التأثيرات البايولوجية لعديد السكريات الخارجي External Polysacchariede (EPS) المعزول من بكتريا *Sinorhizobium meliloti* على الزراعة النسيجية لنبات الحلبة

د. نجوى إبراهيم البرهاوي اريان محمد حامد
قسم علوم الحياة / كلية التربية
جامعة الموصل

القبول	الاستلام
٠٧ / ٠٨ / ٢٠١١	٠٤ / ٠٤ / ٢٠١١

Abstract

External Polysacchariede has been extracted from *Sinorhizobium meliloti* which is known for its symbiotic relation with Legume plant *Trigonella foenum-graecum*. This (EPS) has been added with the following concentrations: 0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/l to solidified Murashige & Skoog (MS) medium, to study its effect on callus initiation from roots, stems, and leaves of *Trigonella foenum-graecum*. It has been shown that all these concentrations did not have any effect on callus induction from the roots of this plant. While the concentration (0.1) mg/l.; was the best one that stimulated callus formation from stems and leaves explants since the percentage of callus induction were 50 and 62.5% respectively. This concentration of EPS was added to the treatments that contain both auxin and cytokinin in MS medium.the results showed thata a white callus was formed from stems and leaves explants after two weeks of culture on solidified MS medium containing 0.1 mg /L of both EPS and NAA with differentiation of roots from leaves' callus. Moreover, there was an increase in the protein content of stem's callus and leaves to reach by 0.27, 0.35 mg/L respectively as compared to protein content (0.03, 0.11 and 0.02, 0.09 mg/ L) of callus initiated from stems and leaves explants which were cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/L EPS and 0.2 mg/L BA and 0.1 mg/L EPS, 0.2 mg/L BA, 0.1 mg/L NAA respectively after 3 and 5 weeks of culture.

الخلاصة

تم استخلاص عديد السكريات الخارجي External Polysacchariede (EPS) من بكتريا *Sinorhizobium meliloti* المعروفة بعلاقتها التعايشية مع النبات البقولي *Trigonella foenum-graecum* وإضافته ضمن التراكيز آلاتية: (0.0, 0.05, 0.1, 0.2 , 0.4 ,0.8ملغم /لتر) إلى وسط موراشيج وسكوك MS) medium) الصلب، لدراسة تاثيره على استحداث الكالس من جذور وسيقان وأوراق بادرات نبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum*. وتبين أن جميع هذه التراكيز لم يكن لها تأثير على استحداث الكالس من جذورهذه البادرات، في حين كان التركيز 0.1 ملغم /لتر، من أفضل التراكيز المستخدمة التي حفزت على تكوين الكالس من قطع السيقان والأوراق النباتية ، اذ بلغت النسبة المئوية للاستحداث ، 62.5و 50% على التوالي، واعتمد هذا التركيز في إضافته للمعاملات التي تم فيها استخدام منظمات النمو وبنوعيها الاوكسين والسايتوكاينين، اذ تكون كالس ابيض اللون من قطع النباتية (السيقان والأوراق) بعد أسبوعين من الزراعة على وسط MS الصلب المدعم بالتداخل: [EPS: NAA (نفثالين حامض الخليك) /0.1:0.1ملغم/ لتر]، مع تمايز الكالس المستحدث من قطع الأوراق فقط إلى جذور ذات شعيرات جذرية كثيفة، فضلا عن زيادة المحتوى البر وتيني للسيقان والأوراق بنسبة (0.27، 0.35 ملغم/لتر) على التوالي، قياسا بالمحتوى البروتيني (٠.٠٠٣، 0.11 و ٠.٠٠٢، 0.09 ملغم /لتر) في الكالس الناتج من قطع السيقان والاوراق النامية في وسط MS الصلب المدعم بالتركيزين [BA:EPS (البنزايل أدنين) /0.1 : 0.2ملغم /لتر] و(EPS : BA: NAA / 0.1:0.2:0.1 ملغم / لتر) على التعاقب وبعد ٥ و٣ اسابيع من الزراعة.

