

ديناميكية النمو والتباينات الجسمية بين مزارع الكالوس لنبات البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus*

شذى بشر¹، يوسف العموري²، محمود صبوح³، رمزي مرشد⁴

Growth Dynamics and Somaclonal Variation among Callus Cultures of Golden Henbane (*Hyoscyamus aureus*)

Shaza Beshar¹, Youssef Al-Ammouri², Mahmoud Sabbouh³, Ramzi Murshed⁴

¹ الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، صندوق بريد 301902، سورية.

² الجامعة السورية الخاصة، دمشق، صندوق بريد 36822، سورية.

³ قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، صندوق بريد 30621، سورية.

⁴ قسم علوم البستنة، كلية الزراعة، جامعة دمشق، صندوق بريد 30621، سورية.

¹National Commission for Biotechnology (NCBT), Damascus, P. O. Box:

301902, Syria.

² Syrian Private University, Damascus, P. O. Box: 36822, Syria.

³Department of Agronomy , Faculty of Agriculture, University of Damascus,

Damascus, P. O. Box: 30621, Syria

⁴Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of

Damascus, Damascus, P. O. Box: 30621, Syria.

ديناميكية النمو والتباينات الجسمية بين مزارع الكالوس لنبات البنج الذهبي

Hyoscyamus aureus

شذى بشر ، يوسف العموري ، محمود صبوح ، رمزي مرشد

الملخص

نفذ هذا البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية خلال الفترة 2015-2016 بهدف تحديد استجابة كالوس نبات البنج الذهبي (*H. aureus*) ودراسة ديناميكية نموه على أوساط مغذية خالية من منظمات النمو النباتية بالاعتماد على الوزن الرطب للكتلة الخلوية كمؤشر على قوة نمو الكالوس، بالإضافة إلى دراسة التباينات الجسمية Somaclonal variation التي من الممكن حدوثها نتيجة اختلاف تركيب الوسط المغذي للكالوس بالمقارنة مع النبات الأم باعتماد تقانة التكرارات البسيطة الترادفية البينية Inter Simple Sequence Repeats باستعمال 25 بادئة. بينت نتائج الدراسة أن منحنى النمو لخلايا الكالوس اتخذ شكل المنحنى السيني Sigmoid في جميع الأوساط المختبرة، حيث بلغت سرعة نمو الخلايا أقصى معدلاتها في الطور الأسّي (اليوم 21 حتى اليوم 25) في جميع الأوساط، مع تفوق الوسط الشاهد في وزن الكتلة الخلوية، ويُفسّر نجاح تشكل الكالوس ونموه في الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو إلى احتواء هذه الأوساط (5C-6C- 10C) على محتوى عالٍ من العناصر المغذية، واحتوائها على تراكيز عالية من السكر (50، 60، 100 غ. ل⁻¹) على التوالي، بالإضافة إلى ظاهرة التطلع الهرموني Hormone habituation التي تحصل نتيجة استمرار نمو الكالوس في وسط الإدامة بوجود منظمات النمو، حيث تتمكن خلايا الكالوس وبمرور الزمن من النمو في وسط خالٍ من منظمات النمو.

أثبتت نتائج الدراسة الجزيئية فعالية جميع البادئات المستخدمة في إعطاء تعددية شكلية بين الخطوط الخلوية المدروسة، كما أظهر التحليل العنقودي انفصال النبات الأم عن الخطوط الخلوية للكالوس بمسافة

قدرها 0.7614. وانفصلت الخطوط الخلوية للكالوس إلى تحت مجموعتين، ضمّت الأولى الخط الخلوي 10C منفرداً، في حين ضمّت الثانية الخطوط الخلوية (5C₀₁, 5C, 6C) بمسافة قدرها 0.4416 بينهما، وكان الخطان الخلويان 5C₀₁, 5C الأقرب إلى بعضهما وراثياً. تبين هذه النتائج وجود تباين وراثي بين الخطوط الخلوية لمزارع الكالوس مع أنها أخذت من المصدر نفسه (الخط الخلوي الأم 5C₀₁)، ويُعزى هذا إلى دور مكونات وسط النمو في إحداث تغيير في التركيب الوراثي للمادة النباتية، ما يؤكد أنّ مزارع الكالوس يمكن أن تكون مصدراً للاختلافات الوراثية، وأن تقانة ISSR أداة فعالة في كشف هذه الاختلافات.

الكلمات المفتاحية: زراعة الأنسجة، مزارع الكالوس، تقانة التكرارات البسيطة الترادفية البينية (ISSR)، البنج الذهبي.

Growth Dynamics and Somaclonal Variation among Callus Cultures of Golden Henbane (*Hyoscyamus aureus*)

Shaza Beshar, Youssef Al-Ammouri, Mahmoud Sabbouh, Ramzi Murshed

ABSTRACT

This research carried out in National commission for biotechnology's laboratories during 2015-2016, in order to determine the response of Golden henbane's callus (*H. aureus*), and to study its growth dynamics in growth regulators -free media based on the fresh weight of cells mass as an indicator of the callus growth strength, in addition to estimate somaclonal variation among callus cultures which may occurred due to difference in medium components compared with mother plant, by application inter simple sequence repeats (ISSR) technique using 25 primers.

The results showed that the growth curve of callus cells in all tested media followed the sigmoid trend, where growth speed of cells reached the highest division rate at the exponential phase (day 21 to 25) with superiority of the control medium in biomass weight. The success of callus formation and strength of its growth could be explained by the high content of nutrients and high concentrations of sucrose (50, 60, 100 g .L⁻¹), respectively in these media (5C-6C- 10C), in addition to the occurrence of the hormone habituation phenomenon as a result continuous callus growth in a medium supplemented with growth regulators, where the callus cells can grow in growth regulators-free medium.

The results of molecular study showed that effectiveness of all used primers in giving polymorphism among studied cellular lines. Cluster analysis showed that separation the mother plant alone in one cluster while callus cultures were gathered in another cluster with distance of 0.7614, callus cultures were divided into two broad groups (I and II), group I contained callus on 10C medium, group II included callus on other media (5C01, 5C, 6C), and their distance was

0.4416, while callus on the medium 5C01 and callus on the medium 5C were genetically the closest to each other .

These results revealed that presence of a genetic variation among cellular lines of callus although it was derived from the same source (the control 5C01), that could be attributed mainly to the role of the medium components in creating a change in the genetic make up of plant material, confirming the fact that callus culture is a source of genetic variations, and the ISSR technique can be used as an effective tool in the detection of such differences.

Key words: Tissue culture, Callus culture, ISSR, *Hyoscyamus aureus*

المقدمة

اكتشف نبات البنج في إنكلترا في أواخر القرن السابع عشر ثم أدخل إلى المجال الصيدلاني سنة 1809 (Evans، 2002) نظراً لأهميته الطبية التي تعزى إلى احتوائه على قلويدات التروبان، التي تمتاز بأهميتها كونها تسبب الشلل للجملة العصبية نظيرة الودية Parasympathetic system، ومسكنةً للجملة العصبية المركزية Central nervous system (Michael وآخرون، 2004).

