تأثير حمض الأبسيسيك (ABA)
في الحفظ والثبات الوراثي للسوسن الأسود *Iris nigricans* المكاثر بالنسج

Effect of Absisic Acid (ABA) *In Vitro* Conservation and Genetic Stability of *Iris nigricans* L.

د. ثريا أبوزيدان[1] د. نبيل البطل[2] د. خليل المعري[2]

Abouzedan Thuraya[1] Al- Batal Nabil[2] Al- Maarri Khalil[2]

zthuraia@gmail.com or kmaarri@yahoo.com

(1) الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، سورية.

(1) National Commission for Biotechnology, P.O.Box. 31902 ,Syria.

(2) قسم علوم البستنة، كلية الزراعة ـ جامعة دمشق، سورية.

(2) Horticultural Depadt., Faculty of Agriculture, P.O.Box. 30621, Damascus University, Syria.

الملخص

نُفذ البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وفي مخابر التقانات الحيوية في قسم المحاصيل الحقلية بكلية الزراعة (جامعة دمشق/ سورية) خلال الفترة من 2014 - 2016. تم في البحث وضع آلية (بروتوكول) لحفظ السوسن الأسود *Iris nigricans* بوساطة تقانات زراعة الأنسجة النباتية، ودرست بعض العوامل المؤثرة في ذلك، كما تم تخفيف النمو، وزيادة الفترة الزمنية بين عمليات النقل ،باستخدام درجتي الحرارة (3 و23 °م)، بالإضافة إلى استخدام تراكيز من حمض الأبسيسيك في الوسط الغذائي (0.5، 1، 2 و3 مغ/ل) دون إضافة منظمات نمو إلى أوساط زراعة القمم النامية.

بينت النتائج أن التركيز 2 مغ/ل أعطى أعلى نسبة بقاء بلغت 84 % وبفروق معنوية مع الشاهد ، في حين أعطى التركيز 0.5 مغ/ل أعلى معدل إكثار (1.85 نمو خضري) وبفروق معنوية مع الشاهد أيضاً، أما بالنسبة لاستطالة الأفرع فقد أعطى الشاهد أعلى قيمة لها (1.12 سم)، في حين توضح النتائج موت جميع النباتات المحفوظة بدرجة حرارة 23 °م بعد مرور 12 شهراً.

تمت دراسة الثبات الوراثي في النباتات المتجددة بعد الحفظ بحمض الأبسيسيك مع النباتات الأم باستخدام تقانة التكرارات التتابعية البسيطة الداخلية (ISSR) وذلك باستخدام 22 بادئاً عشوائياً، وقد كانت نسبة التشابه الوراثي عالية (96 إلى 99 %) مما يدل على عدم حدوث أي تباين وراثي في النباتات المحفوظة بحمض الأبسيسيك.

الكلمات المفتاحيّة : السوسن الأسود، الحفظ بوساطة تقانات زراعة الأنسجة النباتية، حمض الأبسيسيك، الثبات الوراثي، ISSR.

©2020 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved.

ISSN:2305 - 5243 ; AIF-181 (p:41 - 53)

Abstract

Thisresearch was carried out in the laboratories of National Commission for Biotechnology (NCBT) and Faculty of Agriculture (Damascus- Syria) during the years 2014-2016. The aim of this study has been to propagate and preserve Iris nigricans in Syria from deterioration.

In this study, minimum growth conservation has been attempted with 2 temperature regimes (3ºC and 23ºC), and different concentrations of Absisic acid (0, 0.5, 1, 2 and 3 mg/l) free of plant growth regulators using shoot-tip cultures. Results showed, that the highest survival percentage (84%) were observed when using the concentration 2mg/l ABA on 3ºc after 12 months with significant difference compared with the control, the concentration 0.5 mg/l gave the highest rate of multiplication (1.85) with significant difference compared with the control and good shoot length (1.12cm) in control. but at 23ºc, all the cultured were died.

22 ISSR primers were used to determine the Genetic stability in this study. The genetic stability was high (from 96 to 99%) before and after preservation by ABA Therefore, Storage of Iris L. in ABA was found to have no adverse effect (genetic variation) on the regeneration rates.

Keywords: *Iris nigricans, in vitro* conservation, Absisic acid, Genetic stability, ISSR.

المقدمة

إن الهدف الرئيس من الحفظ بوساطة تقانات زراعة الأنسجة هو الحد من عدد مرات النقل، والحفاظ على التنوع الوراثي للأنواع في ظروف معقمة (Shibli وAl-Juboory، 2000؛ Moges وزملاؤه، 2003). ويمكن تحقيق ذلك بعدة طرائق، بهدف تقليل النمو، مثل الحفظ في درجة حرارة منخفضة، أو شدة ضوئية منخفضة، أو التراكيز المنخفضة من العناصر المعدنية المغذية في وسط الزراعة، أو استخدام عناصر أسموزية، أو مثبطات نمو (Grout، 1991؛ Withers، 1991؛ Moges وزملاؤه، 2003).

يعد الحفظ في درجات الحرارة المنخفضة من أهم تقانات زراعة الأنسجة المستخدمة في حفظ الأصول الوراثية (Moges وزملاؤه، 2003)، كما يعمل الحفظ البارد على التخلص من مشاكل الأمراض والإقلال من التعديلات الوراثية، إضافةً إلى تقليل العمل المخبري، ومتطلبات المكان اللازمة (Reed وزملاؤه، 1998)، وضمن هذه الظروف فإن تراكم الدهون غير المشبعة في الأغشية الخلوية سوف يسبب زيادةً في ثخانتها، ويعيق انقسام الخلايا واستطالتها (Engelmann، 1997). يعتمد الحفظ البارد على المنشأ الجغرافي والبيئي للنباتات، إذ ظهر التأثير المثبط للنمو أكثر وضوحاً في درجة حرارة 2 ºم من 24 ºم في حفظ نبات الليليوم (Yun-Peng وزملاؤه، 2012).