المقدمة:

ينتمي نبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* إلى العائلة البقولية Leguminaceae، تحت العائلة الفراشية Papilionaceae (١)، وهو من النباتات العشبية الحولية (٢)، كما ويعد من افضل المحاصيل البقولية(٣)، بسبب محتواه البروتيني العالي (4)، نتيجة لعلاقته التعايشية والمتخصصة مع بكتريا *Sinorhizobium meliloti* (5). تناولت دراسات عديدة استخدام منظمات النمو المختلفة لاستحداث الكالس من الاوراق والسيقان تحت الفلقية لنبات الحلبة *T.foenum-graecum*، باستخدام وسط MS الصلب المدعم بمنظمات النمو BA وNAA و2,4-D (٦)،وكذلك في الوسط MS الصلب المدعم ب ٠.٢ BA و0.1 NAA ملغم /لتر لاستحداث الكالس من سيقان وجذور واوراق بادرات الحلبة وبنسب متفاوتة بلغت 90.5 , 90.0 , 89.3% على التعاقب(٧). وكانت هناك دراسات اخرى بينت ان المركبات

الكاربوهيدراتية الموجودة على سطح بكتريا الرايزوبيوم ومنها عديد السكريات الخارجي External Polysacchariede (EPS) (٨)، والبيتا كلوكان المتعادل Neutral Beta glycan وعديد السكريات الدهنية Lipopolysacchariede (LPS) (٩)، لها دورا مهم ا يتمثل في قمعها لنظام الدفاع النباتي عن طريق حماية البكتريا من التأثير القاتل للسموم النباتية المفرزة في المنطقة المحيطة بالجذور (10)، وفي تمييز العائل البقولي لبكتريا الرايزوبيوم المتخصصة له (11)، وفي حث جينات النبات البقولي للتعبير عن بروتينات early nodulin المسؤولة عن تشوه الشعيرات الجذرية وانقسام خلايا القشرة لتكوين العقد الاولية والعقد المرستيمية (12). لذلك استفاد باحثين اخرين من هذه المميزات المتعددة للمركبات الكاربوهيدراتية وعمدوا على تسخيرها في مجال الزراعة النسيجية للاجزاء المختلفة من النباتات ، اذ تبين ان لمركب ع ديد السكريات الدهنية Lipopolysacchariede (LPS) المستخلص من بكتريا *S.meliloti* ، له دور مؤثر في استحداث الكالس من الجذور الشعرية المحولة وراثيا والمتكونة على السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات الجت وذلك بعد أصابتها ببكتريا *Agrobaterium rhizogenes R 1601* وبعد ٦ أسابيع من نموها على الوسط MS الصلب المدعم بالتركيز ٤ و ٦ ملغم/ لتر من هذا المركب (13)، وتكوين كالس هش القوام اخضر اللون نتيجة لتنمية قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات الحلبة على سطح وسط MS الصلب المدعم بمنظم النمو NAA و LPS المستخلص من هذه البكتريا أيضاً (١٤)، كما لوحظ ان عديد السكريات الدهنية LPS المستخلص من كل من بكتريا *Sinorhizobium meliloti* و *Rhizobium trifoli* عند اضافتهما لوسط NF الصلب كان لهما دور تحفيزي متمثلا بتكوين تراكيب تشبه العقد خالية من البكتريا المثبتة للنتروجين الجوي على ج ذور بادرات نبات الجت والبرسيم المتخصصة باصابتهما (15)، في حين اكدت البرهاوي و صالح (١٦)، ان لعديد السكريات الخارجي EPSالمستخلص من بكتريا *Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli* له دور تحفيزي جيد في تكوين تراكيب تشبه العقد على جذور نبات الفاصوليا وفي الحث على تكوين الكالس من الاجزاء النباتية لكل من نبات الفاصوليا وزهرة الشمس على التعاقب وكذلك كان لعديد السكريات الدهنية المستخلص من بكتريا *S.meliloti* دور تحفيزي في تكوين العقد الجذرية على بادرات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* (١٧). لذلك كان الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو استخلاص عديد السكريات الخارجي(External Polysacchariede (EPS من بكتريا *Sinorhizobium meliloti* لدراسة امكانية تأثيره في الحث على انقسام خلايا القطع النباتية لبادرات الحلبة واستحداث الكالس منها بشكل منفرد ومتداخل مع منظمات النمو المتعارف على استخدامها في الزراعة النسيجية للنباتات المختلفة.

