدرة التكيفية ومستوى التحمل للإجهادات اللاأحيائية المختلفة (Hu وزملاؤه، 2012). يعمل أنزيم (SOD) على تفكيك جذر السوبر أوكسيد ( $O_2^{\cdot-}$ ) إلى أوكسجين ( $O_2$ ) وماء أوكسجيني ( $H_2O_2$ ) (Parida و Das، 2005)، ويفكك الماء الأوكسجيني بواسطة أنزيم Catalase (CAT)، وأنزيم البروكسيداز Ascorbate peroxidase (APX) إلى ماء ( $H_2O$ ) وينطلق الأوكسجين  $O_2$  (Hossain وزملاؤه، 2007؛ Ahmad وزملاؤه، 2018).

استعملت تقنيات الزراعة في الزجاج In vitro في دراسة ميكانيكية وفيزيولوجيا التحمل للملوحة على المستوى الخلوي للنباتات المختلفة، لما توفره هذه التقنيات من وسط نمو متجانس من الملوحة والظروف البيئية (Aghaleh وزملاؤه، 2009). ودرس Jaleel وزملاؤه (2007) تأثير مستويات مختلفة من الملوحة (0، 50، 100 Mm NaCl) في نبات الونكا لمعرفة تأثيرها في نشاط بعض الأنزيمات المضادة للأكسدة، ووجدوا أن التركيز المرتفع من ملح الطعام (100 Mm) كان له تأثير سلبي في نشاط أنزيم SOD، حيث انخفض بمعدل 28% في الجذور وبمعدل 16% في الأوراق، بينما ازداد نشاطه بنحو 2.85% عند التركيز 50 Mm، ولكن بالمقابل أحدث التركيز الأعلى من الملوحة (100 mM) ارتفاعاً بنشاط أنزيم APX بمعدل 12% في الجذور، وبمعدل 11% في الأوراق، وبالنسبة لأنزيم CAT، فقد أبدى نشاطاً ضعيفاً في الأوراق بالمقارنة مع الجذور. وفي دراسة لتأثير الإجهاد الحلو في نبات الونكا باستعمال مركب البولي إيثيلين غلايكول Polyethylene glycol (PEG- 4000) (5، 10، 15 %) في نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة، والمحتوى من البرولين، أظهرت النتائج وجود فروقاتٍ معنوية بين المعاملات والشاهد، حيث كان نشاط أنزيم الكاتالاز Catalase الأعلى معنوياً عند التركيزين 10% و5% (228.84، 122.69 مول. د<sup>-1</sup>. ملغ<sup>-1</sup> بروتين على التوالي)، أما التركيز الأعلى

للبرولين فقد لوحظ عند التركيز 15% (1.146 ميكرو مول. غ وزن جاف<sup>-1</sup>)  
(Khashan و Al-Athary، 2016).

### أهداف البحث Objectives

1. دراسة تأثير الإجهاد الملحي والحلوي في الوزن الرطب والجاف لكالوس نبات الونكا  
.C.roseus
2. تقييم استجابة الكالوس للإجهاد الملحي والحلوي اعتماداً على نشاط الأنزيمات المضادة  
للأكسدة وبعض المؤشرات البيوكيميائية المرتبطة بتحسين مستوى التحمل.

### مواد البحث وطرائقه Materials and methods

مكان تنفيذ البحث Site of experimentation: نُفذ البحث في الهيئة العامة للتقانة  
الحيوية، قسم التقانات الحيوية للنباتات الطبية، بكلية الزراعة، جامعة دمشق خلال العامين  
2019/2018.

**المادة النباتية Plant material:** تمّ الحصول على بذور نوع الونكا (C. roseus) من  
شركة Syngenta flowers الهولندية، حيث عُمرت كمية كافية من بذور نبات الونكا في  
الكحول الإيثيلي (70%) مدّة دقيقة واحدة، ثمّ عُقت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم  
(NaOCl) (0.5%) مدّة 5 دقائق ثمّ غُسلت بعدها بالماء المقطر المعقمّ ثلاث مرّات متتالية  
بمعدّل 5 دقائق في كل مرّة، وتُركت مكشوفةً مدّة 30 دقيقة تحت جهاز العزل الجرثومي  
حتى جفّت هوائياً وأصبحت جاهزة للزرع. أُجريت عمليتا الغسيل النهائي والزرع في شروط  
تعقيم صارمة في غرفة العزل الجرثومي Laminar airflow hood. وزُرعت البذور بمعدّل  
بذرة واحدة في كل أنبوب، وذلك باستعمال وسط الزراعة الأساسي (MS)  
(Murashige و Skoog، 1962) الخالي من منظمات النمو، وحُضنت الأنبوب في الظلام  
عند درجة حرارة  $24 \pm 2$  مْ حتى إنبات البذور، وبعدها حُضنت النبيتات النامية على درجة  
حرارة 24 مْ و16 ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام بالتناوب مدّة 30 يوماً، قُسمت إلى عقدي

ساقية بطول 1 سم تحوي كل منها على برعم واحد، وأعيدت زراعتها في الوسط المغذي MS المدعم بهرموني Benzyl adenine BA (2 مغ.ل<sup>-1</sup>)، و Naphthaleneacetic acid NAA (1 مغ.ل<sup>-1</sup>) (العائل وزملاؤه، 2020). تمّ الحصول على الكالوس من أوراق نبات الونكا باستعمال الوسط MS والمدعم بعددٍ من منظمات النمو النباتية مثل Kin (2 مغ.ل<sup>-1</sup>)، و NAA (1 مغ.ل<sup>-1</sup>)، وبمجموعةٍ من الفيتامينات مثل ميواينوزيتول Myo-inositol (0.08 غ.ل<sup>-1</sup>)، والكازين Casein (0.5 غ.ل<sup>-1</sup>)، لتحفيز تشكل الكالوس ونموه، وبعد الحصول على الكالوس أُعيدت زراعته على الوسط السابق نفسه ثلاث مرات بفارق 30 يوماً بين كل مرة، بهدف الحصول على الكمية المناسبة لتنفيذ البحث.