يشير Mouterde (1983) إلى وجود ستة أنواع تتبع جنس البنج موجودة في الفلورا السورية، تنتشر في المناطق الجافة وشبه الجافة والرطبة. يتبع جنس البنج *Hyoscyamus* الفصيلة الباذنجانية Solanaceae (Robbers وآخرون، 1996)، ويُعد أهم جنس فيها بعد *Datura* و *Atropia*، ويضم 20 نوعاً معظمها منتشر في حوض البحر المتوسط (Saidon، 2008)، إضافة إلى آسيا ووسط أوروبا وجنوبها.

تؤدي المنتجات الطبيعية دوراً مهماً في برامج إنتاج الأدوية في مجال الصناعات الصيدلانية، ما أعطى اهتماماً كبيراً للاستعمال العلاجي (Sasson، 1991)، بالإضافة إلى أن هناك بعض المنتجات الطبية النباتية في الطبيعة لا يمكن إيجاد بديل عنها بالطرق الكيميائية، لذا كان لا بد من إيجاد نظم جديدة وبديلة عن الطرق التقليدية تضمن التزويد المستمر بمختلف المواد الحيوية الفعالة (قلويدات، جليكوزيدات، زيوت طيارة.... إلخ) (Baharathi وآخرون، 2010)، فكانت تقانات زراعة الأنسجة بما فيها تقانة مزارع الكالوس Callus culture من التقانات المهمة كمصدرٍ جديدٍ للمواد الحيوية الفعالة، ويعد أكثر كفاءة من الاعتماد على النبات مباشرة لاستخلاص المركبات المختلفة منها (Mulabagal و Tsay، 2004). كما تُعد مزارع الكالوس مصدراً للاختلافات الوراثية الصبغية (Twardovska وآخرون، 2007 و Lee، 2008 وآخرون، 1995) التي تزيد بزيادة عمر مزرعة الكالوس (Fumihiko وآخرون، 2000، Kunakh وآخرون، 2015).

هذا وتسللك خلايا الكالوس سلوكاً مشابهاً لخلايا نبات الأصل في عمليات النمو وإنتاج المركبات الأيضية (Mary، 2005). وغالباً عملية النمو في المزارع النسيجية تكون مصحوبة بالزيادة في الوزن والحجم، كما أن ظاهرة النمو واحدة من الخواص التي تشارك بها جميع الكائنات الحية، وهذا النمو والتطور بطريقة أو بأخرى يتأثر بالبيئة التي تلعب في بعض الحالات دوراً مهماً في السيطرة على عمليات النمو (Chatfield وآخرون، 2000).

في ظل تطور التقانات الحيوية أصبحت دراسات التنوع الوراثي والثباتية الوراثية ضمن أفراد النوع الواحد باستعمال المعلمات الجزيئية Molecular markers ضرورة ملحة، حيث تُعد المعلمات الجزيئية أدوات مفيدة للكشف عن المورثات المسؤولة عن الصفات ذات الأهمية الاقتصادية والطبية وبالتالي يمكن المحافظة عليها في مصادرها الوراثية، وتقييم التنوع في المجتمعات النباتية المتوافرة (Arafah وآخرون، 2002). تعد تقانة التكرارات البسيطة الترادفية البينية ISSR واحدة من التقنيات الهامة المعتمدة على تفاعل بوليميراز التسلسلي والتي تستخدم بادئات وحيدة طولها (16-18 bp)، كما أنها مناسبة بشكل خاص لدراسات القرابة الوراثية والتنوع الوراثي. فقد استخدمت تقانة ISSR لدراسة التنوع الوراثي بين 24 طراز وراثي لنبات البنج تعود للأنواع: *H. arachoides*, *H. kurdicus*, *H. pusillus*, *H. niger reticulates*, باستخدام 19 بادئة، حيث بين التحليل العنقودي (Cluster analysis) توزيع الطرز المدروسة في عنقودين رئيسيين، وقد تراوحت درجة التشابه الوراثي بين الطرز من 0.09 حتى 0.53 (Nejadhabibvash وآخرون، 2012). وفي دراسة أخرى للتباينات الوراثية بين عدة طرز لنبات البنج الذهبي *H. aureus* المنتشرة في جنوب سورية باستخدام 18 بادئة ISSR والتي أعطت ما مجموعه 56 حزمة، كان 49 منها ذات تعددية شكلية Polymorphic (بنسبة 87.5%). أما نتائج التحليل العنقودي فأظهرت توزيع الطرز في عنقودين رئيسيين حسب مناطق انتشارها الجغرافية (بشر وآخرون، 2014).

يهدف هذا البحث إلى:

- ◆ دراسة سلوك وديناميكية نمو كالوس نبات البنج الذهبي المستتبت سابقاً على وسط مدعم بالفيتامينات والأحماض الأمينية ومنظمات النمو مقارنة بتميته على أوساط مغذية خالية من منظمات النمو النباتية خلال مراحل عمرية مختلفة .
- ◆ دراسة التباينات الوراثية بين التجمعات الخلوية النامية في المعاملات المدروسة بتطبيق تقانة التكرارات البسيطة الترادفية البينية (ISSR) .

مواد البحث وطرائقه

مكان تنفيذ البحث: نفذ البحث في مخبر النباتات الطبية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية / دمشق، ومخبر التقانة الحيوية في كلية الزراعة بجامعة دمشق خلال العام 2015-2016.

تنمية الكالوس على الأوساط المغذية المختبرة : تم العمل على الخط الخلوي 5C₀₁ المستحصل عليه من كالوس نبات البنج الذهبي *H. aureus* أثناء دراسة سابقة نفذت في مخبر النباتات الطبية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية (بشر وآخرون، 2012)، والذي اتسم بقوة نموه ومحتواه العالي من قلويدات التروبان لعدة سنوات، حيث اختبر تنمية الكالوس ومتابعة نموه وتطوره ومدى تأقلمه على أوساط مغذية خالية من منظمات النمو (الجدول. 1) (Vollosovich، 1985) انطلاقاً من الخط الخلوي 5C₀₁ الذي اعتبر خط خلوي أم، وأخذت عليه كافة القراءات كشاهد في كل تجارب البحث.

دراسة بعض الصفات الشكلية للكالوس المستحدث: أثناء تنمية الكالوس على الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو (5C, 6C, 10C) أعيدت زراعته على الأوساط نفسها لخمسة مرات متتالية للتخلص من تأثير الوسط الأم قبل أخذ مؤشرات النمو وقراءات الوزن الرطب، ثم نمي الكالوس على الأوساط السابقة مدة 50 يوماً، وهي الفترة التي درست فيها بعض الصفات الشكلية للكالوس الناتج، مثل لون الكالوس، وقوام الكالوس، والشكل المظهري، وقوة نمو الكالوس وحجمه (Turhan، 2004، AL- Ammouri، 2006)، بدءاً من اليوم الأول للزراعة وحتى اليوم 50 بفارق 5 أيام بين كل قراءة.