المواد وطرائق العمل :

البكتريا وظروف تنميتها:

استخدمت بكتريا *S. meliloti* التي تم الحصول عليها من Dr.E.C.Cocking مركز تثبيت النتروجين الجوي/جامعة نوتنكهام/المملكة المتحدة.

اذ تم تنشيط وحفظ بكتريا *S. meliloti* على الوسط الغذائي Yeast Extract Mannitol (YEM) (18)، وذلك بزرعها بطريقة التخطيط Streaking method للحصول على مستعمرات مفردة على سطح YEM الصلب ، وتحضينها بصورة مقلوبة في حاضنة النمو (New Brunswich Scientific, Co.Inc-Edision, N.J.,USA) عند درجة (٢٨ ± ٢ ^{o}م) لمدة (٢٤ ساعة).

استخلاص عديد السكريات الخارجي External -Polysaccharides (EPS):

اعتمدت طريقة Ervin and Hubbell (19) في عزل EPS من بكتريا *S. meliloti*.

البذورالمستخدمة ومصدرها:

استعملت بذور نبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* التي تم الحص ول عليها من الاسواق المحلية.

تعقيم البذور وزراعتها على وسط MS الصلب:

تم زراعة بذور نبات الحلبة ، المعقمة تعقيما سطحيا بغمرها لمدة خمس دقائق في ٣% من القاصر التجاري NaOCL (٧)، ثم غسلت ثلاث مرات في الماء المقطر بمعدل (٣) دقيقة/مرة لإزالة آثار المادة المعقمة ونقلت الى سطح ورق الترشيح المعقم لغرض تجفيفها من الماء العالق بها ، في قناني زجاجية سعتها ١٠٠ سم ٣ تحتوي على ٢٥ مل من وسط موراشيج وسكوك (MS) الصلب الخالي من منظات النمو وبمعدل (٦ بذور / قنينة)، حضنت في غرفة النمو في ظروف الظلام التام عند درجة حرارة ٢٥ ±٢ ^{o}م لمدة يومين ثم نقلت إلى إلى ظروف نظام الإضاءة والظلام التعاقبي (١٦ ساعة ضوء /٨ ساعات ظلام) عند شدة الإضاءة ٢٠٠٠ لوكس ولمدة أسبوعين.

الزراعة النسيجية:

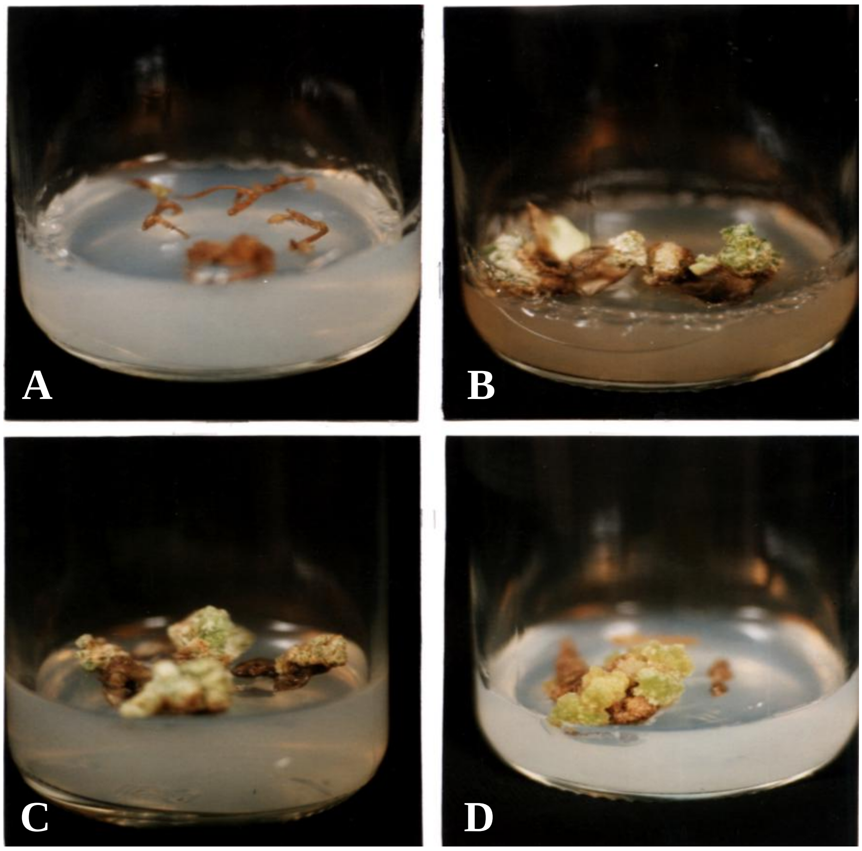
اخذت الأجزاء النباتية (الجذور والسيقان والاوراق) ووضعت على الوسط MS المدعم بالتراكيز المختلفة (0.8,0.4, 0.2, 0.1, 0.05,0.0) ملغم /لتر من المركب EPS، وفي الوسط MS المدعم بالتداخلات التالية :(NAA: EPS ‎/‎٠.٠١: ٠.١ وBA: EPS ‎/‎٠.٠١: 0.2 وNAA :BA :EPS / 0.1:0.2:0.1) ملغم/لتر، ثم حضنت جميع القناني في غرفة النموعند الظروف المذكورة سابقا.

تقدير المحتوى البروتيني:

قدر المحتوى البروتيني في الكالس المستحدث من قطع السيقان والأوراق لنبات الحلبة بالاعتماد على طريقة بايوريت Biuret method (٢٠).

النتائج:

بينت نتائج دراسة تأثير عديد السكريات الخارجي **External -Polysaccharides** (EPS) المستخلص من بكتريا *S.meliloti* على استحداث الكالس من قطع الأجزاء النباتية (الجذور، السيقان والاورق) لبادرات نبات الحلبة*Trigonella foenum-graecum*، انه لم يكن له تأثير يذكر على تحفيز خلايا جذور هذه البادرات لاستحداث الكالس منها (الشكل ١، A)، ولكنه شجع على انقسام خلايا القطع النباتية لكل من السيقان والاوراق لتكوين الكالس باشكال وكيفيات متباينة، فقد امتاز الكالس الناتج من قطع الاوراق بلونه الأخضر وبقوامه



الشكل (١): تأثير التراكيز المختلفة من عديد السكريات الخارجي External -Polysaccharides على استحداث الكالس من الأجزاء النباتية لنبات الحلبة.

A- قطع من جذور نبات الحلبة، نامية على وسط MS الصلب المدعم بمركب 0.1 ملغم /لترEPS

B- قطع من أوراق نبات الحلبة، نامية على وسط MS الصلب المدعم بمركب ٠.٢ ملغم /لترEPS

C- قطع من أوراق نبات الحلبة، نامية على وسط MS الصلب المدعم بمركب ٠.٨ ملغم /لترEPS

D- قطع من سيقان نبات الحلبة، نامية على وسط MS الصلب المدعم بمركب ٠.٤ ملغم /لترEPS

الصلب في حين كان الكالس المستحدث من السيقان على الاغلب هش القوام ابيض اللون كما هو ملاحظ عند استخدام التركيزين ٠.٢ و٠.٨ ملغم/لتر والتركيز ٠.٤ ملغم/لتر EPS (الشكل ١، B ، C، D) على التعاقب. وتراوحت النسبة المئوية للاستحداث مابين ١٢.٥ –٦٢.٥ % اعتمادا على التركيز المستخدم للمستخلص، كما تكونت الجذور على قطعة واحدة من القطع النباتية من سيقان بادرات الحلبة خاصة عند التركيزين ٠.١ و٠.٤ ملغم/لتر EPS، وبلغت اقل فترة للاستحداث الكامل للكالس ثلاثة أسابيع وأربعة أسابيع، الجدول (١).