يستخدم حمض الأبسيسيك كمثبط نمو في حفظ الأصول الوراثية للنباتات (Yun-Peng وزملاؤه، 2012)، إذ يعمل على إعاقة عمل هرمونات النبات المهمة، مثل: الأوكسينات، السيتوكينينات، والجبريلينات، والتي تسهم بشكل فعال في النمو، وانقسام خلايا النبات واستطالتها (Swamy وSmith، 1999)، كما بيّن بعض الباحثين أن حمض الأبسيسيك مسؤول عن قدرة تحمل أنسجة النبات لدرجة الحرارة (Popova وزملاؤه، 2009)، إذ يؤدي حمض الأبسيسيك دوراً مهماً في تنظيم العديد من العمليات الفيزيولوجية للنباتات، ويحسن من حفظ النباتات مخبرياً، من خلال زيادة تكيف خلايا النبات والأنسجة للإجهادات البيئية المختلفة (Rai وزملاؤه، 2011)، كما يعد من العوامل الرئيسة التي تحفز ظهور طور السكون (Kim وزملاؤه، 1994)، وتم استخدامه في حفظ الكثير من النباتات، مثل البطاطا الحلوة (Arrigoni-Blank وزملاؤه، 2014)، وفي أصناف العنب (Hassan وزملاؤه، 2013)، وفي نبات الجوافة (Barrueto-Cid وCarvalho، 2008).

يضاف حمض الأبسيسيك (ABA) إلى الوسط المغذي لتأخير نمو النباتات، من خلال تسببه بإحداث طور السكون للعضو المستخدم، أو تقليل الإستقلاب الخلوي، أو منع انقسام النواة، لكن نجاح ذلك يعتمد على النوع النباتي المستخدم (Jarret و Gawel، 1991؛ Taylor وزملاؤه، 1996). وجدت تقانة ISSR منذ عام 1994، إذ تعتمد على تكرارات التسلسلات البسيطة الداخلية، وتعطي مستويات عالية من التعددية الشكلية لـ DNA. وتستخدم هذه التقانة كمؤشر جزيئي في دراسات البنية الوراثية والتنوع الوراثي (Zietkiewicz وزملاؤه، 1994؛ Fu- Ronge وزملاؤه، 2007). إن الفائدة الرئيسة لهذه التقانة، هي أنها لا تتطلب وقتاً طويلاً لبناء المكتبة الوراثية، وهي مؤشرات ذات طبيعة عشوائية، إضافةً إلى أن بساطة مؤشرات الـ ISSR تزيد من إمكانية استخدامها في الوسم الجينومي، ولكون مؤشرات ISSR غزيرة، فإنها تعطي عدداً كبيراً من الحزم، ومستوى من التعددية الشكلية مرتفعاً أو متوسطاً، كما أن الجهد والتكلفة اللازمتان لتنفيذها منخفضة نسبياً (Gui وزملاؤه، 2008).

استخدمت مؤشرات ISSR في الدراسات الوراثية للعديد من الأنواع النباتية لأنها فعالة في كشف المستويات المنخفضة جداً من التباينات الوراثية، وطبقت بنجاح في دراسات التنوع الوراثي في عدد كبير من النباتات (Bornet وزملاؤه، 2002).

تبرز أهمية البحث من وجود اهتمام عالمي متزايد بتجميع وحفظ الأصول الوراثية النباتية بسبب إنقراض العديد من الأنواع نتيجة النشاطات البشرية المتزايدة، كما أن العديد من أنواع جنس السوسن مهدد بالانقراض إذا لم توضع خطة لإنقاذ هذه الأنواع، ولاسيما أن بعض هذه الأنواع ذات قيمة تزينية وجمالية مميزة تؤهله لاحتلال مكانة مرموقة في عالم نباتات الزينة.

كما تؤدي تقانات زراعة الأنسجة النباتية دوراً مهما في حفظ وإكثار الأصول الوراثية النباتية، وإنتاج نباتات مطابقة مورفولوجيا ووراثيا للنبات الأم، كما في بعض الأنواع البرية المحلية في سورية، ويكون الهدف الرئيس من الحفظ هو الحد من عدد مرات النقل، والحفاظ على التنوع الوراثي للأنواع في ظروف عقيمة.

أهداف البحث

1 - دراسة تأثير تركيز حمض الأبسيسيك ودرجة الحرارة في حفظ الأصول الوراثية، بزراعة الأنسجة النباتية في نبات السوسن الأسود.

2 - التحقق من الثبات الوراثي في النباتات المتجددة بعد حفظها بحمض الأبسيسيك، ومقارنتها بالنباتات الأم، وذلك باستخدام تقانة الـ ISSR.

مواد البحث وطرائقه

1 - المادة النباتية المستخدمة:

تم إجراء التجارب على نبات السوسن الأسود *Iris nigricans* L. (الشكل 1) ، وهو نبات عشبي معمر يتكاثر بوساطة الريزومات الصغيرة، الأوراق منجلية، يبلغ ارتفاع ساقه نحو 15 إلى 30 سم، المبيض بطول 4 إلى 4.5 سم، والكم الزهري من 2 - 3 سم، والبتلات الخارجية بيضية منعكسة بطول 6 سم ذات أشعار بنية داكنة، البتلات الداخلية بيضية بطول 7 - 8 سم، تفرعات القلم مجنحة بلون بني مسود، ينتشر هذا النوع في منطقتي درعا وازرع / سورية، إذ ينمو هناك بشكل بري (Post، 1934؛ Mouterde، 1983) (الشكل 1). جُمعت ريزومات نباتات السوسن الأسود من خلال القيام بمجموعة من الجولات الحقلية في محافظة درعا في عام 2010، وتم الاحتفاظ بالريزومات، وزراعة قسم منها ليتم الاستفادة منها فيما بعد.

الشكل 1. نبات السوسن الأسود.

2 - طرائق البحث:

- تحضير الأوساط المغذية:

استخدم وسط موراشيج وسكوج MS الموضح تركيبه حسب Auge وزملائه (1984) في جميع مراحل البحث.

- مرحلة الزراعة الأولية:

زرعت العينات النباتية (براعم قمية) المفصولة من الريزومات، وذلك بعد تعقيمها بالكلوروكس (تركيز 3 %) في وسط مغذٍ يحوي المحلول

المعدني الكامل لموراشيج وسكوج (Murashige وSkooge، 1962) مضافاً له 2 مغ/ ل BAP + 0.2 مغ/ ل IBA + 3 غ/ل فحم نشط (الجدول 1). أدت إضافة الفحم النشط إلى الوسط الغذائي لإنخفاض ملحوظ في الاسمرار، وبدء تحريض تشجيع النمو، وتعود التأثيرات الفعالة للفحم النشط لادمصاص المركبات الفينولية المثبطة للنمو والمفرزة من العينات النباتية، مما يؤدي لتخفيف الاسمرار.

- مرحلة الإكثار والاستطالة:

تهدف مرحلة الإكثار إلى الحصول على أكبر عدد ممكن من النموات الخضرية جيدة النمو، بهدف البدء في تنفيذ تجارب البحث، لذا تم نقل النبيتات الناتجة عن مرحلة الزراعة الأولية إلى وسط مغذٍ يحوي المحلول المعدني الكامل لموراشيج وسكوج، ثم وضعت في غرفة النمو على حرارة 23 ± 2°م، وإضاءة 16 ساعة يومياً شدتها 3000 لوكس.