دراسة ديناميكية نمو الخلايا في كالوس نبات البنج الذهبي: أخذت عينة مؤلفة من ثلاثة مكررات كل خمسة أيام وعلى مدار 50 يوماً وذلك لرسم تابع النمو لخلايا الكالوس المستحدث على الأوساط المدروسة، وحسب الوزن الرطب في كل مكرر، وأخذت القراءات على ثلاثة نقلات متتالية لكل وسط مغذي، حيث اعتبر الوزن الرطب كمؤشر لقوة نمو الكالوس على الأوساط المغذية المختبرة.

جدول (1). تركيب الأوساط المغذية المستخدمة في تنمية كالموس *H. aureus* انطلاقاً من الخط الخلوي 5C₀₁ (Vollosovich, 1985)

Component	5C ₀₁	5C ₁	6C	10C
KNO ₃	1.1 g.L ⁻¹	1.1 g.L ⁻¹	1.1 g.L ⁻¹	0.3 g.L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	0.5 g.L ⁻¹	0.5 g.L ⁻¹	1.0 g.L ⁻¹	2.5 g.L ⁻¹
MgSO ₄	0.5 g.L ⁻¹	0.5 g.L ⁻¹	0.5 g.L ⁻¹	1.3 g.L ⁻¹
KCl	0.07 g.L ⁻¹	0.07 g.L ⁻¹	0.07 g.L ⁻¹	0.07 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3 g.L ⁻¹	0.3 g.L ⁻¹	0.3 g.L ⁻¹	0.3 g.L ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.9 g.L ⁻¹	0.9 g.L ⁻¹	0.9 g.L ⁻¹	0.9 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ H ₂ PO ₄	0.1 g.L ⁻¹	0.1 g.L ⁻¹	0.1 g.L ⁻¹	0.3 g.L ⁻¹
NH ₄ ·H ₂ PO ₄	0.6 g.L ⁻¹	0.6 g.L ⁻¹	0.6 g.L ⁻¹	0.2 g.L ⁻¹
Thiamine – HCl (B1)	1 mg.ml ⁻¹	1 mg.ml ⁻¹	1 mg.ml ⁻¹	5 mg.ml ⁻¹
Pyridoxine (B6)	0.5 mg.ml ⁻¹	-	-	-
Nicotine acid (P.P)	0.5 mg.ml ⁻¹	-	-	-
Kinetin (K)	1 mg.ml ⁻¹	-	-	-
Naphthalene acetic acid (NAA)	2 mg.ml ⁻¹	-	-	-
Glycine	2 mg.L ⁻¹	-	-	-
Myo-Inositol	80 mg.L ⁻¹	-	-	-
Casein	500 mg.L ⁻¹	-	-	-
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27.85 mg.L ⁻¹	27.85 mg.L ⁻¹	27.85 mg.L ⁻¹	27.85 mg.L ⁻¹
Na ₂ · EDTA	37.25 mg.L ⁻¹	37.25 mg.L ⁻¹	37.25 mg.L ⁻¹	37.25 mg.L ⁻¹
MnSO ₄ ·5H ₂ O	24.1 mg.L ⁻¹	24.1 mg.L ⁻¹	22 mg.L ⁻¹	22 mg.L ⁻¹
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10.62 mg.L ⁻¹	10.62 mg.L ⁻¹	10.6 mg.L ⁻¹	10.6 mg.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	6.2 mg.L ⁻¹	6.2 mg.L ⁻¹	12 mg.L ⁻¹	11.50 mg.L ⁻¹
KI	0.83 mg.L ⁻¹	0.83 mg.L ⁻¹	0.83 mg.L ⁻¹	0.83 mg.L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25 mg.L ⁻¹	0.25 mg.L ⁻¹	0.21 mg.L ⁻¹	0.2 mg.L ⁻¹
CuSO ₄ ·2H ₂ O	0.025 mg.L ⁻¹	0.025 mg.L ⁻¹	0.025 mg.L ⁻¹	0.025 mg.L ⁻¹
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025 mg.L ⁻¹	0.025 mg.L ⁻¹	0.055 mg.L ⁻¹	0.1 mg.L ⁻¹
Agar	7 g.L ⁻¹	7 g.L ⁻¹	7 g.L ⁻¹	7 g.L ⁻¹
Sucrose	50 g.L ⁻¹	50 g.L ⁻¹	60 g.L ⁻¹	100 g.L ⁻¹

دراسة التباينات الجسمية بين مزارع الكالوس:

- طحن وزن 100 مغ من الكالوس الطازج بعمر 21-25 يوماً (مرحلة الطور الأسي) لكل المعاملات المدروسة (5C01, 5C, 6C, 10C)، بالإضافة للنبات الأم، وعزل DNA منها بطريقة CTAB (Ctyle Trimethyl Ammonium Bromide) وفقاً لـ (Doyle و Doyle ، 1990) .
- استخدم جهاز مقياس الطيف الضوئي (UV Spectrophotometer) نوع HITASHE لتقدير كمية DNA وتحديد نقاوته عند طول موجة 260 و 280 نانو متر، واختبرت نوعية DNA على هلامه الأغاروز 0.8%، ومن ثم مُدّد تركيز الحمض النووي المستخلص DNA في جميع العينات ليصبح 50 نانو غرام / ميكرو لتر.
- اختبرت تقانة ISSR للكشف عن التباينات الجسمية Somaclonal variation بين الخطوط الخلوية لمزارع الكالوس كتقانة لا تتطلب جهود كبيرة، باختبار 25 بادئة نوعية تمّ تصنيعها في شركة Alpha DNA، ويبين الجدول (2) التسلسل النكليوتيدي لهذه البادئات.

جدول (2) التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في تطبيق تقانة ISSR ودرجة حرارة التحامها

البادئة	التسلسل النكليوتيدي 5'→3'	درجة حرارة الالتحام	البادئة	التسلسل النكليوتيدي 5'→3'	درجة حرارة الالتحام
Oligo 34	(CA) ₈ A	50	Oligo 48	(GA) ₆ GC	55
Oligo 35	(CA) ₆ GT	55	Oligo 49	(GA) ₈ C	43
Oligo 36	(CA) ₈ G	43	Oligo 50	(GA) ₈ CG	43
Oligo 37	(CA) ₈ T	43	Oligo 51	(CT) ₈ G	52
Oligo 39	GAG(CA) ₇	43	Oligo 52	(TC) ₈ C	51
Oligo 40	(AC) ₈ T	43	Oligo 53	CCAG(GT) ₇	56
Oligo 41	(AC) ₈ G	43	Oligo 54	(GT) ₄ (GA) ₅	54
Oligo 42	(AC) ₈ CTA	43	Oligo 55	(GT) ₆ CC	55
Oligo 43	AGT(AC) ₇	43	Oligo 56	(GT) ₆ GG	55
Oligo 44	(AG) ₈ C	43	Oligo 57	AGC(GT) ₇	43
Oligo 45	(AG) ₈ CA	51	Oligo 58	ACG(TG) ₇	43
Oligo 46	(AG) ₈ TC	43	Oligo 59	(TG) ₈ AGT	43
Oligo 47	(GA) ₈ T				51

- ضُخِم بعد ذلك DNA من خلال تفاعل بوليميراز التسلسلي PCR (Williams وزملاؤه، 1990) ليكون حجم التفاعل النهائي 25µl يتكون من 2 ميكرو لتر من المادة الوراثية لكل عينة و 12.5 ميكرو لتر (Kapa) Master Mix و 1.25 ميكرو لتر من البادئة، ثم أكمل الحجم إلى 25 ميكرو لتر بالماء المقطر المعقم، وأجري تفاعل الـ PCR باستخدام Kapa 2G fast ready Mix PCR kit وفق تعليمات الشركة المصنعة، ثم فصلت حزم الـ DNA بعد ذلك بالترجيل على هلامة الأغاروز 2% في محلول 1X TBE (Sambrook وآخرون، 1989).

