---مجلة علوم الرافدين، المجلد 27، العدد 4 / عدد خاص بالمؤتمر العلمي الثالث لعلوم الحياة، ص 95-102، 2018----

تمايز نباتات الترمس الابيض *Lupinus albus* من كالس السيقان تحت الفلقية لبادراتها

***امجد عبد الهادي محمد**
قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

رنا طارق يحيى
قسم الفيزياء الحياتية/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

E-mail: biology19802007@yahoo.com*

(أُستلم 10 / 2018/10 ؛ قُبل 1/ 2018/11)

الملخص

نجحت الدراسة الحالية في الحصول على نباتات الترمس الأبيض *Lupinus albus* الكاملة من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية لبادراتها المعقمة، وأوضحت النتائج تفوق وسط Murashige and Skoog (MS) الصلب والمدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA في استحداثه للكالس بنسبة 90% بعد 20 يوماً من الزراعة على غيره من الاوساط المنتخبة. وأعطى معدل قيم الوزن الطري للكالس 3.3 غم بعد 40 يوماً من النمو دلالة على حيوية الكالس ونشاطه. وادت ادامة الكالس على ذات الوسط الى التكوين التلقائي للأفرع الخضرية وبعدد 22. هذه الأفرع جُذرت عند غرسها في وسط MSO بكامل قوته التركيبية وبنسبة 50% بعد 26 يوماً، منتجة نباتات الترمس الابيض الكاملة في الوسط الزرعي.

الكلمات الدالة: نباتات الترمس الابيض، تمايز الكالس، الوزن الطري.

Regeneration of White Lupin, *Lupinus albus*, Plants form Hypocotyl Stems Callus of its Seedlings

Amjad A. Mohammed
Department of Biology / College of Science/ University of Mosul
Rana T. Yahya
Department of Biophysics/ College of Science/ University of Mosul

ABSTRACT

This study succeeded in regenerating the white lupin, *Lupinus albus*, plants from differentiated the hypocotyl stems callus of its sterilized seedlings. The results indicated to superior the solid Murashige and Skoog (MS) medium provided with 1.0 mg L^{-1} NAA in callus initiation with 90% after 20 days of culture from the other of selected media. The rate of the value of the callus fresh weight was 3.3 gm after 40 days of growth, which gives indication on the viability and activity of callus. The continued of callus subculture on the same its initiated medium led to spontaneous production of 22 shoots. These regenerated shoots rooted when cultivated in MSO with its full strength at ratio 50% after 26 days, producing the whole lupin plants in the culture media.

Keywords : White lupin plants, callus differentiation, fresh weight.

المقدمة

تعد زراعة الانسجة النباتية من التقانات الحيوية ذات الاهمية البالغة، لما قدمته ولا زالت من فوائد مميزة على المستويين العلمي والتطبيقي في المجالات الزراعية والصناعية والصيدلانية والبيئية. وتوفر ايضاً نظاماً مميزاً لدراسة سلوك الخلايا (انسجة

كاملة او خلايا مفردة) وفهم علاقتها بمنظمات النمو من حيث انقساماتها وتخصصها الى نباتات كاملة (Neumann *et al*., 2009). و تعتمد هذه التقانة بشكل اساسي على عوامل عدة اهمها تركيب الوسط الغذائي فضلا عن نوع وتركيز منظمات النمو المضافة اليه، وعليها يعتمد نجاح استمرار نمو الجزء النباتي المزروع على الوسط الغذائي، وافضل دليل هو فشل محاولات العالم Haberlandt في انقسام الخلايا واستحداث الكالس منها (Haberlandt, 1902). فضلا عن التوازن بين منظمات النمو الذي يملك دوراً بارزاً في استحداث الكالس من الاجزاء النباتية المختلفة وتمايز النباتات الكاملة منها (Mohammed and Al-Mallah, 2013).

تنتمي نباتات الترمس *Lupinus albus* الى العائلة البقولية Fabaceae، وأصل نشأتها تعود الى جنوب شرق اوربا وغرب اسيا ومن ثم انتشرت زراعتها في اماكن مختلفة من العالم، ويعد من المحاصيل الشتوية ويوجد في جميع الاراضي خاصة الرملية (برهام، 2000). وتوجد عدة اصناف تعتمد على لون أزهاره وهي الترمس الأبيض، الأصفر والأزرق (Von Baer *et al*., 2009).