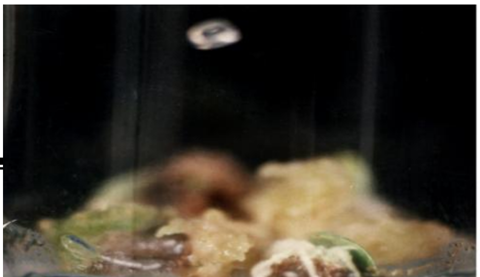
اعتمادا على نتائج الجدول (١)، تم استخدام التركيز 0.1 ملغم/لتر EPS متداخلا مع التراكيز المدروسة من (NAA: EPS /٠.٠١: ٠.١) و(BA: EPS /٠.٠١: 0.2) ملغم /لتر، حيث يوضح الشكل (٢)، التأثير التحفيزي للتداخل الحاصل ما بين عديد السكريات الخارجي EPS ومنظمي النمو BA, NAA بتراكيزهما المذكورة اعلاه، في انتفاخ خلايا كل من السيقان والاوراق ومن ثم تكوين كالس اخضر اللون هش القوام (الشكل٢، A،B،C،D)، عند تداخل EPS مع منظمي النمو BA او NAA، وفي المقابل تكون كالس اخضر اللون صلب القوام وكالس اخضر اللون هش القوام عند تنمية قطع اوراق و سيقان نبات الحلبة على وسط MS المدعم بـ EPS مع منظمي النمو NAA و BA (الشكل ٢، E وF).

الجدول (١): تأثير التراكيز المختلفة من عديد السكريات الخارجي External -Polysaccharides على استحداث الكالس من الأجزاء النباتية لنبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum*.

عدد المكررات ٨ قطع نباتية /معاملة/ جزء نباتي، القيم بين الأقواس تمثل (%) النسبة المئوية

التركيز EPS ملغم/لتر	الأجزاء النباتية			مدة الاستحداث الكامل للكالس (أسبوع)
	السيقان		الاوراق	
	عدد القطع المستحدثة للكالس (%)	عدد القطع التي أعطت الجذور	عدد القطع المستحدثة للكالس (%)	
٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠
٠.٠٥	٥.٠ (٦٢.٥)	٠.٠	٢.٠ (٢٥.٠)	٤.٠
٠.١	٥.٠ (٦٢.٥)	١.٠	٤.٠ (٥٠.٠)	٣.٠
٠.٢	١.٠ (١٢.٥)	٠.٠	٤.٠ (٥٠.٠)	٤.٠
٠.٤	٤.٠ (٥٠.٠)	١.٠	١.٠ (١٢.٥)	٤.٠
٠.٨	٥.٠ (٦٢.٥)	٠.٠	٥.٠ (٦٢.٥)	٣.٠

للاستحداث



الشكل(٢): تأثير التداخل بين عديد السكريات الخارجي EPS ومنظمات النمو (BA, NAA) على استحداث الكالس من الأجزاء النباتية لنبات الحلبة.

A– قطع من أوراق نبات الحلبة ، نامية على وسط MS الصلب المدعم بمركب EPS+NAA

B- قطع من أوراق نبات الحلبة ، نامية على وسط MS الصلب المدعم بمركب EPS+BA

C– قطع من سيقان نبات الحلبة ، نامية على وسط MS الصلب المدعم بمركب EPS+NAA

D– قطع من سيقان نبات الحلبة ، نامية على وسط MS الصلب المدعم بمركب EPS+BA

E– قطع من أوراق نبات الحلبة ، نامية على وسط MS الصلب المدعم بمركب EPS +NAA+BA

F– قطع من سيقان نبات الحلبة ، نامية على وسط MS الصلب المدعم بمركب EPS +NAA+BA

الجدول (٢): تأثير التداخل بين عديد السكريات الخارجي EPS ومنظمات النمو (BA, NAA) على استحداث الكالس من الأجزاء النباتية لنبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* ومحتواه البروتيني