6- التحليل الإحصائي:

تم تبويب النتائج وفق التصميم العشوائي التام (CRD) Completely Random Design، أما تحليلها فقد تم باستخدام برنامج Excle Stat وذلك لحساب المتوسطات، ثم مقارنة الفروقات المعنوية بين المتوسطات (ANOVA) وذلك عند مستوى معنوية 1%.

أما نتائج الدراسة الجزيئية فقد تمت باستخدام برنامج Totalab (Ultra. Lum Inc., Claremont, Calif) لتحديد حجم حزم الـ DNA الناتجة عن التضخيم، وتحويل المعطيات للنظام الثنائي (1 للحزمة الموجودة و 0 للحزمة الغائبة)، وحسبت مصفوفة عدم التوافق الوراثي اعتماداً على معامل Jaccard، ثم استخدمت هذه المصفوفة لإجراء التحليل العنقودي بتطبيق طريقة متوسطات المجموعات الزوجية غير الموزنة (UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging) ورسم شجرة القرابة الوراثية Dendrogram باستخدام برنامج Power Marker (Jaccard، 1908).

النتائج والمناقشة

1- الوصف المظهري للكالوس الناتج على الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو:

امتاز كالوس نبات البنج الذهبي بسهولة نموه وإدامته على الأوساط الجديدة الخالية من منظمات النمو النباتية، فقد وجد أن الكالوس المزروع على جميع الأوساط المدروسة كان جيد النمو مع تفوق الوسط الشاهد في قوة نمو الكالوس (الجدول، 3). وقد تدرج لون الكالوس من الأبيض الكريمي في الخط الخلوي الأم (الشاهد) 5C₀₁ إلى الأبيض المصفر في الوسط 6C والأصفر في الوسط 5C والأصفر المخضر مع وجود اللون البني في الوسط 10C، وبشكل عام كان قوام الكالوس متماسك وذات مظهر حبيبي مرغوب على جميع الأوساط المدروسة (الشكل، 1).



شكل (1) نمو الكالوس على الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو المقارنة مع الشاهد بعمر 50 يوم

جدول (3) بعض الصفات المظهرية لكالوس نبات البنج الذهبي على الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو

10C	6C	5C	Control (5C ₀₁)	صفات الكالوس
حبيبي خشن	حبيبي خشن	حبيبي خشن	حبيبي خشن	الشكل
متماسك صلب	متماسك صلب	متماسك صلب	متماسك صلب	القوام
بني مخضر	أبيض مصفر	أصفر	أبيض كريمي	اللون
++	+++	+++	++++	الحجم

+ نمو ضعيف، ++ نمو متوسط، +++ نمو جيد، ++++ نمو جيد جداً

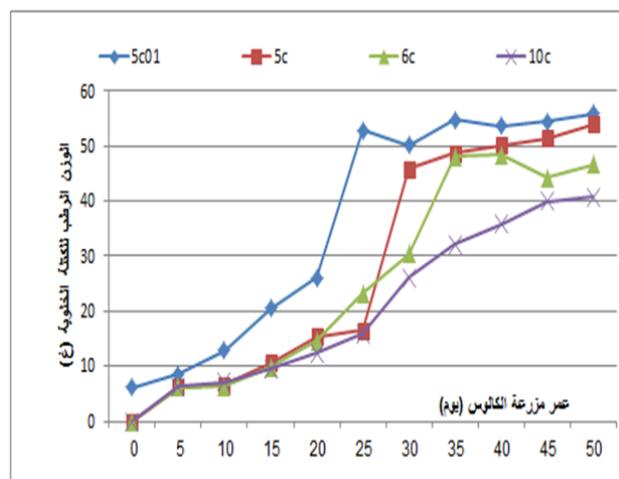
حيث يتصف الكالوس جيد النمو والمرغوب بالشكل الحبيبي المترافق مع القوام المتماسك صعب التفتت واللون الكريمي الفاتح، أما تدرج لون الكالوس من الكريمي إلى البني واسمرار الأنسجة النباتية يعود بشكل

رئيسي إلى تراكم بعض نواتج الاستقلاب الثانوية عموماً والفينولات خصوصاً في وسط الزراعة (Ali وآخرون، 2003)، نتيجة نشاط بعض الأنزيمات مثل البولي فينول أوكسيداز (PPO) Poly- phenoloxidae والبيروكسيداز (POD) Peroxidase التي تشارك في تحفيز أكسدة المركبات الفينولية واسمرار الأنسجة النباتية، ويرتبط ذلك بشكل رئيس بتركيز السكرور المضاف إلى الوسط المغذي، فكلما زاد تركيز السكرور زاد تركيز المركبات الفينولية وبالتالي فإن معدل النمو العام للخلايا ينخفض بشكل ملحوظ مع زيادة تركيز الفينولات والتي تؤدي في النهاية إلى تماوت الخلايا النباتية، وهذا يتفق مع نتائج دراسة كل من Yildiz وآخرون عام 2007 على نبات الشوندر السكري *Beta vulgaris* و Julkunen عام 1996 على نبات الصفصاف *Salix myrsinifolia*.

2- ديناميكية نمو الكالوس في الأوساط المغذية الخالية من منظمات النمو:

يبين الشكل (2) أنّ تابع النمو لخلايا الكالوس في جميع الأوساط المختبرة اتخذت شكل التابع السيني Sigmoid، المؤلف من ثلاثة أطوار رئيسة (الطور المتكئ، و طور الزيادة الأسية، و طور الثبات) والذي يوضح العلاقة بين الوزن الرطب للخلايا وفترة التحضين.

الوسط العمر (يوم)	5c01	5c	6c	10c	l.s.d
0	6.09 a	6.197 a	6.17 a	6.317 a	0.404
5	8.6 a	6.66 ab	6.243 b	7.1 ab	2.075
10	12.885 a	10.617 b	9.777 b	9.507 b	1.633
15	20.515 a	15.383 ab	14.643 b	12.341 b	4.676
20	26.105 a	16.503 b	23.27 a	15.945 b	6.236
25	52.825 a	45.937 a	30.333 b	26.096 b	11.871
30	50.155 a	48.73 a	48.127 a	32.179 b	7.263
35	54.815 a	50.113 a	48.38 a	35.870 b	7.667
40	53.61 a	51.41 a	44.347 b	40.032 c	3.985
45	54.415 a	54.013 a	46.71 b	40.679 b	7.516
50	55.86 ab	57.35 a	56.613 a	43.554 b	11.130



شكل (2) ديناميكية نمو الخلايا في مزارع الكالوس لنبات البنج الذهبي خلال 50 يوماً

يُلاحظ من الشكل السابق تفوق الشاهد (5C₀₁) معنوياً في وزن الكتلة الخلوية بالمقارنة مع الوسط 5C في عمر (10 و 20) يوم في حين كان التفوق غير معنوياً في باقي الأعمار، كما كان تفوق الشاهد معنوياً بالمقارنة مع الوسط 6C في عمر (5, 10, 15, 25, 40, 45) يوم.