وتناولت الدراسة صنف الترمس الابيض وهو نبات حولي، ويتميز بارتفاعه الذي يصل 100–120سم وله جذور قوية تمتد عميقاً في التربة، وأوراقه متبادلة وكل نبات ينتج عدد من النورات، وازهاره بيضاء اللون وهي الصفة المميزة للنبات (Jansen,2006). ويتفاوت طعم بذوره ما بين الحلو والمر اعتماداً على محتوياتها من المركبات القلويدية المرة والسامة التي تعد من السلبيات الخطيرة للترمس على صحة الانسان والماشية عند تناولها، وتشكل مركبات quinolizidine وانواعها القلويدات المتواجدة في بذور النبات واجزائه الخضرية، وتتراوح نسبتها1–4%. ويتميز النوع الحلو باحتوائها على اقل من 1%، اما النوع المر فيكون اكثر من ذلك (Bhardwaj and Hamama, 2012 ; Kurlovich *et al*., 2005). وللترمس فوائد غذائية للأنسان وكعلف للماشية لاحتوائه على نسبة عالية من البروتينات والدهون، كما يعد من المحاصيل الزيتية. وكذلك يملك فوائد صحية حيث ان البقوليات ومن ضمنها الترمس تحوي تراكيز عالية (اكثر من غرامين/كيلوغرام من الوزن الجاف) من المركبات الايزوفلافونيدية التي لها تأثير مضاد للسرطان (Sirtori *et al*., 2004). وفي المجال الزراعي استخدم لمدة طويلة في الولايات المتحدة كسماد اخضر لامتلاكه قابلية مميزة في تثبيت النايتروجين وايضاً يعد مصدراً غنياً للفسفور وبذلك تعمل على تحسين نسجة التربة (Joseph *et al*., 2007 ; Agniszka *et al*., 2006). وفي مجال الزراعة النسيجية للنبات، فقد نجح الباحثون في عزل البروتوبلاست من اجزاء البادرات المختلفة باستخدام الطريقة الانزيمية وتميز البروتوبلاست المعزول بكثافة وحيوية عالية (Sinha *et al*., 2003). وفي دراسة اخرى تم استحداث الكالس وتكوين المزارع الخلوية للترمس من الاجزاء النباتية تحت الفلقية على وسط LS (Linsmaier and Skoog) مع تحوير في بعض مكوناته العضوية ومضافا اليه 2,4-D و Kin (Sroga, 1983). وكذلك استحدثت الاجنة الجسمية للترمس على وسط B5 ومدعما بإضافة منظمات النمو 2,4-D و Kin وبعد الحصول على المراحل المتطورة للأجنة المحفزة بإضافة ABA الى الوسط الغذائي مع زيادة تراكيز النترات، نقلت الى وسط MS بوجود GA3 او الحامض الاميني الكلوتامين من اجل إنتاج النباتات الكاملة منها (Nadolska-Orczyk, 1992).

ولندرة الدراسات على هذا النوع النباتي في مختبراتنا تسعى الدراسة الحالية الى ايجاد بروتوكول كفوء لاستحداث الكالس من بادرات نباتات الترمس *Lupinus albus* المعقمة وقياس نموه بدلالة الوزن الطري، وإيجاد الظروف المثلى لتمايز الكالس الى الافرع الخضرية وتجذيرها لإنتاج نباتات كاملة باستخدام منظمات النمو النباتية.

المواد و طرائق العمل

أجريت كافة التجارب في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لقسم علوم الحياة/كلية العلوم، وأنجزت عمليات تعقيم البذور واستحداث الكالس وتمايزه داخل كابينة النقل ذات الجو المعقم (Laminar air flow cabinet) بعد رشها بالكحول 70%

ومسحها بقطعة قطن معقمة وتشغيل الجهاز لنصف ساعة قبل البدء بالعمل، اما الاوساط الغذائية والماء المقطر والادوات فعقمت بجهاز المعقام (Autoclave, Gallenkamp, U.K) في ظروف 121 درجة سيليزية وضغط 1.02 كغم /سم^2 لمدة 20 دقيقة.