المادة المضافة	التركيز ملغم/لتر	الأجزاء النباتية: السيقان – عدد القطع المستحدثة للكالس (%)	السيقان – المحتوى البروتيني ملغم/لتر	الأوراق – عدد القطع المستحدثة للكالس (%)	الأوراق – عدد القطع التي اعطت الجذور	الأوراق – المحتوى البروتيني ملغم/لتر	مدة الاستحداث الكامل للكالس (اسبوع)
NAA:EPS	٠.١:٠.١	١٠ (٤٠)	٠.٢٧	٢٣ (٩٢)	6	٠.٣٥	٢
BA:EPS	٠.٢:٠.١	١٨ (٧٢)	٠.٠٣	٩ (٣٦)	0.0	٠.١١	٥
NAA:BA:EPS	٠.١:٠.٢:٠.١	١٩ (٧٦)	٠.٠٢	١٤ (٥٦)	0.0	٠.٠٩	٣

عدد المكررات المستخدمة ٢٥ قطعة نباتية / معاملة/ جزء نباتي ، القيم بين الأقواس تمثل (%) النسبة المئوية للاستحداث

من جانب اخر تساوى المحتوى البروتيني للكالس الناتج عند تنمية قطع السيقان والأوراق على الوسط المدعم بالتراكيز الثلاثة معا (NAA : BA : EPS/٠.١:٠.٢:٠.١) ملغم /لتر والمدعم بكل من (BA : EPS /٠.٢:٠.١) ملغم /لتر وكان اقل من المحتوى البروتيني المحسوب للكالس الناتج عند تنمية هذه القطع على وسط MS الصلب المضاف اليه (EPS : NAA/٠.١ :٠.١) ملغم/لتر . اما الفترة اللازمة للاستحداث الكامل للكالس فقد استغرقت في التداخل(NAA : EPS) مدة اسبوعين فقط ، في حين تم ذلك في التركيزين (BA: EPS و NAA :BA: EPS)، بعد٣ و ٥ اسابيع من الزراعة كما هو ملاحظ في الجدول (٢).

كما كانت استجابة الاوراق لهذا التداخل افضل من استجابة السيقان، ولا سيما عند التداخل بين NAA :EPS، بدلالة ارتفاع محتواها البروتيني، وعدد القطع المستحدثة للكالس منها فضلا عن تحفيز هذا التداخل على تكوين جذور عليها (الشكل A،٢)، قياسا بالتداخلين BA :EPS و NAA:BA :EPS .

المناقشة:

ابدى عديد السكريات الخارجي EPS عند إضافته بشكل منفرد او متداخل مع BA او/ و NAA الى وسط MS الصلب ، قابلية على استحداث الكالس من القطع النباتية لاوراق