أما بالنسبة للوسط 10C فقد كان تفوق الشاهد معنوياً في كل المراحل العمرية باستثناء بداية الطور المتلكئ (0-5) أيام.

وقد تراوح الوزن الرطب للكتلة الخلوية في الطور الأسّي بين (26.105-52.825) غ بالشاهد بالمقارنة مع (16.503 - 45.937) و (23.27-30.333) و (15.945-26.096) غ في الأوساط 5C، 6C، 10C على التوالي، على الرغم من تقارب الوزن الرطب للكتلة الخلوية في اليوم الأول من عمر مزارع الكالوس، في حين تقارب الوزن الرطب للكتلة الخلوية في اليوم الخمسين (طور الثبات) في كل من الشاهد والأوساط 5C، 6C، 10C وبدون فروقات معنوية بينها، في حين كان هناك فروق معنوية بين الوسطين 5C، 6C والوسط 10C.

ويعزى تفوق الوسط الشاهد بوزن الكتلة الخلوية إلى غناه بمنظمات النمو (KIN, NAA) والفيتامينات والأحماض الأمينية (Myo-Inositol, B6, P.P, Glycine, Casein,) المستخدمة بالمقارنة مع الأوساط الأخرى المختبرة والخالية من منظمات النمو، وتتوافق هذه النتائج مع نتائج كل من George وآخرون (2008)، و Eriksson (1965) على نبات *Haplopappus*. ويعزى بالمقابل نجاح تشكل الكالوس وقوة نموه على الأوساط المختبرة الخالية من منظمات النمو إلى توليفة العناصر الداخلة في تركيب الأوساط (5C-6C- 10C) بالمقارنة مع وسط MS (Murashige و Skoog، 1962) حيث تحتوي هذه الأوساط على تركيز مرتفع من العناصر المعدنية المغذية مثل عنصر الآزوت، الذي يدخل في بناء الأحماض الأمينية والنوية والبروتينات والأنزيمات المساعدة (Coenzymes). وهذا يتفق مع ما أكدها Hilton و Rhodes (1994) في دراستهما على المزارع الخلوية لأنواع الداتورة *Datura*.

بالإضافة إلى ذلك، تحتوي الأوساط المغذية المختبرة على تراكيز مرتفعة من السكر (50، 60، 100 غ.ل⁻¹) على التوالي بدلاً من 30 غ في وسط MS المستخدم في معظم مختبرات الزراعة النسيجية (Murashige و Skoog، 1962)، وهذا يتوافق مع نتائج Besher وآخرون (2014) على نبات البنج *H.aureus*، حيث يعد السكر مصدر الكربوهيدرات الأساسي للخلية النباتية ليزودها بالطاقة اللازمة للنمو والبقاء. وتتفق هذه النتائج مع ما أشار إليه Hilton و Rhodes (1994) في دراستهما على مزارع الجذور المحورة لنبات الداتورة سترامونيوم *D. stramonium*. أما انخفاض مقدار النمو في الوسط 10C بالمقارنة مع باقي الأوساط فيمكن أن يعزى إلى مجموعة عوامل، أهمها أن الوسط 10C يحوي تركيز أعلى من السكر 100 غ.ل⁻¹ ما ثبط عمليات نمو الخلايا في المزارع النسيجية، نتيجة زيادة الجهد الحلوي Osmotic potential الذي يؤدي إلى حدوث ظاهرة البلزمة Plasmolysis في الخلايا نتيجة خروج الماء منها إلى الوسط المحيط حسب فرق التدرج في الجهد المائي، ما يؤدي إلى تراجع ضغط الامتلاء Turgor pressure داخل الخلايا النباتية الضروري لاستطالتها، ما يؤدي إلى توقف نموها (Zouine و EL-Hadrami، 2004، AL Maarri و Al Ghamdi، 1997). وهذا ما يتوافق مع نتائج Short و Warburton (1987) حول تأثير تراكيز مختلفة من السكر في نمو ووزن الخلايا في المزارع الخلوية لنباتي القرنبيط *Brassica oleracea var botrytis* والأقحوان *Chrysanthemum morifolium*. ويحتوي أيضاً الوسط 10C على كمية أكبر من الأزوت بصورة نترات (NO_3^-) وأمونيا (NH_4^+)، فقد بينت الدراسات أن إضافة التراكيز المرتفعة من نترات الأمونيوم من الممكن أن تحول دون نمو الخلايا، وذلك لأن الأمونيوم سهل التراكم داخل الأنسجة النباتية ليصبح بتراكيز سامة إذا لم يتم استقلابه مباشرة، وبذلك عندما يكون تركيزه منخفضاً في وسط الزراعة فإن معظم الكمية تستفيد منها الخلايا في عمليات الاستقلاب وتصنيع الأحماض الأمينية، وعلى العكس إذا وجد بتراكيز مرتفعة فإن جزءاً بسيطاً منه فقط يتم استقلابه من قبل الخلايا (Nagella و Murthy، 2010).

Bensaddek وآخرون، 2001). وهذا يتوافق مع نتائج Napaporn وآخرون (2014) على نبات العنب *Vitis vinifera*.

من جهة أخرى، فإنّ الوسط 10C كذلك يحتوي خمسة أضعاف ما تحويه الأوساط الأخرى من الثيامين B1، حيث تؤثر زيادة تركيز الثيامين في وسط الزراعة النسيجية سلباً في نمو الخلايا ووزنها، وهذا ما أثبتته Al-Khayri (2001).

بشكلٍ عام، يمكن تفسير نمو الكالوس في أوساط مغذية خالية من منظمات النمو النباتية بظاهرة التطبع الهرموني Hormone habituation وهي حالة تحصل كنتيجة لاستمرار نمو الكالوس في وسط الإدامة بوجود منظمات النمو، حيث تتمكن خلايا الكالوس وبمرور الزمن من النمو في وسط خالٍ من المنظمات، وتُفيد هذه الظاهرة بتقليل أو حذف كلفة منظمات النمو وتقليل خطوات العمل والتخلص من احتمالية الخطأ في تحضير تراكيز المنظمات وغيرها (Kevers وآخرون، 1996).

3- التحديد الكمي والنوعي للـ DNA:

قيس تركيز ونقاوة الـ DNA المستخلص من 100 مغ من التجمعات الخلوية لكالوس البنج والنبات النامي في الزجاج بجهاز المطياف الضوئي (UV-Spectrophotometer)، حيث تراوحت التراكيز بين 300 و 850 µg/µl، ونقاوة العينات بين 1.05 و 1.81، ومُدّد تركيز DNA ليصبح 50 ng/µL وعند تطبيق عملية الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز بتركيز 0.8% لمعرفة نوعية DNA المستخدم، ظهر DNA الناتج بشكل حزمة واضحة وغير متقطع. يبين الجدول (4) تراكيز ونقاوة عينات DNA المدروسة.