إنتاج بادرات الترمس المعقمة

جهزت بذور نباتات الترمس الابيض *Lupinus albus* (النوع الحلو) من الاسواق المحلية / مدينة أربيل. وحددت نسبة أنباتها وبلغت 100%، ثم غسلت بالماء الجاري للتخلص من الأتربة والأوساخ، وعقمت سطحياً بغمرها في محلول الكحول الاثيلي 96 %/ دقيقتين ثم في محلول هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl (القاصر التجاري) والمخفف مع الماء المقطر المعقم، قاصر : ماء مقطر، 2:1، حجم : حجم لمدة 20 دقيقة ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات/ دقيقة لأزاله المواد المعقمة (Sinha *et al*., 2003). وبعد تجفيفها باستخدام ورق الترشيح المعقم نقلت البذور الى قناني تحوي وسط MS (Murashige and Skoog, 1962)، (الملحق) الصلب لوحده وبواقع بذرتين/ قنينة، وحفظت القناني في حاضنة النمو وبظروف الظلام وبدرجة حرارة 25±2 سيليزية. وبعد البدء بظهور الجذير والرويشة (التي استغرقت 7 ايام) نقلت القناني الى ظروف التعاقب الضوئي 16 ساعة ضوء/8 ساعات ظلام وبشدة 1500 لوكس باستخدام انابيب فلورسنت (Toshiba lighting and technology corporation, Tokyo, Japan).

تكوين مزارع الكالس

اخذت 1.0 سم تقريبا من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات الترمس وبعمر 20 يوما ووضعت بمعدل قطعتين/قنينة على سطح 30 مل من وسط MS الصلب لوحده (المقارنة) ثم مجهزاً بمنظمات النمو المنتخبة في هذه الدراسة ادناه:

MS+1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA

MS+2.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA

MS+1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA

MS+2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA

MS + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA

MS + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA + 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA

وبعد استحداث الكالس واختفاء معالم القطعة النباتية، التقطت كتل الكالس المتكونة ونقلت الى ذات الوسط واعيدت العملية كل 20 يوم لتجنب نفاذ مكونات الوسط. وحفظت العينات كافة في ظروف تنمية البادرات.

تكوين الافرع الخضرية من كالس السيقان

وضعت قطعة من كالس السيقان بوزن 1.0 غم تقريبا وبعمر 20 يوما على سطح وسط MS الصلب والمدعم بإضافة (0.5،1.0،2.0) ملغم لتر$^{-1}$ BA كلا على حدى.

تجذير الافرع الخضرية

استؤصلت الافرع الخضرية المتمايزة وبطول 1.5– 2.0 سم حاوية على 2–3 اوراق بواسطة مشرط معقم. وغرست قائمة في وسط MSO بكامل او نصف قوته التركيبية كلا على حدى (العنزي، 2013) وحفظت العينات كما ذكر انفاً.

الوزن الطري

حدد الوزن الطري للكالس النامي بأخذ الفرق بين وزن القناني وهي حاوية على الوسط الغذائي (وسط استحداث الكالس نفسه) فقط ووزنها بعد نقل الكالس عليها خلال مراحل النمو 20،40 يوماً.

النتائج و المناقشة

انتاج البادرات المعقمة

اظهرت نتائج طريقة التعقيم السطحي لبذور نباتات الترمس المستخدمة كفاءتها، بدلالة الحصول على بادرات سليمة مكتملة الجذير والرويشة وطبيعية النمو بعد 7 ايام من الزراعة وتميزت باستطالة سيقانها (الشكل،1-A). ان ملائمة طريقة التعقيم السطحي لبذور الترمس *Lupinus albus* المستخدمة في هذه الدراسة قد اظهرت ملامحها من خلال الحصول على بادرات سليمة وذات حيوية جيدة. ويعتمد استخدام المواد المعقمة المختلفة على وقت تعريض البذور لها فضلا عن تراكيزها والتي تعد من الاساسيات الحرجة لاستخدام تلك البذور لاحقا لأنتاج بادرات معقمة وسليمة وغير متضررة من عمليات التعقيم (Sen *et al.*, 2013).