كررت عملية الإكثار خمس مرات متتالية في وسط الإكثار المضاف له 5 مغ/ل BAP+ 0.1 مغ/ل IBA (الجدول 1) للحصول على الكمية الكافية من المادة النباتية اللازمة لتنفيذ التجارب الخاصة بالبحث.

الجدول 1. الأوساط المغذية المستخدمة في التجارب المنفذة خلال مراحل النمو المختلفة.

مكونات الوسط المغذي	مرحلة الزراعة الأولية	مرحلة الإكثار والاستطالة
المحلول المعدني	1/2MS	1/2MS
السكروز	30 غ/ل	30 غ/ل
الآغار	7 غ/ل	7 غ/ل
ثيامين	1 مغ/ل	1 مغ/ل
ميواينوسيتول	100 مغ/ل	100 مغ/ل
BAP*	2 مغ/ل	5 مغ/ل
IBA*	0.2 مغ/ل	0.1 مغ/ل
فحم نشط	3 غ/ل	-

***BAP:هرمون بنزيل امينو بيورين، *IBA: هرمون اندول بيوتريك أسيد.**

- الحفظ بوساطة تقانات زراعة الأنسجة النباتية:

استخدم في حفظ العينات النباتية من السوسن قمم نامية أخذت من مرحلة الإكثار بطول 3 إلى 4 مم تقريباً، وتم إخضاعها لعدة معاملات بهدف تخفيف النمو، والحفاظ عليها سالمة لأطول فترة ممكنة، وزيادة الفترة الزمنية بين عمليات النقل من خلال إضافة حمض الأبسيسيك (ABA) بأربعة تراكيز مختلفة (0، 0.5، 1، 2 و3 مغ/ل) دون منظمات النمو ومع إضافة 3 % سكروز، وقسمت إلى قسمين وضع الأول في البراد على درجة حرارة 3 °م، أما الثاني فوضع في غرفة النمو على درجة حرارة 23 °م. أما بالنسبة للصفات المدروسة فقد تم تقدير نسبة البقاء، ومعدل الإكثار، ومتوسط استطالة النموات، وقياس الثبات الوراثي للأنسجة النباتية في العينات المعاملة بتراكيز عالية من حمض الأبسيسيك ومقارنتها بالشاهد غير المعامل. وحسبت نسبة البقاء (%) من المعادلة الآتية:

نسبة البقاء (%)= (عدد العينات النامية × 100) / (عدد العينات المزروعة الكلي).

- كما حسب معدل الإكثار من المعادلة الآتية:

معدل الإكثار = (مجموع عدد النموات الكلية المتكونة في كل العينات) / (عدد العينات النامية).

- كما حسب متوسط استطالة النموات من العلاقة الآتية:

متوسط استطالة النموات = (مجموع استطالة النموات المتكونة في كل العينات)/ (عدد العينات النامية).

- قياس الثبات الوراثي للأنسجة النباتية بعد إجراء عملية الحفظ باستخدام حمض ABA:

أولا: استخلاص الـ DNA:

- تم عزل الـ DNA من أوراق مأخوذة من نباتات بعمر 4 أسابيع بطريقة Cetyl Timethyl Ammonium Bromide (CTAB) المعدلة (Murray وThompson، 1980).

ثانيا: تقدير كمية الـDNA ونوعيته:

استخدم جهاز قياس الطيف الضوئي لتقدير كمية الـDNA في العينات، عند أطوال موجية 260 و280 نانومتر، إذ تسمح قراءة الامتصاص على طول الموجة 260 نانومتر بتقدير تركيز DNA في العينة، وتم تقدير كمية DNA من المعادلة الآتية (Maniatis وزملاؤه، 1982).

تركيز الـ DNA (ميكروغرام/ميكروليتر)=50 × (OD_{260}) × (عامل التمديد)/ 1000

حيث: OD_{260} تمثل الكثافة الضوئية لامتصاص DNA (ميكروغرام) عند الموجة 260 نانومتر.

ثالثاً: التفاعل التسلسلي البوليميرازي PCR :

استُخدم في الدراسة 22 بادئةً عشوائية تمَّ الحصول عليها من مخبر التقانات الحيوية التابع لقسم المحاصيل الحقلية بكلية الزراعة (جامعة دمشق)، ويوضح الجدول 2 التسلسل النيكليوتيدي، ودرجة حرارة الالتحام للبادئات المستخدمة.

الجدول 2. التسلسل النيكليوتيدي للبادئات المختبرة في تقانة ISSR (Internal Simple Sequence Repeats)

البادئة	التسلسل النيكليوتيدي 3' - 5'	درجة حرارة الالتحام (م°)
ISSR1	(AG)8 T	50
ISSR2	(GA)8 C	52
ISSR3	(CA)8 T	50
ISSR4	(AC)8 G	52
ISSR5	(AC)8 T	50
ISSR6	(GA)8 CG	56
ISSR7	(TC)8 GA	54
ISSR8	(TC)8 AG	54
ISSR9	(AC)8 GG	56
ISSR10	CCAG (GT)7	56
ISSR11	(GT)4 (GA)5	54
ISSR12	(AC)7 (AT)3	54
ISSR13	KVR (TG)6	50
ISSR14	C(CT)4 (GT)4 G	56
ISSR15	(TG)8AA	52
ISSR18	(AC)8T	50
ISSR34	(CT)8 G	50
ISSR40	(AC)8 TT	50
ISSR41	(AC)8 CG	50
ISSR23017/	(CT)8 G	52
ISSR23044/	(CA)6AC	50
ISSR23046/	(TG) 8 G	50

K: G/T, V: G/C/A, R: G/A

أجري تفاعل الـ PCR في حجم نهائي قدره 25µ (12.5ميكروليتر من PCR Master Mix+ 2 ميكرو DNA + 2 ميكرو بادئ + 8.5 ميكرو ماء خاص بالـ PCR)، وتم الحصول على PCR Master Mix من شركـــة KAPA .

رابعاً: الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير لنواتج PCR:

تم الترحيل على هلامة الآجاروز 2 % في المحلول المنظم 1X TBE والمكون من:

{(10X TBE buffer = 108g Tris Borate + 55g Boric Acid + 9.2g EDTA, pH 8.0)}، والمضاف إليه 5 µl من صبغة الايثيديوم بروماید (10 mg/ml)، إذ حملت عينات الحمض النووي DNA على هلامة الآجاروز بإضافة 5 µl من سائل التحميل الخاص

(1X Loading buffer Bromophenol blue) و المكون من:

(15% Ficoll 400 + 1.03 % bromophenol Blue + 0.03 % xylene cyanol FF + 0.4 % Orange G + 10 mM Tris-HCl + 50 mM EDTA)

كما تمت إضافة معلم جزيئي أو مؤشر لتحديد أوزان قطع الدنا ذو وزن جزيئي 1.kp.