يعود اختلاف نقاوة عينات DNA ربما لوجود بروتينات في محلول DNA، حيث تستطيع كل من البروتينات والـ RNA امتصاص أشعة UV عند طول موجة 260 nm (Adams، 2003)، ما يؤثر على القراءة عند طول الموجة 260 nm وينعكس ذلك على نقاوة وتركيز الـ DNA، كما يتأثر تركيز الـ

DNA بعدد الخلايا الموجود في العينة النباتية، وبالتالي كلما كان عدد الخلايا أكثر كلما كانت كمية الـ DNA أكبر ويعود ذلك إلى مدى ملائمة الوسط المغذي لنمو الخلايا وانقسامها.

جدول (4). تراكيز ونقاوة عينات الـ DNA في كالوس البنج والنبات النامي في الزجاج

العينة	تركيز DNA µg/µl	نقاوة DNA
النبات في الزجاج	810	1.81
الشاهد 5C01	850	1.52
5C	790	1.32
6C	840	1.05
10C	300	1.20

4- التعددية الشكلية Polymorphism الناتجة عن تطبيق تقانة ISSR:

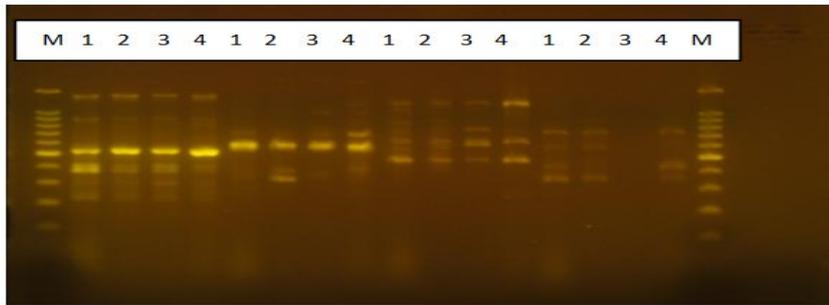
تضمنت الدراسة الجزيئية لكالوس نبات البنج الذهبي استعمال 25 بادئة نوعية أثبتت جميعها فعاليتها في إعطاء تعددية بين مزارع الكالوس، حيث نتج عن استعمال هذه البادئات نحو 217 حزمة بمتوسط 8.68 حزمة لكل بادئة، منها 187 حزمة ذات تعددية شكلية Polymorphic بمتوسط 7.48 لكل منها ونسبة تعددية شكلية 86.175%.

جدول (5). العدد الكلي للحزم وعدد الحزم المتعددة شكلياً ونسبة التعددية الشكلية

البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتعددة شكلياً	نسبة التعددية الشكلية %
oligo 34	7	6	85.71
oligo 35	4	3	75
oligo 36	13	13	100
oligo 37	9	6	66.67
oligo 39	13	11	84.62
oligo 40	8	5	62.5
oligo 41	12	9	75
oligo 42	6	6	100
oligo 43	8	5	62.5
oligo 44	11	8	72.72
oligo 45	11	10	90.91
oligo 46	8	8	100
oligo 47	6	5	83.3
oligo 48	7	7	100
oligo 49	4	4	100
oligo 50	5	4	80

100	8	8	oligo 51
100	4	4	oligo 52
100	9	9	oligo 53
93.75	15	16	oligo 54
100	7	7	oligo 55
100	11	11	oligo 56
75	6	8	oligo 57
71.43	10	14	oligo 58
87.5	7	8	oligo 59
86.175	187	217	المجموع
-	7.48	8.68	المتوسط

وقد أعطت البادئات (Oligo 36, oligo 42, oligo 46, oligo 48, oligo 49, oligo 51, oligo 52, oligo 53, oligo 55, oligo 56) أعلى نسبة للتعددية الشكلية 100%، في حين أعطت المرئستان oligo 40 و oligo 43 أقل نسبة تعددية شكلية 62.5%، كما أعطت البادئة oligo 54 أكبر عدد من الحزم 16 حزمة، في حين أعطت البادئات (oligo 35, oligo 49, oligo 52) أقل عدد من الحزم (4) لكل منها، (الجدول، 5) .



(الشكل.3) ترحيل نواتج PCR مع البادئات، oligo 44، oligo 46، oligo 51، oligo 52 بدءاً من اليسار
10C:4, 6C:3, 5C:2, 5C₀₁:1

وعند تطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (Percent Disagreement Values) PDV (الجدول، 6)، يدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود اختلاف وراثي ويزداد بازديادها التباين الوراثي، فقد تراوحت أقل قيمة لمعامل Jaccard 0.26 بين الشاهد 5C₀₁ والخط الخلوي 5C ما يعني أنهما

الأكثر تشابهاً وراثياً، بينما كانت أعلى قيمة 0.78 بين النبات الأم النامي في الزجاج والخط الخلوي 6C، ما يدل على أنهما الأبعد وراثياً.

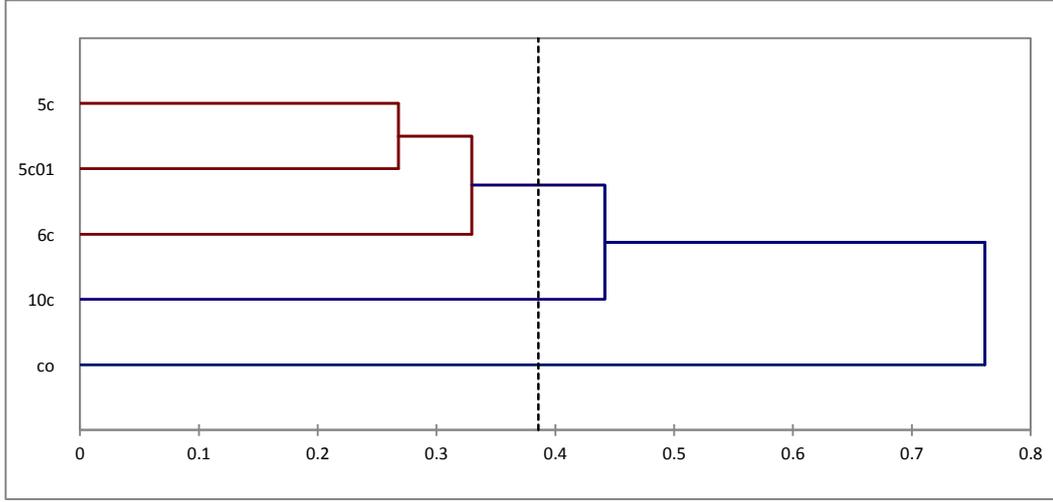
جدول (6) مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق PDV بين الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج الذهبي والناجحة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقنية ISSR

	5C ₀₁	5C	6C	10C	In vitro plant
5C ₀₁	0				
5C	0.26	0			
6C	0.33	0.32	0		
10C	0.45	0.38	0.48	0	
In vitro plant	0.74	0.76	0.78	0.75	0

إن لمكونات الوسط المغذي الدور الرئيس في هذا التباعد الوراثي بين الخطوط الخلوية لكالوس، تتفق هذه النتائج مع نتائج (Iwase وآخرون، 2011) التي تؤكد اختلاف أنواع مزارع الكالوس العائدة لنفس النبات وراثياً، وذلك لأن عملية تنشئة الكالوس تتضمن تغييرات هائلة في التعبير الجيني نتيجة لتغير مستوى تمايز الخلايا وإعادة التمايز بعد التحول إلى الحالة المريستيمية المنقسمة (غير المتميزة) (Ohtani و Sugiyama، 2005).