تكوين مزارع كالس السيقان تحت الفلقية:

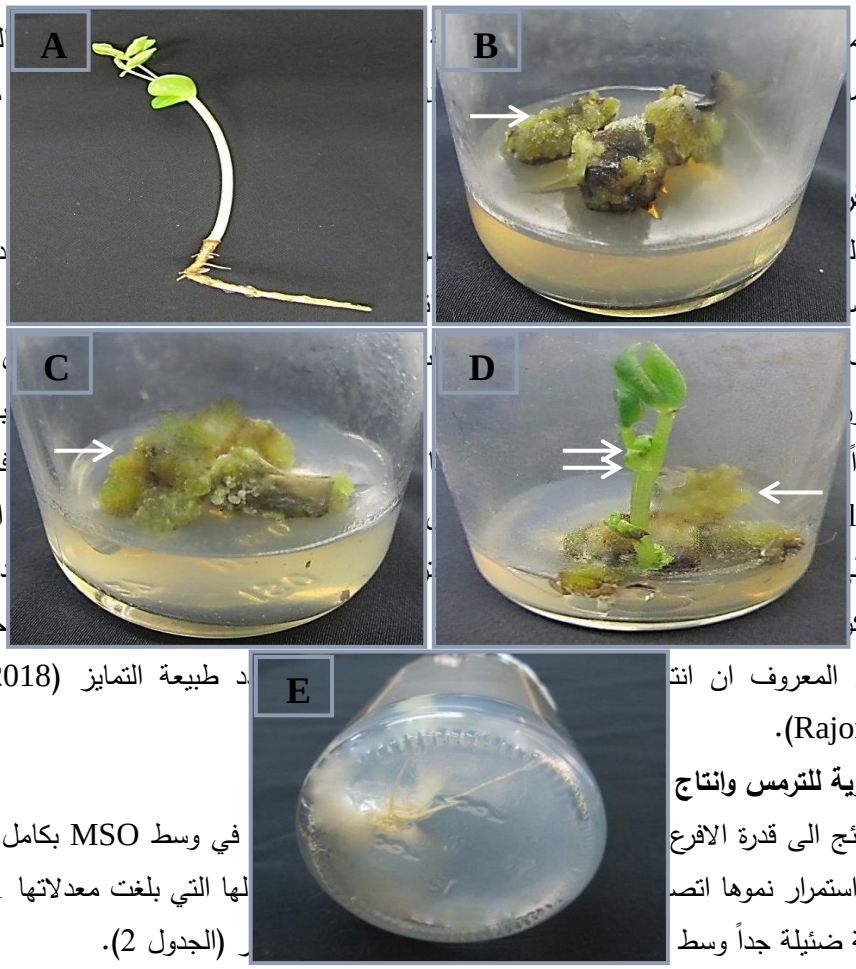
ابدت قطع السيقان تحت الفلقية تبايناً في استحداثها الكالس استنادا الى التباين في نوع وتركيز منظمات النمو المستخدمة (الجدول 1).

الجدول 1: نسبة استحداث كالس السيقان تحت الفلقية لبادرات نباتات الترمس *Lupinus albus* على وسط MS الصلب مدعماً بإضافات من منظمات النمو NAA و BA

اوساط الاستحداث (ملغم لتر$^{-1}$)	استحداث الكالس (%)	مدة الاستحداث (يوم)
MSO (مقارنة)	0	0
NAA 1.0 + MS	90	20
NAA 2.0 + MS	30	33
BA 1.0 + NAA 1.0 + MS	50	28
BA 2.0 + NAA 1.0 + MS	60	30

عدد القطع المزروعة 20 لكل معاملة

وتظهر النتائج الدور المميز لوسط MS المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA لاستحداث الكالس بنسبة بلغت 90% بعد 20 يوما من الزراعة مروراً بمراحل الاستحداث والانقسام (الشكل،1-C،B) ومتفوقا على باقي الاوساط الغذائية المستخدمة ومكونة كتلاً عديدة من الكالس اتسمت ببنيتها الهشة ولونها الاخضر ونشاط انقساماتها مكونة مزارع منه بعد اعادة زراعتها. يليه الوسط MS مدعماً بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA و2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA، اذ شجع استحداث الكالس بعد 30 يوم. في حين لم تنجح بعض الاوساط في استحداث الكالس بشكل جيد و فشلت اخرى في استحداثه. ان التباين الواضح في استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات الترمس يفسر بتباين منظمات النمو المنتخبة وتراكيزها (يحيى والصالح، 2013). وقد يرجح تفوق NAA لوحده في الوسط الغذائي في استحداثه الكالس الى دور الاوكسينات في توسع الخلية من خلال تأثيره على ليونة الجدار بزيادة النشاط الانزيمي وبناء البروتينات وبالتالي زيادة الانقسامات المتتالية (Du *et al.*, 2017). فضلا عن دوره في تحرير ايونات البروتونات (H^+) المهمة في عمليات الانقسام الخلوي، وهذا يتفق مع ما توصل اليه الباحثون من استحداث الكالس باستخدام وسط MS الحاوي NAA لوحده في نباتات الحمص (Mansure *et al.*, 2018). ونباتات سرة الارض (Tan *et al.*,