3 - تصميم التجربة والتحليل الإحصائي:

وضعت التجربة وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (Completely Randomized Block Design) في دراسة تحليل جميع تجارب الحفظ بوساطة تقانات زراعة الأنسجة النباتية.

نفذت التجربة بمعدل 3 مكررات لكل معاملة، إذ يحتوي كل مكرر على 12 نباتاً، وكررت التجربة مرتين، ثم قورنت المتوسطات باستعمال تحليل التباين ANOVA وتقدير قيمة أقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 1 %، وذلك باستخدام برنامج XLSTAT.

أما بالنسبة لدراسة القرابة الوراثية، فقد تم تحديد حجم حزم الـ DNA الناتجة عن التضخيم باستخدام برنامج TotalLab، ثم تم تقدير عدد الحزم(الكلية، المختلفة، المتشابهة)، وتحويل المعطيات إلى النظام الثنائي (1 للحزمة الموجودة و0 للحزمة الغائبة)، وتقدير مصفوفة التوافق الوراثي PAV.

النتائج والمناقشة

1 - دراسة تأثير حمض الأبسيسيك (ABA) في حفظ نموات السوسن الأسود:

توضح النتائج (الجدول 3) عدم وجود فروق معنوية في نسبة البقاء، ومعدل الإكثار، ومتوسط استطالة النموات باختلاف درجات الحرارة المستخدمة بعد مرور ثلاثة أشهر، أما بالنسبة لتراكيز حمض الأبسيسيك المستخدمة فلم يلحظ وجود أية فروق معنوية في نسبة البقاء، أما بالنسبة لمعدل الإكثار فقد تفوق الشاهد (2.05 نمواً خضرياً) والمعاملتان (1 و2 مغ/ ل) إذ أعطتا (1.75 و1.55 نمواً خضرياً) على التوالي على باقي المعاملات الأخرى، كما تفوق الشاهد والمعاملة 0.5 مغ/ل (1.31، 0.97 سم) على التوالي بالنسبة لمتوسط أطوال النموات. وتتوافق هذه النتائج مع ما تم الحصول عليه من أن حمض الأبسيسيك يثبط نمو أطوال أفرع البطاطا وباقي الصفات المورفولوجية الأخرى، مثل الأوراق والبراعم والجذور، وأيضاً نسبة البقاء للأفرع (Guillermo وزملاؤه، 2014). يوضح الجدولان 3 و4 أن زيادة تركيز حمض الأبسيسيك المستخدم أدت إلى زيادة نسبة البقاء، إذ بلغت 90 و70 % في الشهر السادس والتاسع على التوالي، عند استخدام التركيز 3 مغ/ل وبفروق معنوية مقارنة بالشاهد الذي سجل 77.5 و16.67 % في الشهرين المذكورين على التوالي، وهذا يوافق ما تم الحصول عليه من أن الوسط المضاف له 3 مغ/ل من ABA أعطى أعلى نسبة بقاء في نبات الليليوم (Yun-Peng وزملاؤه، 2012).

كما توضح النتائج ارتفاع نسبة البقاء مع انخفاض درجة الحرارة، إذ سجلت أعلى قيمة لنسبة البقاء (94 و63.67 %) في الشهرين السادس والتاسع على التوالي، عندما تم الحفظ على درجة الحرارة 3 °م وبفروق معنوية مقارنة بدرجة الحرارة 23 °م (72.47 و32.33 %) في الشهرين السابقين على التوالي، كما بيّن بعض الباحثين أنه يمكن حفظ نبات الليليوم لمدة 15 شهراً في درجة حرارة منخفضة (- 2°م). في حين تبين نمو الأبصال وتشكل الاوراق اثناء فترة الحفظ في درجة الحرارة 24 °م الطويل (Yun-Peng وزملاؤه، 2012). كما بيّنت العديد من الدراسات أن تخفيض درجة الحرارة كان فعّالاً جداً في إطالة فترة نقل النباتات من خلال تقليل معدل النمو (Divakaran وزملاؤه، 2006؛ Engelmann، 2011؛ Cruz-Cruz وزملاؤه، 2013).

أما بالنسبة لتأثير التفاعل بين درجة الحرارة وتركيز الأبسيسيك، فقد تحققت أعلى قيمة لنسبة البقاء (100 %) لدى الحفظ في درجة حرارة 3 °م وبتركيز 3 مغ/ل من الابسيسيك في كل من الشهرين السادس و التاسع مقارنة بالشاهد وبدرجة الحرارة 23 °م.

أما فيما يتعلق بمعدل الإكثار ومتوسط أطوال النموات في الشهر السادس فيلاحظ أن حمض الأبسيسيك قد أبطئ نمو الأفرع، إذ توضح النتائج (الجدول 3) أن الشاهد أعطى أعلى قيمة لمعدل الإكثار ومتوسط أطوال النموات (2.05 نمواً خضرياً، 1.38سم) على التوالي، وبفروق معنوية مع استخدام حمض الأبسيسيك، كما أن زيادة تركيز حمض الأبسيسيك أدت إلى انخفاض في معدل الإكثار ليبلغ أدنى قيمة له (1.38) لدى استخدام التركيز 3 مغ/ل في الشهر السادس، وهذا يوافق ما تم الحصول عليه من قبل Guillermo وزملائه (2014) من أن استخدام

الـABA له تأثير مثبط لطول الأفرع وباقي مؤشرات النمو الأخرى. كما أدى حمض الأبسيسيك دوراً مهماً في تثبيط نمو أطوال الليليوم، إذ يعد هذا الحمض من العوامل الرئيسة التي تحفز بدء طور السكون.

الجدول 3. تأثير إضافة ABA في حفظ نموات السوسن الأسود بعد مرور 3 و6 أشهر.