5- دراسة التباينات الوراثية بين الخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج والنبات الأم النامي في الزجاج:

يظهر التحليل العنقودي في الشكل (4) انفصال العينات المدروسة حسب درجة تشابهها الوراثي، فقد انفصل النبات الأم النامي في الزجاج في عنقود واحد، في حين تجمعت الخطوط الخلوية لكالوس في عنقود آخر بمسافة قدرها 0.76 عن النبات الأم، كما انفصلت الخطوط الخلوية لكالوس إلى تحت عنقودين ضم الأول الخط الخلوي 10C منفرداً، والذي انفصل بمسافة 0.44 عن تحت العنقود الآخر الذي ضم الخطوط الخلوية (5C₀₁, 5C, 6C)، وهذا بدوره انفصل إلى مجموعتين أصغر: الأولى ضمت 6C والثانية ضمت 5C₀₁, وكانت المسافة بين هاتين المجموعتين 0.33، في حين كان الخطين الخلويين 5C₀₁, 5C الأقرب إلى بعضهما وراثياً حيث وضعاً في مجموعة واحدة بمسافة 0.27.



الشكل (4). التحليل العنقودي للخطوط الخلوية لكالوس نبات البنج والنبات الأم النامي في الزجاج الناتج عن تطبيق تقانة ISSR

يبين هذا التحليل أن التباين الوراثي الظاهر حُرض حسب مكونات وسط زراعة الكالوس التي كان لها دوراً رئيس في إحداث هذه التباينات الوراثية بين مزارع الكالوس من جهة، على الرغم من أنها أُخذت من المصدر نفسه (5C₀₁)، وبينها وبين النبات الأم النامي في الزجاج من جهة أخرى، وذلك لأن خلايا الكالوس فقدت صفة التمايز وعادت للحالة المنقسمة المرستيمية غير المتميزة، فأصبحت تختلف عن النبات النامي في الزجاج مورفولوجياً ووراثياً (Ikeuchi وآخرون، 2013، Sugiyama و Ohtani، 2005). مما أدى إلى انفصال النبات النامي في الزجاج في عنقود منفرد عن جميع الخطوط الخلوية الأخرى بما فيها الشاهد، ما يؤكد على أهمية مزارع الكالوس كمصدر مهم للاختلافات الوراثية (Iwase وآخرون، 2011) وفعالية تقانة ISSR في كشف هذه الاختلافات.

تؤكد النتائج السابقة أن تقانة زراعة الكالوس Callus culture هي تقانة مفيدة في عمليات الانتخاب الخلوي للوصول إلى سلالات خلوية يمكن أن تكون عالية الإنتاجية من المواد الفعالة حيويًا.

الاستنتاجات والتوصيات:

- 1- نجاح تنمية الكالوس على أوساط مغذية خالية من منظمات النمو النباتية انطلاقاً من الخط الخلوي الأم الغني بالفيتامينات والأحماض الأمينية ومنظمات النمو النباتية.
- 2- إمكانية تحفيز التباينات الجسمية بين التجمعات الخلوية في مزارع الكالوس ما يجعل من تقانة زراعة الكالوس Callus culture مصدراً هاماً للاختلافات الوراثية يمكن الاستفادة منها في عمليات الانتخاب الخلوي للوصول إلى سلالات خلوية عالية الإنتاجية من المواد الفعالة حيويًا.
- 3- نوصي بمتابعة الدراسة على الخطوط الخلوية الناتجة من الناحية الكيميائية والخلوية والصبغية لمعرفة العمر الأمثل لمزارع الكالوس الذي يجب أن تطبق فيه عملية الانتخاب الخلوي.

المراجع

- بشر، شذى و العموري، يوسف و لاوند سلام. 2012. التنوع الوراثي لنبات البنج الذهبي (*Hyoscyamus aureus*) وإنتاج قلويداته بالزرع في الزجاج. أطروحة ماجستير، جامعة دمشق. ص:87-90.
- بشر، شذى و العموري، يوسف و لاوند سلام. 2014 . التوصيف الجزيئي والشكلي لبعض الطرز البرية لنبات البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus* L. في المختبر. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، المجلد 30(1) ص: 79-95 .
- Adams, D. S. 2003.** In: Lab Math: A Handbook of Measurements, Calculations, and Other Quantitative Skills for Use at the Bench Chapter 5, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 127-45.
- Ajungla, L. P., P. Patil. R. B. Barmukh and T. D. Nikam. 2009.** Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root culture of *Datura metel* L. .Ind. Jou of Bio, 8:317 -322.
- Al-Ammouri, J. 2006.** Submerged maintenance technology drill for *Rauwolfia serpentine* tissue culture as indoline alkaloids producent. Manuscript. Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine Kyiv.
- Ali, N., R. M. S. Mulwa, M. A Mortan, R. M. Skirvin. 2003.** Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*.78:739-741.
- Al-Khayri, J. M. 2001.** “Optimization of Biotin and Thiamine Requirements for Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.),” In Vitro Cellular & Develop- mental Biology—Plant, 37(4): 453- 456.
- Al-Maarri, K. W and A.S. Al-Ghamdi. 1997.** Micropropagation of Five Date Palm Cultivars Through *in vitro* Axillary Buds Proliferation. D.U.J. Agri. Sci. Vol. 13.
- Arafeh, R. M. H., Y. Sapir. A. Shmida. N. Iraki. O. Fragman, and P. Comes. 2002.** Patterns of genetic and phenotypic variation *Iris hayni* and *I. atrofusca*

(Iris sect. *Onocyclus* = the royal irises) along an ecogeographical gradient in Palastine and the West Bank, *Mol. Ecol.* 1:39-53