2010). وكما هو م لتوافق بين وجود تركيز
معين من منظم النم من منظمات النمو في
استحداثه للكالس.

التكوين التلقائي للأف

ومن النتائج ال د بلغت 22 فرعاً خلال
الادامة الدورية للكالس لتر$^{-1}$ NAA). وبدأت
الافرع بتكوين تراكيب ،D−1). ولم تعط باقي
الاوساط المنتخبة دو باتية لا تعني بالضرورة
سهولة انتاجه اعداداً في نباتات الفلفل (Al-
l-Yozbaki, 2001 السيقان وتكوينه التلقائي
للأفرع الخضرية وعل ليلاً على القدرة الكامنة
الذاتية لخلاياه في تك خلها مع مكونات الوسط
الغذائي، وايضا من المعروف ان انت د طبيعة التمايز (Parray *et al*., 2018 ;
Rajoriya *et al*., 2018).

تجذير الافرع الخضرية للترمس وانتاج

اشارت النتائج الى قدرة الافرع في وسط MSO بكامل قوته التركيبية بعد 26
يوم من نقلها. وبعد استمرار نموها اتص لها التي بلغت معدلاتها 1.1 سم (الشكل،E-1).
في حين حفز وبنسبة ضئيلة جداً وسط ر (الجدول 2).

الجدول 2: تجذير الافرع الخضرية المتمايزة للترمس *Lupinus albus* في وسط MSO الصلب

الوسط الغذائي	الافرع الخضرية المزروعة/المجذرة	المدة الزمنية للتجذير (يوم)	النسبة المئوية لتكوين الجذور (%)
MSO	5/10	26	50
MSO 1/2	1/10	36	10

ان اضافة منظمات النمو الى وسط الزراعة يعتمد على الغاية من الدراسة وعلى الجزء النباتي والنوع النباتي المستخدم التي تنتج طبيعياً الكميات التي تحتاجها من تلك المنظمات ولا تحتاج الى اضافات منها اذ من المحتمل ان تؤثر سلبا على نمو الانسجة النباتية وتمايزها (Hartmann *et al*., 2002).

الشكل 1: تكوين مزارع كالس السيقان تحت الفلقية لبادرات نباتات الترمس *Lupinus albus* وتمايزها الى نباتات كاملة في الوسط الزرعي

(A): بادرة نبات الترمس معزولة عن وسطها الغذائي MSO وبعمر 20 يوماً

(B): أنموذج للكالس المستحدث على وسط MS الصلب حاوياً 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA بعمر 20 يوم (السهم يشير الى بداية اختفاء معالم القطعة النباتية)

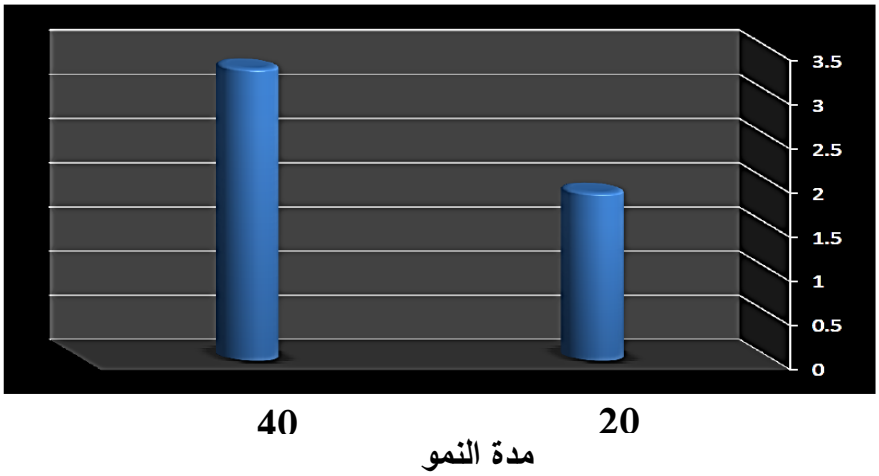
(C): أنموذج أخر للكالس المستحدث على وسط MS الصلب حاوياً 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA بعمر 30 يوماً (السهم يشير الى اختفاء معالم القطعة النباتية بالكامل وازدياد نمو الكالس ومتجهاً لتكوين مزارعه)