الشهر الثالث									
درجة الحرارة (م°) / تركيز ABA (مغ/ل)	نسبة البقاء (%)			معدل الإكثار (نمو خضري)			متوسط طول النموات (سم)		
	3 م°	23 م°	المتوسط	3 م°	23 م°	المتوسط	3 م°	23 م°	المتوسط
شاهد	100^{a}	100^{a}	100^{a}	1.7^{bc}	2.4^{a}	2.05^{a}	0.91^{bc}	1.7^{a}	1.31^{a}
0.5	100^{a}	90^{b}	95^{a}	1.4^{bc}	1.4^{bc}	1.4^{b}	0.8^{cd}	1.15^{b}	0.97^{a}
1	100^{a}	90^{b}	95^{a}	1.8^{abc}	1.7^{bc}	1.75^{ab}	0.48^{de}	0.77^{cd}	0.62^{b}
2	100^{a}	100^{a}	100^{a}	1.9^{ab}	1.2^{c}	1.55^{ab}	0.43^{e}	0.42^{e}	0.43^{b}
3	100^{a}	100^{a}	100^{a}	1.5^{bc}	1.4^{bc}	1.45^{b}	0.58^{de}	0.35^{e}	0.46^{b}
المتوسط	100^{a}	96^{b}		1.66^{a}	1.62^{a}		0.64^{a}	0.88^{a}	
التفاعل $LSD_{0.01}$	7.62			0.66			0.33		
درجة الحرارة $LSD_{0.01}$	3.9			0.35			0.34		
تركيزABA $LSD_{0.01}$	6.29			0.51			0.34		

الشهر السادس									
درجة الحرارة (م°) / تركيز ABA (مغ/ل)	نسبة البقاء (%)			معدل الإكثار (نمو خضري)			متوسط طول النموات (سم)		
	3 م°	23 م°	المتوسط	3 م°	23 م°	المتوسط	3 م°	23 م°	المتوسط
شاهد	90^{ab}	65^{b}	77.5^{a}	1.6^{bc}	2.5^{a}	2.05^{a}	0.87^{b}	1.9^{a}	1.38^{a}
0.5	90^{ab}	70^{b}	80^{a}	1.83^{b}	1.54^{bc}	1.68^{ab}	0.85^{b}	0.82^{b}	0.83^{b}
1	100^{a}	70^{b}	85^{a}	1.5^{bc}	1.5^{bc}	1.5^{b}	0.34^{c}	0.4^{c}	0.37^{c}
2	90^{ab}	77.33^{ab}	83.67^{a}	1.6^{bc}	1.42^{bc}	1.5^{b}	0.5^{bc}	0.38^{c}	0.44^{c}
3	100^{a}	80^{ab}	90^{a}	1.6^{bc}	1.17^{c}	1.38^{b}	0.6^{bc}	0.39^{c}	0.5^{bc}
المتوسط	94^{a}	72.47^{b}		1.63^{a}	1.62^{a}		0.63^{a}	0.78^{a}	
التفاعل $LSD_{0.01}$	28.15			0.64			0.39		
التركيز $LSD_{0.01}$	22.8			0.5			0.39		
درجة الحرارة $LSD_{0.01}$	11.19			0.35			0.37		

- تشير الأحرف المتشابهة ضمن كل صفة إلى عدم وجود فروقات معنوية بين المعاملات عند مستوى ثقة 99 % (مستوى معنوية 1 %).

أما بالنسبة لتأثير درجة الحرارة فقد تفوقت الحرارة 3 ºم معنوياً على الحرارة 23 ºم ، وأعطت أعلى معدل إكثار (1.88 نمواً خضرياً) (الجدول 4). وتبين النتائج الموضحة في الشهر التاسع أن زيادة تركيز ABA أدت إلى انخفاض في متوسط أطوال الأفرع، إذ تحقق أفضل متوسط (1.14سم) لدى استخدام أقل تركيز منه (0.5 مغ/ل) (الجدول 4)، وهذا يتفق مع ما تم التوصل إليه سابقاً من قبل Da Silva وScherwinski-Pereira (2011) من أن هنالك تناسباً طردياً بين انخفاض أطوال الأفرع وزيادة تركيز الـABA لدى حفظ نبات الفلفل*Piper aduncum*.

الجدول 4. دراسة تأثير إضافة حمض الأبسيسيك في حفظ نموات السوسن بعد مرور 9 و 12 شهراً.

الشهر التاسع									
درجة الحرارة (ºم) / تركيز ABA (مغ/ل)	نسبة البقاء (%)			معدل الإكثار (نمو خضري)			متوسط طول النموات (سم)		
	3 ºم	23 ºم	المتوسط	3 ºم	23 ºم	المتوسط	3 ºم	23 ºم	المتوسط
شاهد	33.33^{c}	0	16.67^{c}	1.4^{cd}	0	0.7^{c}	0.89^{abc}	0	0.44^{b}
0.5	43.33^{bc}	33.33^{c}	38.33^{bc}	1.75^{bc}	0.67^{f}	1.21^{bc}	1^{ab}	1.27^{a}	1.14^{a}
1	56.67^{b}	38.33^{bc}	47.5^{ab}	1.8^{b}	1^{ef}	1.4^{b}	0.38^{de}	0.78^{bcd}	0.58^{b}
2	85^{a}	50^{bc}	67.5^{a}	1.82^{b}	1.3^{de}	1.56^{ab}	0.46^{cd}	0.58^{bcd}	0.52^{b}
3	100^{a}	40^{bc}	70^{a}	2.63^{a}	1.73^{bc}	2.18^{b}	0.46^{cd}	0.63^{bcd}	0.55^{b}
المتوسط	63.67^{a}	32.33^{b}		1.88^{a}	0.94^{b}		0.63^{a}	0.65^{a}	
التفاعل $LSD_{0.01}$	20.86			0.36			0.44		
تركيز ABA $LSD_{0.01}$	24.84			0.68			0.41		
درجة الحرارة $LSD_{0.01}$	16.08			0.41			0.31		

- تشير الأحرف المتشابهة ضمن كل صفة إلى عدم وجود فروقات معنوية بين المعاملات عند مستوى ثقة 99 % (مستوى معنوية 1 %).