**تطبيق الإجهاد على مزارع الكالوس:** بعد مضي 90 يوماً عُرض الكالوس إلى مستوياتٍ متزايدة وبشكلٍ تدريجي من العامل المجهد الملحي NaCl (0، 25، 50، 75، 100 Mm)، ومن PEG- 6000 (0، -0.2، -0.3، -0.4 MPa) بواقع مستوى أعلى كل 30 يوماً (طبق الإجهاد الملحي والحلولي بشكل منفصل)، بهدف تطوير خطوط خلوية أكثر تحملاً للإجهاد، وذات كفاءة إنتاجية أعلى من المواد الفعّالة. زُرِع 30 أنبوباً من كل معاملة موزعة على ثلاثة مكررات، بواقع 10 أنابيب في كل مكرر، ثمّ حُضنت المزارع في الحاضنة عند درجة حرارة 1±25 م° في الظلام. وفي نهاية فترة التحضين (30 يوماً) لكل مستوى من الإجهادين الملحي والحلولي، تمّ تسجيل الوزنين الرطب والجاف (غ) باستعمال الميزان الإلكتروني، بينما استعمل الكالوس النهائي الناتج عن تطبيق جميع مستويات الإجهادين بشكلٍ متزايد تدريجياً في تسجيل القراءات المتعلقة ببعض الخواص الكيميائية الحيوية الآتية:

**سلامة الأغشية الخلوية Membrane integrity (%)**: أُخذت كمية كافية من الكالوس (15 غ)، ووضعت في عبوة تحتوي على 10 مل من الماء المقطر، وثُرِكت العبوات على هزاز كهربائي بسرعة 120 هزة.دقيقة<sup>-1</sup> مدة 3 ساعات، ثمّ سُجِل الامتصاص الأولي للمحلول عند طول موجة 273 نانومتر باستعمال جهاز قياس الطيف الضوئي

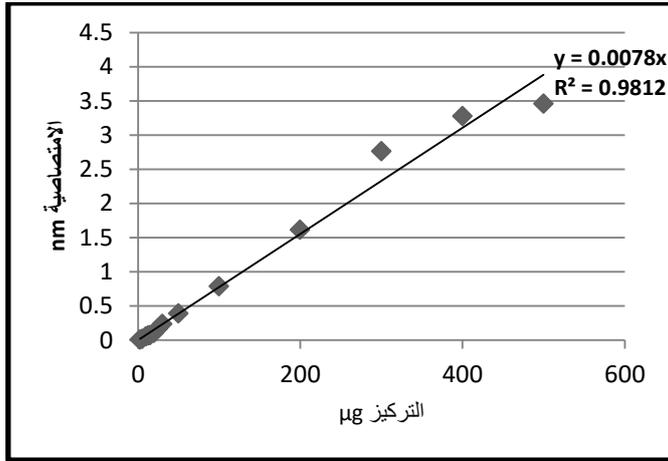
Spectrophotometer، ثم نُقلت المحاليل من كل عبوة على حدة إلى أنابيب اختبار مزودة بسدادة ووضعت في حمامٍ مائي (درجة الغليان) مدّة 30 دقيقة، ثمّ سجل الامتصاص النهائي للمحلول عند طول الموجة السابقة نفسها. وحُسب استناداً إلى ما سبق نسبة الذائبات المتسربة عبر الأغشية السيتوبلاسمية في الكالوس وفق المعادلة الرياضية الآتية (Leopold وزملاؤه، 1981):

$$\text{نسبة الذائبات المتسربة (\%)} = \frac{\text{الامتصاص الأولي/الامتصاص النهائي}}{100} \times 100$$

#### محتوى الكالوس من المألون ثنائي الألدheid Malondialdehyde (MDA) content

(ميكرو مول. غ<sup>-1</sup> وزن رطب): يُعد مركب المألون ثنائي الألدheid من أهم نواتج تحلل الأحماض الدهنية الداخلة في تركيب الأغشية السيتوبلاسمية، نتيجة التعرض للإجهادات اللاأحيائية، وعادةً ما يُقدر تركيز هذا المركب للتعبير عن مقدار التخریب الحاصل في المواد الدهنية. وتمّ ذلك باستعمال طريقة (Thiobarbutric acid reaction (TBARS) (Heath وPacker، 1968). طحنت أنسجة الكالوس المجمدة بالآزوت السائل إلى بودرة ناعمة جداً باستعمال الهاون، وأُخذ 100 مغ من البودرة وتمّت مجانسيتها Homogenized في 5 سم<sup>3</sup> من حمض الخليك ثلاثي الكربون (TCA) (0.1% (w/v)، وثقل باستعمال جهاز الطرد المركزي عند 10000 g مدّة 10 دقائق عند درجة حرارة 5 م. ثم أخذ 0.5 مل من الرشاحة ومُزجت مع 1 مل من Thiobarbutric acid (TBA) بتركيز 0.5% الذي تمّ تحضيره بمزجه مع محلول TCA (تركيز 20%). وضع الخليط بعدئذٍ في حمام مائي عند درجة حرارة 95 م مدّة 30 دقيقة، وأوقف التفاعل بوضع العينات في الثلج بشكلٍ مفاجئ، ثمّ نُقل بواسطة جهاز الطرد المركزي عند 1000 g مدّة 10 دقائق. تمّ قياس درجة الامتصاص للرشاحة عند طول موجة 532 nm بواسطة جهاز قياس المطياف الضوئي Spectrophotometer. حُسب المحتوى من المألوندي ألدheid باستعمال معامل التحلل (ε) 155 ميلي مولر. سم<sup>-1</sup>.