- Baharathi, B., R. Sharmiladovi, and G. S. Daniel. 2010.** Studies on antibacterial activity and phytochemical analysis of *Datura metel L.* against bacterial pathogens associated with AIDS. *Advanced Biotech.* 10(03):21-25.
- Bensaddek, L., F. Gillet. J.E.N. Saucedo. M.A. Fliniaux. 2001.** The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *J. Biotechnol.*, 85: 35–40.
- Besher, SH., Y. Al-Ammouri and R. Murshed. 2014.** Production of tropan alkaloids in the in vitro and callus cultures of *Hyoscyamus aureus* and their genetic stability assessment using ISSR markers. *Physiol Mol Biol Plants.* 20(3):343–349
- Chatfield, S. P., P. Stirnberg., B. G. Forde and O. Leyser, 2000.** The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24: 159–169.
- Dixon, R. A. 1999.** Plant natural products: the molecular genetic basis of biosynthetic diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 192-197.
- Doyle, J. J and J. L. Doyle. 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus.* 12:13-15.
- Eriksson, T. 1965.** “Studies on the Growth Requirements and Growth Measurements of Cell Cultures of *Haplopappus gracilis*,” *Physiologia Plantarum*, 18(4): 976-993.
- Evans, W. C. (2002):** Trease and Evans' Pharmacognosy. 15th edition, W. B. Saunders Company Ltd. Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto.
- Fumihiko, S., T. Hashimoto. A. Hachiya. K. Tamara K. Choi. T. Morishing. H. Fujimoto and Y. Yamada. 2000.** Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Journal of Academy Science*, 3:367-372.
- Gabriella, P., M. Barbara. M. Nadia. R. Simpna. G. Catia. I. Maria and F. V. Franco. 2005.** The effect of growth regulators and sucrose on anthocyanine

production in *Camptotheca acuminata* cell culture Plant Physiology and Biochemistry, 43: 293-29.

George, E. F., M. A. Hall and G.-J. De Klerk. 2008. “The Components of Plant Tissue Culture Media II,” *Plant Propagation by Tissue Culture*, Springer, Dordrecht:115-119.

Hilton, M. G and M. J. C. Rhodes. 1994. The effect of varying levels of gamborgs B5 salts and temperature on the accumulation of starch and hyoscyamine in batch culture of transformed roots of *Datura stramonium*. Plant Cell Tissue Org. Cult, 38: 45-51.

Iwase. A., M. Ikeuchi., K. Sugimoto . 2011. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression . *Plant Cell*. 25(9): 3159–3173.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution Florale. Bull.Soc. Vaud. Sci. Nat.44:223-270

Julkunen-Tiito, R.1996. Defensive efforts of *Salix myrsinifolia* plantlets in photomixotrophic culture conditions: The effect of sucrose, nitrogen and pH on phytomass and secondary phenolic accumulation. *Ecoscience* 3:297-303

Kevers, C., M. Filali. G. Petit-Paly. D. Hagège. M. Rideau and Th. Gaspar. 1996. Habituation of Plant Cells Does Not Mean Insensitivity to Plant Growth Regulators. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. Plant.32(3): 204-209.

Kunakh, V. A., Mel’nyk, V. M., Drobyk, N. M., Andreev, I. O., Spiridonova, K. V., Twardovska, M. O., Konvalyuk, I. I and Adonin, V. I . 2015. Genetic Variation Induced by Tissue and Organ Culture in *Gentiana* Species. In book: *The Gentianaceae - Volume 2: Biotechnology and Applications*, Chapter: 9, Publisher: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Editors: J.J. Rybczyński et al, pp.199-238.

Lee, M. K., Bang, J. W, Lee, H. K. 1995. Chromosome stability in the cultured cells and the regenerated plants of *Gentiana scabra var. buergeri*. *Chrom Res* 3:116.

- Mahler, R. L. 2004.** Nutrient plants require for growth. University of Idaho Agriculture Experiments Station: 1-4.
- Mary, A. L. (2005).** Valuable secondary products from *in vitro* culture 24 ed. CRC press. 285.
- Michael, H. B. Joanne. G. Simon and M. W. Elizabeth. 2004.** Fundamentals of pharmacognosy and phytherapy. Chuchill Livingstone:309.
- Mouterde, p. (1983).** Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie. Tomes 3,pp: 578. Text and Atlas. Dar El Mashreq, Beyrouth, Liban.
- Mulabagal, V and H. Sh. Tsay. 2004.** Plant Cell Culture an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Internat. J. Appl. Sci. Eng, 2:29–48.
- Murashige, T and F. Skoog. 1962.** A revised Medium for Rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue culture. Plant Physic., 15(1):473-479.
- Nagella, P and H. N. Murthy. 2010 .** Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide A. *Bioresour. Technol*, 101: 6735–6739.
- Napaporn, S. L., O. Kerdchoechuen and N. Laohakunjit. 2014.** Enhancement of Phenolics, Resveratrol and Antioxidant Activity by Nitrogen Enrichment in Cell Suspension Culture of *Vitis vinifera*. *Molecules*, 19: 7901-7912.
- Nejadhabibvash, F.; Rahmani, f.; Heidari, R.; Jami, R. (2012).** Assessment of genetic diversity among *Hyoscyamus* genotypes based on ISSR markers. *International Journal of Agriculture and crop sciences*. 4-17. 1300-1306.
- Ohtani M., M. Sugiyama. 2005.** Involvement of SRD2-mediated activation of snRNA transcription in the control of cell proliferation competence in *Arabidopsis*. *Plant J*. 43: 479–490.
- Robbers. J. A., M. K. Speedie and V. A. Tyler. 1996.** Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology:152. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Saidon, N. A. 2008.** The establishment of embryogenic callus culture of *Hyoscyamusniger* and the detection of hyoscyamine in the culture.

- Sambrook, J., E. Fritsh and T. Maniatis . 1989.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sasson, A. 1991.** Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: Biotechnological and economic aspects. CIHEAM-Options Mediterraneennes (UNESCO) :59-74.
- Short, K. C and J. Warburton. 1987.** *In vitro* hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. Acta Hortic.;212:329–34.
- Swerdlow, J. L. 2000.** Nature's Medicine, National Geographic, Washington: 123-130.
- Turhan, H. 2004. Callus induction and growth in transgenic potato Genotypes.** African Journal of Biotechnology Vol. 3 (8), pp. 375-378.
- Twardovska, M. O., Strashniuk, N. M., Mel'nyk, V.M., Kunakh, V. A. 2007.** Evaluation of some Gentiana L. species tissue culture genetic variation. Visn Ukr Tov Genet Sel 5:104–111.
- Twardovska, M. O., Strashniuk, N. M., Mel'nyk, V. M., Adonin, V. I., Kunakh, V. A. 2008.** Chromosomal variability in a tissue culture of rare species of the genus Gentiana L. Cytol Genet 42:224–228..
- Tytga, A and N. Guido. 2007.** Hyoscinebutyl bromide: A review of its use in the treatment of abdominal cramping and pain. Drugs 67(9):1343–1357.
- Vollosovich, A. G., Martinova, T. U., Polechk, C. 1985.** nutrient medium *FOR Rawollfia serpentina* tissue culture. (A.C. CCCP No 1167895).
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik. K. J. Livak. J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary [primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18(22):6531-6535.
- Yildiz, M., S. Onde, M. Ozgen. 2007.** Sucrose effects on phenolic concentration from Sugar beet leaf and petiole explants. *Journal of Sugar Beet Research.* 4(1&2):1-15.

Zouine, J. and I. El-Hadrami. 2004. Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera* L.: Effect of exogenous supply of sucrose on proteins, sugar, phenolics and peroxidases activities during the embryogenic cell suspension culture . *J. Biotechnology* 3(2):114-118.