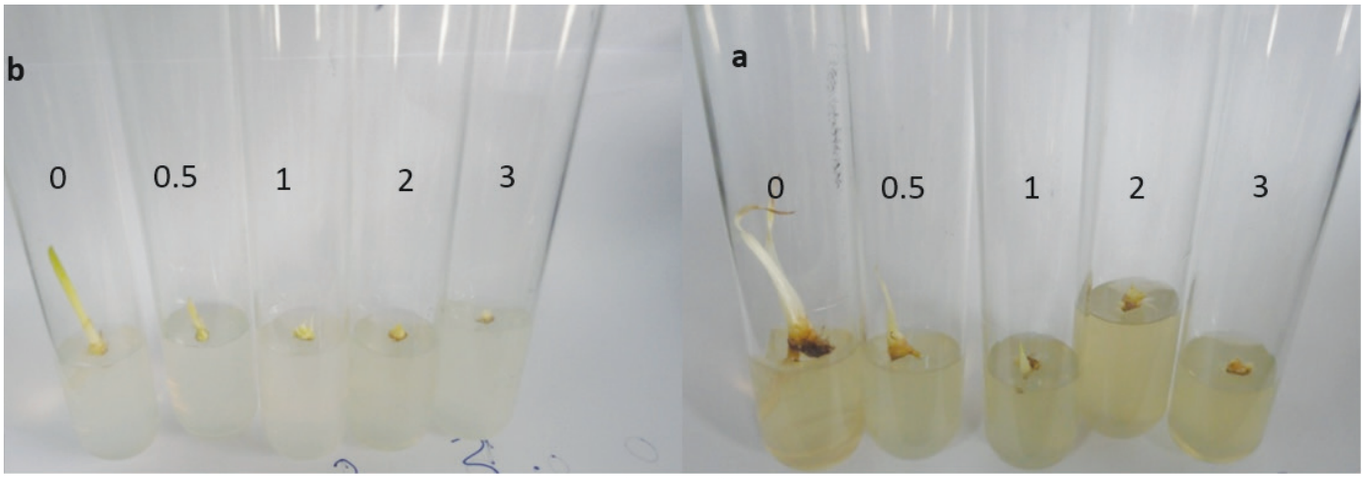
أما فيما يتعلق بمعدل الإكثار فقد تم الحصول على أعلى معدل للإكثار لدى استخدام تركيز 3 مغ/ل ABA (2.18 نمواً خضرياً) وبفروق معنوية مع الشاهد (0.7 نمواً خضرياً). وتوضح النتائج (الجدول 5) موت جميع النباتات المزروعة بدرجة حرارة 23 ºم بعد مرور 12 شهرا، أما النباتات المزروعة بدرجة حرارة 3 ºم فبقيت حية. وبينت النتائج أيضا أن التركيز 2 مغ/ل أعطى أعلى نسبة بقاء (84 %) وبفروق معنوية مقارنةً بالشاهد وباقي التراكيز الأخرى المستخدمة، في حين أعطى التركيز0.5 مغ/ل أعلى معدل إكثار (1.85) وبفروق معنوية مقارنةً بالشاهد (الشكل 2).

اما بالنسبة لاستطالة الأفرع فقد أعطى الشاهد أعلى قيمة لها (1.12سم) عند درجة حرارة 3 ºم، كما أوضحت النتائج أن استخدام التراكيز العالية من ABA (3 مغ/ل) أدى إلى انخفاض نسبة البقاء لتصل الى 60 %، وهذا يوافق ما تم التوصل إليه من قبل Guillermo وزملائه (2014) من أن التراكيز العالية من ABA كانت ضارةً جداً، وأعطت نسب بقاء منخفضةً جداً في حفظ نباتات البطاطا الحلوة.

الجدول 5. دراسة تأثير إضافة حمض الأبسيسيك في حفظ نموات السوسن الأسود بعد مرور 12 شهراً.

الشهر الثاني عشر			
درجة الحرارة (مº) / ABA مغ/ل	نسبة البقاء (%)	معدل الإكثار (نمو خضري)	متوسط طول النموات (سم)
	3 مº	3 مº	3 مº
شاهد	21^{c}	1.25^{b}	1.12^{a}
0.5	40^{bc}	1.85^{a}	0.76^{ab}
1	57.33^{b}	1.17^{b}	0.53^{b}
2	84^{a}	1.33^{ab}	0.51^{b}
3	60^{b}	1.33^{ab}	0.55^{ab}
المتوسط	52.46	1.39	0.69
LSD التفاعل 0.01	21.06	0.55	0.58

- تشير الأحرف المتشابهة ضمن كل صفة إلى عدم وجود فروقات معنوية بين المعاملات عند مستوى ثقة 99 % (مستوى معنوية 1 %).



الشكل 2. تأثير إضافة حمض الأبسيسيك (ABA).
a: في درجة حرارة 23 مº، b: في درجة حرارة 3 مº

كما وجد أنه لإطالة فترة الحفظ في نبات الليليوم يجب استخدام وسط ذو تركيز منخفض من العناصر المعدنية، ويحوي تراكيز عالية من الـ ABA (1 إلى 3مغ/ل) (Yun-peng وزملاؤه، 2012).

تبين النتائج انخفاضاً في قيمة نسبة البقاء مع زيادة الفترة الزمنية لتبلغ أدنى قيمة لها في الشهر الثاني عشر من الحفظ، وبزيادة درجة الحرارة من 3 مº إلى 23 مº ، كما يلاحظ زيادة في نسبة البقاء مع زيادة تركيز ABA لتصل إلى أعلى قيمة لها عند تركيز 2 مغ/ل ، ثم تتابع انخفاضها مع زيادة التركيز إلى 3 مغ/ل . أما بالنسبة لمعدل الإكثار فتوضح النتائج أيضا انخفاض معدل الإكثار مع زيادة الفترة الزمنية وزيادة درجة الحرارة، أما بالنسبة لتراكيز ABA فيلاحظ انخفاض في البداية من التركيز 0 حتى 0.5، ثم تبدأ بالزيادة بشكل تدريجي لتصل إلى أعلى قيمة لها عند التركيز 3 مغ/ل. في حين تم الحصول على أعلى قيمة لمتوسط أطوال الأفرع في الشهر التاسع، ولم تتأثر بتغير أو انخفاض درجة الحرارة، في حين سجلت أعلى قيمة لمتوسط الأفرع في معاملة الشاهد دون إضافة أي تركيز من ABA.