**محتوى البرولين في الكالوس Proline content (مل مول. غ<sup>-1</sup> وزن رطب):** تمّ قياس تركيز البرولين بحسب طريقة Bates وزملائه (1973)، حيث أخذ 0.5 غ من الكالوس وسُحقت في هاون خزفي وتمتّ مجانسها في 5 مل من المحلول المائي لحمض السلفوساليسيليك Sulfosalicylic acid (3%) (3 غ في 100 مل ماء مقطر)، ثمّ فصل المستخلص بواسطة جهاز الطرد المركزي على سرعة 3000 دورة. دقيقة<sup>-1</sup> مدّة 10 دقائق، بعدها جُمع محلول الاستخلاص، وتمّ إكمال حجمه إلى 5 مل باستخدام حمض السلفوساليسيليك (3%). ولتقدير محتوى المستخلص من البرولين، أخذ منه 2 مل وأضيف إليه 2 مل من محلول النينهيدرين Ninhydrin (1.25 غ نينهيدرين، 30 مل من حمض الخل الثلجي Glacial acetic acid، 20 مل من حمض الأرتوفوسفوريك Phosphoric acid H3PO4 M6 حتى تمام الانحلال) لتنشيط التفاعل، و2 مل من حمض الخل الثلجي، ثمّ وُضعت الأنابيب في حمام مائي عند درجة الغليان مدّة ساعة واحدة، ثمّ رفعت الأنابيب وبُرّدت بشكلٍ مفاجئٍ لإيقاف التفاعل وذلك بوضعها في وعاء يحتوي على الثلج. أُضيف لكل أنبوب 4 مل من التولوين Toluene (ملون)، وتمّ رج الأنبوب مدّة عشر ثوانٍ ثمّ تُرك حتى ينفصل المزيج إلى طورين، حيث أخذ الطور العلوي وقيست درجة امتصاصه عند طول موجة 520 نانومتر في جهاز قياس المطياف الضوئي. تمّ حساب تركيز البرولين في العينات النباتية باستخدام منحنى معياري تمّ رسمه باستعمال عدّة تراكيز معروفة من البرولين التجاري (Roth, 171902) (الشكل، 1).

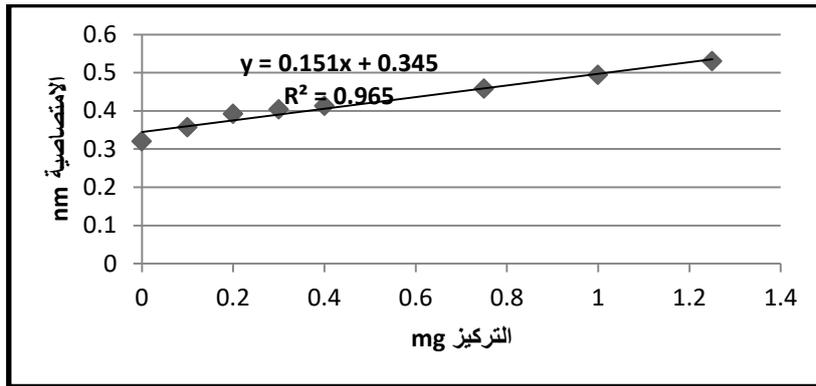


الشكل رقم (1) المنحنى المعياري للبرولين.

**نشاط مضادات الأكسدة الأنزيمية Antioxidant Enzyme Activity:** يستخدم قياس نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة كمعيار لتقييم مشاركة هذه الأنزيمات في إزالة جذور الأكسجين النشطة (ROS)، ومستوى التحمل الإجهادات للأحيائية المدروسة. تمّت جميع الاختبارات الأنزيمية عند درجة حرارة 25 م° وعند حجم تفاعل نهائي 2 مل، بحسب طريقة Murshed وزملاؤه (2008):

**استخلاص الأنزيمات:** أخذ 0.25 غ من مسحوق الكالوس المُجمّد ووضعت في هاون خزفي، وتمّت مجانسته في 1 مل من 50 mM 2-N-morpholino-ethanesulfonic (MES/KOH) و 6=PH acid buffer، و 40 mM من KCL، و 2 mM من  $CaCl_2$ ، و 1 mM من حمض الإسكوريك (ASA)، ثمّ وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي مدّة 15 دقيقة وبسرعة 15000g وعلى درجة حرارة 4 م°. استخدمت الرشاحة الناتجة لقياس نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة بشكلٍ مباشر، وكذلك لقياس تركيز البروتينات.

تقدير البروتينات بطريقة برادفورد Bradford (1976): تم أخذ 200 µl من المستخلص الأنزيمي وأضيف إليه 1.5 مل من محلول برادفورد (SIGMA, ) Bradford (SLBB8733V)، وحرك المزيج بدرجة حرارة الغرفة مدة 30 دقيقة، تم قياس الامتصاصية على طول موجة 595 nm. تم حساب تركيز البروتين في المستخلص الأنزيمي من خلال رسم منحنى معياري باستخدام تراكيز معلومة من محلول برادفورد (الشكل، 2).



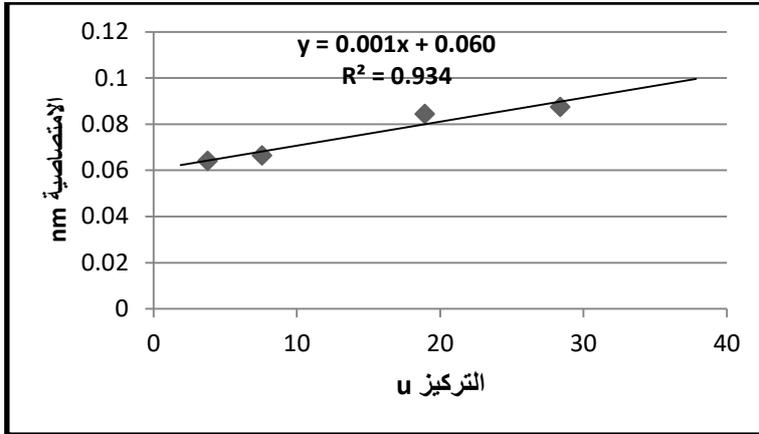
الشكل (2) المنحنى المعياري لمحلول برادفورد.