(D): التكوين التلقائي للأفرع الخضرية بتمايزها من الكالس النامي على ذات الوسط في (C) وبعمر 25 يوماً (السهم المفرد يشير الى زيادة نمو كتل الكالس وتكوينها مزارع منها، والسهم المزدوج يشير الى حيوية نمو الفرع الخضري وعدد الاوراق)

(E): تجذير الفرع الخضري المستأصل من (D) وبعمر 18 يوماً

الوزن الطري للكالس:

اظهرت النتائج زيادة واضحة في معدلات الوزن الطري والتي بلغت 3.3 غم للكالس النامي على وسط MS المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA بعد 40 يوماً من النمو الشكل (2). ويعد الوزن الطري احدى المقاييس البايولوجية المهمة لنمو الكالس، وتؤدي منظمات النمو دورا مميزا في هذا المسار بتأثيرها المباشر في بناء البروتينات والحوامض النووية من خلال تحفيزها الانزيمات المهمة في بنائها وهذا ما وجد من زيادة في معدلات الاوزان الطرية بعد 40 يوما من النمو (Du *et al.*, 2017).



الشكل 2: الوزن الطري لكالس السيقان تحت الفلقية لنباتات الترمس *Lupinus albus* بعد 20،40 يوماً من الزراعة على وسط MS الصلب والمدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA

** كل قراءة تمثل معدل 4 مكررات

المصادر العربية

العنزي، امجد عبد الهادي محمد (2013). احتفاظ نباتات الجزر *Daucus carota* L. بمجموعة *rol-genes* الناتجة من أنسجته المحولة وراثياً ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل.

النعمة، قتيبة شعيب محمد صالح (2001). التحفيز الكهربائي في تكوين الجذور الشعرية المحولة وراثياً وزراعة انسجة نباتات البنجر السكري (*Beta vulgaris* L.). رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.

برهام، زغلول صديق (2000). القيمة الغذائية والطبية للنباتات، مؤسسة ام القرى للترجمة والنشر والتوزيع، جمهورية مصر العربية.

يحيى، رنا طارق؛ الصالح، هناء سعيد (2013). استحداث ونمو مزارع الكالس من قطع السيقان والاوراق الفلقية لنبات الخرنوب *Prosopis farcta* L. المحفز باستخدام بعض منظمات النمو النباتية. مجلة علوم الرافدين، **24**، 80−94.

المصادر الأجنبية

Agniszka, A.; Anna, K.; Waclaw, W. (2006). Compositional and nutrition of several lupin seeds. *Food Chemistry*., **98**,711–719.

AL-Mallah, M.K.; AL-Yozbaki, G.S. (2001). *In vitro* callus induction from *Capsicum annum* seedlings (sweet and chili pepper). *J. Biotech. Res.* **3**, 34-44.

Bhardwaj, H.L.; Hamama, A.A. (2012). Cultivar and growing location effects on white lupin immature green seeds. *J. Agricult. Sci*., **4** (2), 135-138.

Du, H.; Ahmed, F.; Lin, B.; Li, Z.; Huang, Y.; Sun, G.; Ding, H.; Wang, C.; Meng, C.; Gao, Z. (2017). The Effects of plant growth regulators on cell growth, protein, carotenoid, PUFAs and lipid production of chlorella pyrenoidosa ZF strain. *Energies*., **10**(11), 1-23.

Haberlandt, G. (1902). "Cultiversuchemit Isolierten Ptanzenzellen". Cited by Street, H.E. (1977). Plant Tissue and Cell Culture. Black Well Scientific Publication. Oxford. London. Edinburgh. Melbourne.