يعد ABA مثبطاً للنمو (Barrueto وCarvalho، 2008؛ Da Silva وScherwinski-Pereira، 2011؛ Arrigoni-Blank وزملاؤه، 2014) ذاتي المنشأ، إذ أن الدور المهم للأبسيسيك يتوضح في إعاقة عمل الهرمونات النباتية الداخلية (الأوكسينات والسيتوكينينات

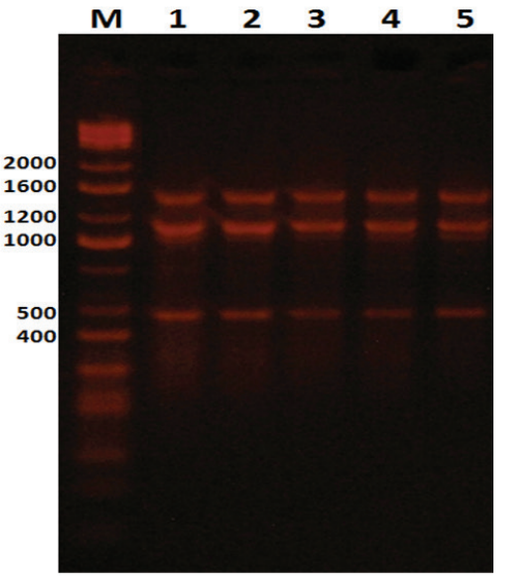
والجبريلينات) التي تحسن نمو وانقسام واستطالة الخلايا في النبات (Swamy و1999، Smith)، كما أن لحمض الأبسيسيك علاقة بعمليات فيزيولوجية عدةً في النبات، مثل: إغلاق المسامات ، ونشوء الأجنة، وتطوير البذور، وتخزين البروتينات واللييبيداتّ، وبشكل خاص فإن إغلاق المسامات يسبب طاقةً منخفضة للتمثيل الضوئي، لأنه يؤثر في نسبة انتشار غاز CO_2 إلى داخل المسامات، وفقدان الماء، وأثناء زراعة النباتات بوجود ABA في الوسط تبقى النباتات قادرةً على القيام بالتمثيل الضوئي الذي يسبب تخزين البروتين واللييبيدات، مما يزيد من نسبة البقاء وإعادة النمو (Pence وزملاؤه، 2005).

2 - التشابه الشكلي:

تضمنت الدراسة اختبار المعاملات المدروسة، وبينت النتائج (الجدول 6) أن 13 بادئة من البادئات المستخدمة أعطت منتجات تضخيم في التفاعل التسلسلي البوليميرازي (PCR)، وأثبتت هذه البادئات فعاليتها في إعطاء تشابه شكلي بين المعاملات المدروسة، ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه (59 حزمة) بمتوسط بلغ (4.21 حزمةً)، وكان عدد الحزم المتشابهة شكلياً (57 حزمة) بمتوسط بلغ (4.07 حزمة)، وبلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية (3.4 %)، كما تأرجح عدد الحزم لكل بادئة بين حزمةً واحدةً كأقل عدد مع البادئة (ISSR5 وISSR6) وتسعة حزم كأعلى عدد مع البادئة (ISSR9)، وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية الأكبر مع البادئة (ISSR230/44) (33.3%) تلاها مع البادئة (ISSR4) (16.7 %)، في حين بلغت 0 % مع باقي البادئات المدروسة، ويوضح الشكل 3 النماذج التي تمَّ الحصول عليها من حزم الـDNA .

الجدول 6. رموز البادئات المستخدمة، وعدد الحزم الكلية والمتباينة، والنسبة المئوية للتعددية الشكلية % في المعاملات المدروسة.

اسم البادئ	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتشابهة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية (%)
ISSR1	-	-	-
ISSR2	7	7	0
ISSR3	-	-	-
ISSR4	6	5	16.7
ISSR5	1	1	0
ISSR6	1	1	0
ISSR7	-	-	-
ISSR8	-	-	-
ISSR9	9	9	0
ISSR10	6	6	0
ISSR11	4	4	0
ISSR12	4	4	0
ISSR13	-	-	-
ISSR14	-	-	-
ISSR15	4	4	0
ISSR18	5	5	0
ISSR34	-	-	-
ISSR40	5	5	0
ISSR41	-	-	-
ISSR230/ 17	-	-	-
ISSR230/ 44	3	2	33.3
ISSR230/ 46	4	4	0
المجموع	59	57	3.4
المتوسط	4.21	4.07	-



الشكل 3. التشابه الشكلي الناتج عن استخدام البادئة (ISSR18).

DNA Ladder:M مؤشر لتحديد أوزان قطع الدنا، **1:** شاهد السوسن الأسود، **2: 0.5** مغ / ل **ABA** ، **3: 1**مغ / ل **ABA**، **4: 2** مغ / ل **ABA** ، **5: 3** مغ / ل **ABA**.

الجدول 7. مصفوفة النسب المئوية للتوافق (PAV) بين المعاملات المدروسة والناتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقنية ISSR.

1: شاهد السوسن الأسود، **2: 0.5** مغ / ل **ABA** ، **3: 1**مغ / ل **ABA**، **4: 2** مغ / ل **ABA** ، **5: 3** مغ / ل **ABA**.

المعاملات	1	2	3	4	5
1	1.00				
2	0.96	1.00			
3	0.96	0.98	1.00		
4	0.95	0.96	0.96	1.00	
5	0.95	0.96	0.96	0.98	1.00

يبين الجدول 7 النسب المئوية للتوافق (PAV-) بين المعاملات المدروسة، إذ يتضح من الجدول أن أعلى قيمة لـPAV في السوسن الأسود هي 0.98 بين (معاملة 2، معاملة 3) ومعاملة (4 و5)، وهذا يدل على درجة كبيرة من القرابة الوراثية للنباتات المعاملة بحمض الأبسيسيك، تلاها المعاملات (1، 2) و (1، 3) وهذا يدل على درجة كبيرة من القرابة الوراثية بين الشاهد (المعاملة 1) والنباتات المعاملة بحمض الابسيسيك (معاملة 1 و3) بقيمة (0.96)، في حين كانت اقل قيمة لها (0.95) في المعاملات (1، 4) و(1، 5) مما يدل على وجود تشابه وراثي كبير بين المعاملات، وبالتالي لم تؤثر المعاملة بحمض الأبسيسيك في الثبات الوراثي للمعاملات المدروسة، وهذا يتوافق مع Huang وزملائه (2014) الذين حصلوا على درجة كبيرة من الثبات الوراثي للنباتات المعاملة بحمض الأبسيسيك مع النباتات الأم (الشاهد). كما وجد Hao وDeng (2003) بعض الاختلافات في المجموعة الميثيلية لصنف التفاح *Gala*، وذلك بعد سنة من الحفظ البارد، بينما لم يجدوا أي تغير في الـDNA .

الإستنتاجات:

- نجاح تطبيق تقانة الحفظ البارد، وعلى درجة حرارة 3 °م بوساطة تقانات زراعة الأنسجة النباتية، وباستخدام 2 مغ/ل ABA لنبات السوسن الأسود.
- تمت دراسة درجة الثبات الوراثي في النباتات الناتجة بعد الحفظ بحمض الأبسيسيك مع النباتات الأم (الشاهد) باستخدام تقانة ISSR، إذ بلغت نسبة التشابه الوراثي (0.95 إلى 0.98)، وبالتالي لم تؤثر طريقة الحفظ وبتراكيز مختلفة من حمض الأبسيسيك في الثبات الوراثي.