تقدير فعالية أنزيم الكاتالاز Catalase activity (CAT): أخذ 1900 µl من المحلول المنظم لفوسفات البوتاسيوم pH 7 (6.15 مل محلول فوسفات ثنائية البوتاسيوم + 3.85 مل من محلول الفوسفات أحادية البوتاسيوم ثم يكمل الحجم إلى 200 مل بالماء المقطر) وأضيف إليها 100 µl من المستخلص الأنزيمي، تم تصغير جهاز قياس المطياف الضوئي على طول موجة 240 nm. وأضيف للمزيج 3 µl من الماء الأوكسجيني (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%) ثم، حرك المزيج. وتم تقدير نشاط أنزيم الكاتالاز Catalase من خلال قياس مقدار التناقص الحاصل في تركيز الماء الأوكسجيني (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) في المستخلص الأنزيمي، وذلك بقياس الامتصاصية الضوئية مدة 3 دقائق عند طول موجة ضوئية 240 نانومتر، حيث تقل

الامتصاصية الضوئية بانخفاض تركيز الماء الأوكسجيني في العينة. وتم حساب نشاط أنزيم CAT باستخدام معامل التحلل 43.6 مولر.سم<sup>-1</sup> (Chandlee وزملاؤه، 1983).

**تقدير فعالية أنزيم أسكوريبات بيروكسيداز (APX) ascorbate peroxidase:** أخذ 10 مل من المحلول المنظم الفوسفاتي PH = 7 وأضيف له 44 µl من محلول (ASA) (0.1 غ في 10 مل ماء مقطر). وأخذ من هذا المزيج 1900 µl وأضيف إليها 100 µl من المستخلص الأنزيمي، و 2 µl من H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%). وتم تقدير فعالية الأنزيم APX من خلال تقدير معدّل تحويل الأسكوريبات Ascorbate إلى مركب الإسكوريبات منزوعة الهيدروجين Dehydroascorbate، بقياس مقدار الانخفاض في امتصاص الضوء مدّة 3 دقائق عند طول موجة ضوئية 290 نانو متر. تمّ حساب نشاط الأنزيم APX باستعمال معامل التحلل Extinction coefficient 2.8 ميلي مولر. سم<sup>-1</sup> (Asada و Nakano، 1981).

**تقدير نشاط أنزيم ديسميوتاز السوبر أوكسيد الحر Superoxide dismutase activity (SOD):** حضر محلول التفاعل الخاص بأنزيم (SOD) والمؤلف من 200 مل من المحلول المنظم الفوسفاتي pH = 7.8 وأضيف إليه 0.388 غ من الحمض الأميني الميثونين Methionine (13mM)، و 0.0028 غ من نيترو بلو تترازوليوم Nitro NBT blue tetrazolium (75µM)، و 0.00584 غ من ثنائي أمين الإيثيلين رباعي حمض الخل Ethylenediaminetetraacetic acid (0.1 mM) EDTA، و 30 µl من الريبوفلافين Ribofavin (2µM) (0.5 من الريبوفلافين في 100 مل ماء مقطر). وأخذ 1.5 مل من محلول التفاعل السابق، وأضيف إليه 100 µl من المستخلص الأنزيمي، وعرض الخليط بعد التحريك الجيد إلى الإضاءة المخبرية مدّة 5 دقائق، ثمّ تمّت قراءة امتصاص العينة للأشعة الضوئية على طول موجة 560 نانومتر بواسطة جهاز قياس المطياف الضوئي، وحسب نشاط الأنزيم SOD بالوحدة اعتماداً على المنحنى القياسي الذي رسم باستخدام تراكيز معلومة من SOD التجاري (Marklund و Marklund، 1974) (الشكل، 3).



الشكل رقم (3) المنحنى المعياري لأنزيم السوبر أوكسيد دسموتاز (SOD).

### تصميم التجارب والتحليل الإحصائي Experiments design and statistical analysis

تُفذت جميع التجارب باستعمال التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (CRD)، بمعدّل 3 مكررات، وتمّ تحليل البيانات بعد تبويبها باستعمال برنامج التحليل الإحصائي Mstat-C لحساب قيم أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى المعنوية 0.01، وقيم معامل التباين (CV%).

### النتائج والمناقشة Results and discussion

1- الوزن الرطب والجاف (غ): بيّنت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاتٍ معنوية ( $P < 0.01$ ) في متوسط الوزن الرطب والجاف بين المعاملات المدروسة من كلا الإجهادين المدروسين (الملحي، والحلوي). كان متوسط الوزن الرطب والجاف للكالوس الأدنى معنوياً في معاملة الإجهاد الحلوي -0.4 Mpa (2.35، 0.18 غ على التوالي) بالمقارنة مع الشاهد (بدون إجهاد) (6.207، 0.483 غ على التوالي). وكان متوسط الوزن الرطب الأدنى معنوياً في المعاملة NaCl Mm 100 (3.047 غ)، 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 (0.483 غ) (الجدول، 1). عموماً، تؤدي إضافة العامل المجهد لوسط النمو إلى تثبيط استطالة الخلايا وانقسامها، الأمر الذي يؤثر سلباً في معدل نمو خلايا الكالوس، سواء من خلال التأثير الحلوي Osmotic effect لكلٍ من الإجهاد الحلوي والملحي، حيث تعمل جزيئات البولي اثيلين غلايكول (PEG-6000) والملح على مسك جزيئات الماء، مقللةً 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 التأثير السمي الأيوني لشاردتي الصوديوم والكلور في معاملة الإجهاد الملحي (Bekheet، 2015). تتفق هذه النتائج مع نتائج الحجيبي وعبد الحسين (2012)، حيث أظهرت نتائجهما تناقص في الوزن الرطب والجاف لكالوس نبات *C.roseus* عند إضافة ملح كلور الصوديوم إلى وسط النمو، حيث كان الوزن الرطب والجاف الأدنى معنوياً عند التركيز الأعلى (75 MmNaCl). ولم تتفق مع ما توصل إليه الباحثة Mishra وزملاؤه (2019)، الذين لاحظوا زيادة الوزن الرطب والجاف تحت ظروف الإجهاد الملحي (0، 25، 50، 100 MmNaCl)، ولكنهما انخفضا عن التركيز الأعلى (200 Mm) بالمقارنة مع الشاهد (بدون إجهاد ملحي).