Hartmann, H.T.; Kester, D.E.; Davies, I.T.; Geveve, R.L. (2002). "Plant Propagation Principle and Practices". 7th ed., Pearson Education، Inc., New York

Jansen, P.C.M. (2006). *Lupinus albus* L. Record from Protabase. Brink, M. and Belay, G. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa- Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands.

Joseph, H.; Ralf, G.; Karim, A. (2007). Effect of instantaneous controlled pressure drop on the phytate content of lupin. *Food Sci. Technol*., **40** (3), 448-453.

Juan, L.; Lihua, W.; Jing, L.; Junhui, W. (2010). Effect of different plant growth regulators on callus induction in *Catalpa bungei*. Afric. *J. Agri. Res*., **5**, 2699-2704.

Kurlovich, B.S.; Heinanen, J.; Kartuzova, L.T.; Bernatskaya, M.L.; Chmeleva, Z.V.; Berville, A. (2005). Diversity of (*Lupinus* L.) based on biochemical composition. *Publie. Dans. le.*,**134**, 42-57.

Mansur, R.M.; Alaila, A.K.; Mohamed, R.F.; Hamad, H.M.E. (2018). Effect of different plant growth regulators on callus induction from seeds of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Internat. *J. Environment, Agricult. Biotech*., **3**(1), 99-102.

Mohammed, A.A.; Al-Mallah, M.K. (2013). Determination of β-carotene in Carrot (*Daucus carota* L.) plants regenerated from stems callus. *Raf. J. Sci.*, **24**(3), 27-36.

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

Nadolska-Orczyk, A. (1992). Somatic embryogenesis of agriculturally important lupin species (*Lupinus angustifolius, L. albus, L. mutabilis*). *Plant Cell, Tiss. Org. Cult*., **28** (1), 19-25.

Neumann, K.; Kumar, A.; Imani, J. (2009). "Plant Cell and Tissue Culture – A tool in Biotechnology". Springer-Verlag Berlin, Germany.

Parray, J.A.; Kamili, A.N.; Jan, S.; Mir, M.Y.; Shameem, N.; Ganai, B.A.; Abd_Allah E.F.; Hashem, A.; Alqarawi, A.A. (2018). Manipulation of plant growth regulators on phytochemical constituents and DNA protection potential of the medicinal plant *Arnebia benthamii*. *Bio. Med. Res. Internat.*, 1-8. Open access.

Rajoriya, P.; Singh, V.K.; Jaiswal, N.; Lall, R. (2018). Optimizing the effect of plant growth regulators on *in vitro* micro propagation of Indian red banana (*Musa acuminata*). *J. Pharmacognosy and Phytoch*., **1**, 628-634.

Sen, M.K.; Jamal, M.A.M.; Nasrin, S. (2013). Sterilization factors affect seed germination and proliferation of *Achyranthes aspera* cultured *in vitro*. *Environment Experiment Biol*., **11**, 119–123.

Sinha, A.; Wetten, A.C.; Caligari, P.D.S. (2003). Effect of biotic factors on the isolation of *Lupinus albus* protoplasts. *Austral. J. Bot*., **51**, 103–109.

Sirtori, C.R.; Lovati, M.R.; Manzoni, C.; Castiglioni, S.; Duranti, M.; Magni, C.; Morandi, S.; D'Agostina, A.; Arnoldi, A. (2004). Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor in HepG2 cells. *J. Nutr. Jan*, **134** (1), 18-23.

Sroga, G.E. (1983). Callus and suspension culture of *Lupinus angustifolius* cv. Turkus. *Plant Sci. Letters*., **32** (1-2), 183-192

Tan, S.H.; Musa, R.; Ariff, A.; Maziah, M. (2010). Effect of plant growth regulators on callus, cell suspension and cell line selection for flavonoid production from Pegaga (*centella asiatica* L. urban). *American J. Biochem. Biotech*., **6** (4), 284-299.

Von Baer, E.; Von Baer, I.; Riegel, R. (2009). Pecosa-Baer: A new cultivar of white lupin with determined bushy growth habit, sweet grain and high protein content. *Chilean J. Agri. Res*., **69**, 577-580.