المقترحات:

- تطبيق التقانة التي تم التوصل إليها على أنواع أخرى من السوسن السوري البري المهدد بالإنقراض للحفاظ عليه كمصادر وراثية.
- ضرورة إجراء تجارب الحفظ بوساطة تقانات زراعة الأنسجة النباتية بوجود عناصر أسموزية، أو مثبطات نمو أخرى، مثل البولي اثيلين غليكول والبانيتول وغيرها.....

المراجع

- Arrigoni-Blank, M.F., F. Ferreira, A. F. Blank, M. C. Dos Santos, T.S. Alves, and A. D. D. De Santana. 2014. *In vitro* conservation of sweet potato genotypes. The Scientific World Journal, article ID 208506, 7 pages.
- Auge, R., G. Beauchesne, J. Boccon-Gibod, L. Decourtye, B. Digat, C. I. Galandrin, R. Minier, C. I. Morand, and H. Vidalie. 1984. La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Technique et documentation.
- Bornet, B., F. Goraguer, G. Joyand, and M. Branchard. 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Genome, 45 (3): 481- 484.
- Barrueto Cid, L.P and L.C.B. Carvalho. 2008. Importance of abscisic acid (ABA) in the *in vitro* conservation of Cassava *(Manihot esculenta* Crantz). Chilena Journal of Agricultural Research, 68: 304- 308.
- Cruz-Cruz, C.A., M. T. Gonzalez-Arnao and F. Engelmann.2013. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. Resources, 2: 73- 95.
- Da Silva, T.L. and J. E. Scherwinski-Pereira. 2011. In vitro conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 46 (4): 384- 389.
- Divakaran, M., K.N. Babu, and K.V. Peter. 2006. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro*. Scientia Horticulturae, 110: 75- 180.
- Engelmann, F.1997. *In vitro* condervatiion methods in Biotechnology and plant Genetic resources: conservation and Use. B. V. Ford - Lloyd, J. H. Newburry and J. A. Callow (eds .), CABI, Wellingfor : 119- 162.
-Engelmann, F. 2011. Use of biotechnology for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro* Cellular and Development Biology Plant, 47: 5- 16.
-Fu-Rong, G., G. Jian- Ying, and W. Fang- Hao. 2007. Application of ISSR Molecular marker in invasive plant species study. State key laboratory for biology of plant diseases and insect pests institute of plant protection, Yunnan Agricultural university, Kunming Chin. Journal of Applied Ecology, 18(4): 919- 927.
- Grout, W.V. 1991. Conservation *in vitro*. Acta Horticulture, 289: 171- 178.
- Gui, F. R., F. H. Wanand, and J. Y. Guo. 2008. Population genetics of Ageratina denophora using intersimple sequence repeat (ISSR) molecular markers in China. Plant Biosystems, 142 (2):255- 263.
- Guillermo, E., I. Consuelo Rojas, and Z. Betty Bazán. 2014. In vitro Conservation of Sweet Potato under Slow-Growth Conditions with Abscisic Acid. Journal of Biology, 2 (2): 25- 31.
- Hao, Y.J. and X. Deng. 2003. Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 72: 253- 260.
- Hassan, N.A., A.H. Gomaa, M.A. Shahin, and A.A. El Homosany. 2013. *In vitro* storage and cryopreservation of some grape varieties. Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants, 5:183- 193.
- Huang, H. P., J. Wang, L.Q. Huang, S.L. Gao, P. Huang, and D.L. Wang. 2014. *Germplasm preservation in vitro of Polygonum multiflorum* Thunb. Pharmacognosy Magazine, 10 (38):179- 84.
- Jarret, R.L. and N. Gawel. 1991. Abscisic acid induced growth inhibition of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 24: 13- 18.
- Kim, K., E. Davelaar, and G.J. De Klerk. 1994. Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated in vitro. Physiology Plant, 90: 59- 64.
- Maniatis T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor/ NY . .

- Moges, A. D., N. S. Karam and R.A. Shibli. 2003. Slow Growth in vitro preservation of Africa violet (*Saintpulia ionantha* Wendl.) shoot tips. Advanced Hort Science, 17(4):223- 230.
- Mouterde, P. 1983. Nouvelle flore du Liban et de la Syrie. 3eme tome + Atlas, Dar ElMashreq, Beyrouth, Liban.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growthand bioassays with tobacco tissue cultures. physiology Plant, 15: 473- 497.
- Murray, H. G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleilc Acids Research, 8: 4321- 4325.
- Pence, V.C., S.S. Dunford, and S. Redella. 2005. Differential effect of abscisic acid on desiccation tolerance and carbohydrates in tree species of liverworts. Journal of Plant Physiology,162: 1331- 7.
- Popova, E.V., E.J. Lee, C.H. Wu, E.J. Hahn, and K.Y. Paek . 2009. A simple method for cryopreservation of Ginkgo biloba callus. Plant Cell Tissue Organ Culture, 97(3): 337- 343.
-Post, G. 1934. Flora of Syria, Palastine and Sinai. Vol 1: 2, Second Edition. American Press, Beirut, Lebanon.
- Rai, M.K., R.K. Kalia, R. Singh, M.P. Gangola, and A.K. Dhawan. 2011. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection–an overview of the recent progress. Environmental and Experimental Botany, 71: 89- 98.
- Reed, B. M., C. L.Paynter, J. Denoma, and Y. Chang. 1998. Techniques for medium-and long-term storage of Pear (*Pyrus* L.) genetic resources. Plant Genetic Resources Newsletter, 115: 1- 5.
- Shibli, R. A. and K. H. Al- juboory. 2000. Cryopreservation of Nabali olive (*olea europea* L.) somatic embryos by encapsulation- dehydration and encapsulation –vitrification. Cryoletters , 21: 357- 366.
- Swamy, P.M. and B.N. Smith. 1999. Role of abscisic acid in plant stress tolerance. Current Science, 76: 1220- 1227.
- Taylor, M., S. Pone, and A. Palupe. 1996. Slow growth strategies. In: M.N. Normah, M.K. Narimah and M.M. Clyde (eds.), *In Vitro* Conservation of Plant Genetic Resources:119- 134. Percetakan Watan, Kuala Lumpur.

Withers, L. A. 1991. *In vitro* conservation. Biol. J. linn.Soc., 43: 31- 42.

- Yun-peng, D.,L.Wen-yuan,Z. Ming-fang, H. Heng-bin, and J. Gui-xia. 2012. The establishment of a slowgrowth conservation system in vitro for two wild lily species. African J. Biotechnol, 11(8):1981- 1990.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176- 183.

N° Ref: 856