الجدول رقم (1) تأثير تراكيز مختلفة من الإجهاد الملحي والحلوي في الوزن الرطب والجاف للكالوس.

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

تُشير الأحرف المتماثلة إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية 0.01.

2- سلامة الأغشية الخلوية (نسبة التسرب) (%): أظهرت نتائج التحليل الإحصائي ( $P < 0.01$ ) وجود فروقاتٍ معنوية ( $P < 0.01$ ) في نسبة المركبات المتسربة عبر الأغشية السيتوبلاسمية بين المعاملات المدروسة. ازدادت نسبة الذائبات المتسربة من الأغشية الخلوية لكالوس نبات الونكا في معاملي الإجهاد الملحي والحلوي (28.04، 26.98% على التوالي) وبدون فروقاتٍ معنوية بينهما، بالمقارنة مع معاملة الشاهد (8.563%) (الجدول، 2). تظهر هذه النتائج التأثير الضار للإجهادات اللاأحيائية في سلامة الأغشية الخلوية واستقرارها، حيث يعد الغشاء السيتوبلاسمي بمثابة الجسر الذي يربط الخلية النباتية بخارجها وتغير نفاذيته يؤثر على العديد من المركبات المهمة فيزيولوجيا لحياة الخلية النباتية (السكريات، الأحماض الأمينية، الأحماض النووية، الفيتامينات الشوارد المعدنية،... إلخ). تُسبب الإجهادات زيادةً في نفاذية هذه الأغشية من خلال تخريب البروتينات والمواد الدهنية المُفسفرة الداخلة في تركيبها، مشكلةً بذلك غشاءً غنياً بالفتحات Porous membrane، يسمح بفقدان الكثير من المواد العضوية Organic وغير العضوية Inorganic الضرورية لسير العمليات الحيوية داخل الخلايا، وبالمقابل يسمح بدخول المواد السامة، ما يؤدي إلى موت الخلايا النباتية (Ben وزملاؤه، 2014؛ Ben وزملاؤه، 2017). عموماً، يمكن القول: بأن الأنسجة النباتية القادرة على المحافظة على سلامة الأغشية الخلوية في البيئات المجهدّة ستكون أكثر تحملاً للإجهادات، وذات مقدرة أكبر على استعادة النمو Recovery growth بعد زوال العامل البيئي المحدد للنمو (Guo وزملاؤه، 2019).

3- تركيز مركب المألون ثنائي الألدريد (ميكرومول غ<sup>-1</sup>. وزن رطب): أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاتٍ معنوية ( $P < 0.01$ ) في المحتوى من MDA بين المعاملات المدروسة. كان تركيز مركب MDA الأعلى معنوياً في معاملة الإجهاد الملحي (102.3 ميكرومول غ<sup>-1</sup>. وزن رطب)، تلاها وبفروقاتٍ معنوية معاملة الإجهاد

الحلوي (79.41 ميكرومول غ<sup>-1</sup>. وزن رطب)، في حين كان الأدنى معنوياً في معاملة الشاهد (بدون إجهاد) (37.76 ميكرومول غ<sup>-1</sup>. وزن رطب) (الجدول، 2). تُعد الإجهادات اللاأحيائية من العوامل المسببة لأكسدة الليبيدات Lipid peroxidation، الداخلة في تركيب الأغشية الخلوية، وتُعد الحموض الدهنية غير المشبعة المتعددة Poly-unsaturated fatty acids (PUFA) من أهم مكونات الأغشية الخلوية التي تتعرض للأكسدة (Khunpon وزملاؤه، 2019). ويمكن أن يُعزى ذلك إلى تراكم الأيونات، وإنتاج الجذور الحرة (ROS)، وزيادة تركيز الماء الأوكسجيني (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)، الذي يُسبب تشكل جذر الهيدروكسيل الحر (OH<sup>-</sup>) وبالتالي أكسدة الليبيدات، لذلك يُعد مركب المألون ثنائي الألدريد من المؤشرات الحيدة التي يمكن من خلالها تقييم مقدار التخریب الحاصل في الأغشية الخلوية في ظروف الإجهادات اللاأحيائية، بسبب تراكم الجذور الحرة. ويُلاحظ أنَّ أكسدة المواد الدهنية المفسفرة الداخلة في تركيب الأغشية كانت أكبر بوجود الإجهاد الملحي بالمقارنة مع الإجهاد الحلوي، ما يُعزى إلى التأثير السمي الأيوني، بالإضافة إلى الإجهاد الحلوي (AL-Huqail، 2019).

4- **محتوى البرولين (مل مول غ<sup>-1</sup>. وزن رطب):** ازداد محتوى البرولين معنوياً تحت ظروف الإجهادين الملحي والحلوي (4.62، 4.24 مل مول غ<sup>-1</sup>. وزن رطب على التوالي)، بينما كان الأدنى معنوياً في معاملة الشاهد (بدون إجهاد) (2.48 مل مول غ<sup>-1</sup>. وزن رطب) (الجدول، 2). يتراكم البرولين في الأنواع النباتية التي تنمو في ظروف الإجهاد بسبب تحريض الإجهاد على تصنيعه في الأنسجة النباتية، وتثبيط أكسدته بسبب انخفاض نشاط الأنزيم Proline oxidase، والحيلولة دون مشاركته في تصنيع البروتينات. ويُعد تراجع ضغط الإمتلاء الدافع الرئيس لتراكم البرولين الذي يُعد أحد أهم الآليات التي يستعملها النبات لتحمل ظروف الإجهادات اللاأحيائية المختلفة (Hermans و Verbruggen، 2008) (Kavi و Sreenivasulu، 2014)،

حيث يسمح باستمرار استنطالة الخلايا النباتية، واستمرار انفتاح المسامات وتثبيت الكربون بعملية التمثيل الضوئي، كما تُشير بعض الدراسات أنّ الملوحة والجفاف أدت إلى ازدياد معدّل تصنيع البرولين بزيادة المحتويات من المادة الأولية المستخدمة في التصنيع الحيوي للبرولين، مُتضمنةً غلوتاميك أسيد Glutamic acid والأورنثين Ornithine، والأرجنين Arginine. ويُعد المركّب I-glutamic acid المادة الأولية للتخليق الحيوي للبرولين Proline biosynthesis في النباتات. ويؤدي الأنزيمان pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) و pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) أدواراً مهمة جداً في طريق الاصطناع الحيوي للبرولين (Ashraf و Foolad، 2007).

الجدول رقم (2) تأثير الإجهاد الملحي والحلوي في بعض الصفات البيوكيميائية.

المعاملة	نسبة الذائبات المتسربة (%)	محتوى البرولين (مل مول غ <sup>-1</sup> . وزن رطب)	محتوى المألوندي ألدهيد (ميكرومول غ <sup>-1</sup> . وزن رطب)
الإجهاد الملحي	28.04 <sup>a</sup>	4.62 <sup>a</sup>	102.30 <sup>a</sup>
الإجهاد الحلوي	26.98 <sup>a</sup>	4.24 <sup>ab</sup>	79.41 <sup>b</sup>
الشاهد	8.56 <sup>b</sup>	2.48 <sup>b</sup>	37.76 <sup>c</sup>
LSD (0.01)	1.815	1.845	12.900
CV%	2.28	12.99	4.70

تُشير الأحرف المتماثلة إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية 0.01.

#### تأثير الإجهادات اللاأحيائية في نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة:

1- نشاط أنزيم Catalyse: أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية ( $P < 0.01$ ) في نشاط أنزيم CAT بين المعاملات المدروسة. ازداد نشاط أنزيم الكاتالاز بشكلٍ معنوي تحت ظروف الإجهادين، وكان الأعلى معنوياً في معاملة الإجهاد الملحي (506.9 مول. د<sup>-1</sup>. مغ<sup>-1</sup> بروتين)، تلاها وبفروقاتٍ معنوية تحت ظروف الإجهاد الحلوي (259.4 مول. د<sup>-1</sup>. مغ<sup>-1</sup> بروتين)، في حين كان الأدنى معنوياً في المعاملة الشاهد (بدون إجهاد) (126.9 مول. د<sup>-1</sup>. مغ<sup>-1</sup> بروتين) (الجدول، 3). يزداد نشاط أنزيم

الكاتالاز في ظروف الإجهاد بسبب زيادة معدّل تشكل الجذور الحرة النشطة، حيث يقوم أنزيم الكاتالاز بتحويل  $H_2O_2$  إلى  $H_2O$  و  $O_2$ ، الأمر الذي يمنع ضرر الخلايا والأنسجة (Muhammad، 2018). ويتميز أنزيم الكاتالاز عن باقي الأنزيمات بامتلاكه أعلى معدّلات استقلال؛ حيث يستطيع جزيء واحد فقط تحويل الملايين من جزيئات الماء الأوكسجيني إلى ماء وأكسجين في الثانية (Muhammad، 2018).

2- نشاط أنزيم **Ascorbate peroxidase (APX)**: أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية في نشاط أنزيم APX بين المعاملات المدروسة. ازداد نشاط هذا الأنزيم معنوياً في معاملي الإجهاد الملحي والحلوي (12270.02، 7106.22 مول.  $د^{-1}$ . مغ $^{-1}$  بروتين)، بالمقارنة مع الشاهد (1800.38 مول.  $د^{-1}$ . مغ $^{-1}$  بروتين) (الجدول، 3). ويُعد أنزيم البيروكسيداز من الأنزيمات المهمة في التخلص من الجذور الحرة، إذ يقوم بتفكيك الماء الأوكسجيني إلى مواد أقل سمية باستعمال حمض الاسكوربيك كمعطٍ للإلكترونات، وبذلك يؤدي هذا الأنزيم دوراً مشابهاً لدور أنزيم الكاتالاز، وبالرغم من ذلك فإنّ كلا الأنزيمين يحمل سمة مميزة، حيث يستخدم أنزيم Ascorbate peroxidase حمض الإسكوربيك كمانح للإلكترون لإرجاع الماء الأوكسجيني إلى الماء، ويتحول إلى الشكلين غير النشطين: الأسكوربات منزع الهيدروجين الأحادي Monodehydroascorbate (MDHA)، والأسكوربات منزع الهيدروجين Dehydroascorbate (DHA)، ولأن الشكل النشط من حمض الأسكوربيك هو الفعّال والضروري بالنسبة للنبات والإنسان، فيتم إعادة إرجاعه بواسطة أنزيم monodehydroascorbate reductase (MDHAR) الذي يقوم بتحويل MDHA إلى AsA باستخدام الغلوتاثيون (GSH) كمعطٍ للإلكترون لإعادة تخليق مركب ASA من شكله المؤكسد، وتتم حماية إعادة إرجاع الغلوتاثيون بواسطة أنزيم Glutathion (GR) reductase (Caverzan وزملاؤه، 2012).

3- نشاط أنزيم **Superoxide dismutase (SOD)**: يُلاحظ من خلال الجدول (3) أنَّ نشاط أنزيم SOD كان الأعلى معنوياً في معاملة الإجهاد الملحي (191.4 وحدة.مغ<sup>-1</sup> بروتين)، تلاها ويفروقاتٍ معاملة الإجهاد الحلوي (65.60 وحدة.مغ<sup>-1</sup> بروتين)، في حين كان الأدنى معنوياً في معاملة الشاهد (36.03 وحدة.مغ<sup>-1</sup> بروتين). يتمثل دور هذا الأنزيم في تفكيك Dismutation جذر السوبر أكسيد الحر ( $O_2^{\cdot-}$ ) إلى ماء وأكسجيني ( $H_2O_2$ )، وأكسجين ( $O_2$ )، ويُقلل بذلك من تركيز جذور السوبر أكسيد التي ما إن تتحد مع الماء الأوكسجيني حتى تشكل جذر المئات الحر Hydroxyl radical ( $OH^{\cdot-}$ )، الذي يتسم بمقدرة تفاعلية كبيرة. ويتواجد هذا الأنزيم لدى الكائنات الحية الهوائية، وفي معظم المكونات الخلوية التي يمكن أن تحرر وتشكل جذور السوبر أكسيد الحرة، وتزداد فعاليته استجابةً للعديد من الإجهادات اللاأحيائية، وتتوقف درجة تحمل الأنواع النباتية أو الطرز الوراثية للإجهاد التأكسدي على كمية وفعالية هذا الأنزيم (Muhammad، 2018). تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Elkahoui وزملاؤه (2005)، الذي وجد زيادة في نشاط الأنزيمات SOD، CAT، APX عند زراعة نبات الونكا في أوساطٍ ملحية بتركيز 50 mM.

الجدول رقم (3) تأثير الإجهاد الملحي والحلوي في نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة.

المعاملة	نشاط أنزيم CAT (مول. د <sup>-1</sup> .مغ <sup>-1</sup> بروتين)	نشاط أنزيم APX (مول. د <sup>-1</sup> .مغ <sup>-1</sup> بروتين)	نشاط أنزيم SOD (وحدة.مغ <sup>-1</sup> بروتين)
الإجهاد الملحي	506.9 <sup>a</sup>	12270.02 <sup>a</sup>	191.4 <sup>a</sup>
الإجهاد الحلوي	259.4 <sup>b</sup>	7106.22 <sup>b</sup>	65.60 <sup>b</sup>
الشاهد	126.9 <sup>c</sup>	1800.38 <sup>c</sup>	36.03 <sup>c</sup>
LSD (0.01)	49.65	561.70	29.47
CV%	4.44	2.12	7.97

تُشير الأحرف المتماثلة إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية 0.01.

### الاستنتاجات والمقترحات

- 1- تُقلل الإجهادات اللاأحيائية مثل الملوحة والإجهاد الحلوي من معدّل نمو الكالوس لنبات الونكا وتؤثر سلباً في معدّل النمو بزيادة شدّة الإجهاد.
- 2- يؤدي تعرّض الكالوس إلى مستوياتٍ متزايدة من الإجهادات اللاأحيائية إلى زيادة معدّل تسرب الذائبات عبر الأغشية الحيوية، وزيادة معدّل تصنيع البرولين، وتركيز مركب المالوندي أدهيد في كالوس نبات الونكا.
- 3- يُسبب تعرّض الكالوس للإجهادات اللاأحيائية زيادةً في نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة (SOD، APX، CAT) في نبات الونكا، ما يزيد من مستوى التحمل.
- 4- يؤثر الإجهاد الملحي بشكلٍ أكبر من الإجهاد الحلوي، بسبب وجود التأثير السمي الأيوني إضافةً إلى التأثير الحلوي.

## المراجع References

- 1- الحجيبي، احسان، ومسلم عبد الحسين. 2012. استجابة كالس نبات عين البزون إلى تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم وإنتاج المركبين القلوئيين Vincristine و Vinblastine. مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة. المجلد (4)، العدد (1).
- 2- العاقل، سولاف، وأيمن العودة، ويوسف العموري. 2020. تأثير توافقات هرمونية مختلفة في الإكثار الدقيق لنبات الونكا (*Catharanthus roseus* L.). مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. 35 (1): 127-142.
- 3- Aghaleh, M., V. Niknam, H. Ebrahim zadehand and K. Razavi. 2009. Salt stress effects on growth, pigments, proteins and lipid peroxidation in *Salicornia persica* and *S. Europaea*, *Biologia Plantarum*. 53:243-248.
- 4- Ahirrao, R.A., D.S. Kadambande, and G.M. Chavan. 2017. Herbal Drugs Used in Treatment of Cancer, *Int. j. pharma chem. res.* 3(21): 182-189.
- 5- Ahmad, P., M.N. Alyemeni, M.A. Ahanger, L. Wijaya, P. Alam, A. Kumar, M. Asharf, 2018. Upregulation of antioxidant and glyoxalase systems mitigates NaCl stress in *Brassica juncea* by supplementation of zinc and calcium, *J. Interact.* 13(1):151-162.
- 6- AL-Huqail, A.A. 2019. Changes in Antioxidant Status, Water Relations and Physiological Indices of Maize Seedlings under Drought Stress Conditions, *j. biol. sci.* 19:331-338.
- 7- Ashraf, M. and Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*. 59: 206-216.
- 8- Barrales-Cureño, H.J. 2015. Pharmacological applications and in vitro biotechnological production of anticancer alkaloids of *Catharanthus roseus*. *Biotecnología Aplicada*, 32 (1).
- 9- Bates, L.S., R. P. Walgreen, I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies, *Plant and soil*. 39(1): 205-207.
- 10- Bekheet, S.A. 2015. Effect of drought stress induced by mannitol and polyethylene glycol on growth and silymarin content of milk thistle callus cultures. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4 (8): 116-127.

- 11- Ben, O., H. Ellouzi, S. Planchais. 2017. Phospholipases D $\zeta$ 1 and D $\zeta$ 2 have distinct roles in growth and antioxidant systems in *Arabidopsis thaliana* responding to salt stress, *Planta*. 246(4):721–735.
- 12- Ben, R. K., C. Abdelly, A. Savoure. 2014. How reactive oxygen species and proline face stress together, *Plant Physiology and Biochemistry*. 80:278–284.
- 13- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Annals of Biochemistry*. 72: 248- 254.
- 14- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S.B., Ribeiro, C.W., Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, M. 2012. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *GenetMol Biol*. 35(4):1011-1019.
- 15- Chandlee, J.M., A.S. Tsafaris, and J.G. Scandalios. 1983. Purification and partial characterization of three genetically defined catalases of maize. *Plant Sci. Lett*. 29:117-131.
- 16- Elkahoui, S., J.A. Hernandez, C. Abdelly, R. Ghrir and F. Limam, 2005. Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. *Plant Sci.*, 168: 607-613.
- 17- Guo, Q., L. Liu, and B. J. Barkla. 2019. Membrane Lipid Remodeling in Response to Salinity. *International journal of molecular sciences*, 20(17): 4264-2095.
- 18- Heath, R.L., L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*. 125:189–198.
- 19- Hossain, Z., A.K.A. Mandal, S.K. Datta, and A.K. Biswas. 2007. Development of NaCl tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line. *J. Biotechnol*. 129: 658–667.
- 20- Hu, L., Huang, Z., Liu, S., Fu, J. 2012. Growth Response and Gene Expression in Antioxidant-related Enzymes in Two Bermudagrass Genotypes Differing in Salt Tolerance, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 137(3): 134-143.

- 21- Isah TA 2019. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*.52(39):2-25.
- 22- Jaleel, C. A., R. Gopi, P. Manivannan, and R. Panneerselvam, CH. 2007. Antioxidative Potentials as a Protective Mechanism in *Catharanthus roseus* (L.) G.Don Plants under Salinity Stress, *Turk J Bot*. 31 : 245-251.
- 23- Kavi Kishor P B, Sreenivasulu N 2014. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue?. *Plant Cell Environ*. 37(2):300-11.
- 24- Khashan, K.T., M.A.H. Al-Athary. 2016. Vinblastine and Vincristine Alkaloids Production From Callus of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don under Some abiotic factors, *Al-Kufa University Journal for Biology*. 8(2):75-90.
- 25- Khunpon, B.U., S.U. Cha-um, B.U. Faiyue, J.A.Uthaibutra, and K.O Saengnil. 2019. Regulation on Antioxidant Defense System in Rice Seedlings (*Oryza sativa* L.) ssp. indica cv. 'Pathumthani 1') Under Salt Stress by Paclobutrazol Foliar Application, *Not Bot Horti Agrobo*. 47(2):368-377.
- 26- Leopold, A.C., M.E. Musgrave, and K.M. Williams. 1981. Solute leakage resulting from leaf desiccation, *plant physiol*. 68:1222-1225.
- 27- Lesk, C., P. Rowhani, and N. Ramankutty. 2016. Influence of extreme weather disasters on global crop production, *Nature*. 529(7584):84-87.
- 28- Lorena, A., F. Francisco, and A.P. Maria. 2015. Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus*: Bioproduction and Their Effect on Human Health. *Molecules Review article*.
- 29- Marklund, S., G. Marklund. 1974. Involvement of the superoxyde anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxyde dismutase, *Eur. J. Biochem*. 47: 469-474.
- 30- Mishra, M. R., R.K. Srivastava, and N. Akhtar. 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*.8(2): 140-148.

- 31- Mishra, J.A., N.A. Verma. 2017. A brief study on *Catharanthus Roseus*: A review. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(2):20-23.
- 32- Muhammad, J. I. 2018. Role of Osmolytes and Antioxidant Enzymes for Drought Tolerance in Wheat. Available from. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.75926>.
- 33- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised Medium for Rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture, *Plant Physio.* 15(1): 473 - 479.
- 34- Murshed, R., F. Lopez-Lauriand, and H. Sallanon.2008. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate–glutathione cycle. *Analytical Biochemistry*. 383:320–322.
- 35- Nakano, Y., K. Asada.1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol.* 22: 867–880.
- 36- Parida, A.K., V.S. Dagaonkar, M.S. Phalak, and L.P. Aurangabadkar. 2008. Differential responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery, *Acta Physiol. Plant.* 30: 619–627.
- 37- Parida, A.K., A.B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60: 324–349.
- 38- Per, T.S., M.I.R. Khan, N.A. Anjum, A. Masood, S.J. Hussain, and N.A. Khan. 2018. Jasmonates in plants under abiotic stresses: crosstalk with other phytohormones matters, *Environ. Exp. Bot.* 145:104-120.
- 39- Punia, S., J. Kaur, R. Kumar, K. Kumar. 2014. *Catharantus roseus* a medicinal plant with potent anti-tumor properties, *Res. Ayurveda pharm.* 5(6).
- 40- Rai, M.K., V.S. Jaiswal, and U. Jaiswal. 2010. Regeneration of plantlets of guava (*Psidium guajava* L.) from somatic embryos developed under salt-stress condition, *Acta Physiol. Plant.* 32: 1055–1062.
- 41- Selmar, D., Kleinwächter, M. 2013. Stress Enhances the Synthesis of Secondary Plant Products: The Impact of Stress-Related Over-Reduction on the Accumulation of Natural Products, *Plant and Cell Physiology*, 54(6) :817–826.

- 42- Sharma, A.B., D.H. Amin, A. Sankaranarayanan, R.A. Arora, and A.K. Mathur. 2020. Present status of Catharanthus roseus monoterpene indole alkaloids engineering in homo- and hetero-logous systems, *Biotechnol Lett.* 42(1):11-23.
- 43- Tolambiya, P.R., S.U. Mathur. 2016. A Study on Potential Phytopharmaceuticals Assets in Catharanthus roseus L. (Alba), *Int J Life Sci Biotechnol Pharma Res.* 5 (1):1-6.
- 44- Turkan, I., T. Demiral. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance, *Environ. Exp. Bot.* 67: 2–9.
- 45- van der Heijden D. I; Jacobs; W. Snoeijer; D. Hallard; and R. Verpoorte (2004) “The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology,” *Current Medicinal Chemistry*, vol. 11, no. 5, pp: 607–628.
- 46- Verbruggen, N., C. Hermans. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids.*;35:753-9.
- 47- Verpoorte, R., A. Contin, and J. Memelink. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites, *Phytochem.* 1(1): 13-25.