وسيقان نبات الحلبة، على الرغم من اختلاف تاثير ذلك حسب اختلاف نوع التداخل مع منظمي النمو BA كسايتوكاينين و NAA كأوكسين وهذا يعود حتما إلى اختلاف التوافق لمنظمات النمو بين داخل الخلايا وخارجها (٢١)، كما ان القدرة العالية التي أبدتها إضافة منظم النمو NAA بشكل متداخل مع EPS قد يعزى الى احتواء هذه القطع النباتية ذاتيا على ما يكفي من السايتوكاينين وقلة محتواها من الاوكسين وذلك على افتراض سلوك EPS كمحث للجين المسؤول عن التعبير الوراثي لإنتاج الأوكسينات (١٣)، ولذلك بعد إضافة (NAA :EPS) اكتملت متطلبات الدورة الخلوية النباتيِ التي تتأثر غالبا بوجود هذين النوعين من منظمات النمو ، وبالتالي حصول نوع من التوافق لمنظمات النمو ادى الى الانقسام الفتيلي للخلايا (٢٢)، ومن ثم استحداث الكالس منها ، فضلا عن زيادة محتواه البروتيني نتيجة الفعل الأوكسيني في مضاعفة الحامض النووي DNA ومن ثم تكوين RNA وانتهاءا بتكوين البروتين (٢٣)، وقد تفسر هذه الزيادة ايضا اعتمادا على وجود الحوامض العضوية وهي Pyruvate و Succinate و Acetylate ضمن مكونات EPS (٢٤)، والتي تتداخل مع مجاميع الاحماض ا لامينية الاساسية لتكوين المركبات البروتينية داخل الخلايا النباتية (٩)، وكانت المدة الزمنية لاستحداث الكالس فيه اسرع من التداخلين الاخرين (BA: EPS و NAA :BA: EPS) وقد يعزى سبب ذلك الى التوافق بين المحتوى الداخلي من الهرمونات النباتية مع المضاف من منظمات الن مو (٢٥) وقد تطابق سلوك EPS المستخدم في هذا البحث مع سلوك LPS المعزول من بكتريا *S.meliloti* وعند إضافته بشكل منفرد او متداخل مع NAA و BA إلى وسط MS الصلب وتأثيره الايجابي في استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات الحلبة (١٤)، والتي أشارت فيه الى ان فشل استحداث الكالس من القطع النباتية النامية في وسط MS الصلب المدعم بكل من NAA او BA كلا على انفراد قد يكون عائدا الى عدم كفاية التراكيز المستخدمة منهما على الاستحداث، اما تمايز بعض القطع النباتية الى مجموع جذري فقد يعزى الى الدور المهم للتوازن بين المضاف من منظمات النمو مع اله رمونات النباتية الداخلية (٢٦)، او ربما يعزى السبب الى التركيب الوراثي للاجزاء النباتية المزروعة او الحالة الفسيولوجية للنبات المأخوذ منه ذلك الجزء النباتي (٢٧،٢٨)، في حين يعزى السبب في التباين الملاحظ عند استخدام التراكيز المختلفة من مادة EPS بشكل منفرد ، او متداخل مع منظمات االنمو بنوعيها الاوكسين والسايتوكاينين، الى نوع القطعة النباتية ومصدرها والظروف البيئية اثناء الزراعة (٢٩).

المصادر:

١) الموسوي، علي حسين عيسى، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، مطبعة جامعة بغداد، العراق (١٩٨٧).

٢) ابو زيد، الشحات نصر، النباتات والأعشاب الطبية، دار مكتبة الهلال (١٩٨٦).

3) Varghese, S., Righthealth Journal., (2010).

4) Leung, A.Y. and Foster, S., Microbiol., 60: 3315-3322(1996).

5) Hynes, M.F. and Finan, T.M., "The Rhizobiaceae". (Ed., Dordrecht, The Netherland: Kluwer Academic Publishers (1998).

٦) علي، هلياء حسن، مجلة التربية والعلم، ١٥:١٢-٢٥ (١٩٩٦).

٧) احمد، جاسم محمد ياسين. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل(٢٠٠٠).

8) Leigh, J.A. and Walker, G.C., Trends in Gen.,10:63-67 (1994).

9) Battisti, L.; Lara, J.C. and Leigh, J.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:5625 -5629 (1992).

10) Eisenschenk, L.; Diebold, R.; Perez-Lesher, J.; Peterson, A.; Peters, N.K. and Noel, D., "Inhibition of *Rhizobium etli* polysaccharidemutants by *Phaseolus vulgaris* root compound". 2^{nd}Ed., New York (1994).

11) Long, S. , Annu. Rev. Gen., 23:415-425 (1989).

12) Gloudemans, T., Bhuvaneswari, T.V., Moerman, M., Van Brussel, T., Van Kammen, A and Bisseling, T., Plant Mol. Biol.,12:157-167 (1989).

١٣) حبش ، اثيل نجيب يوسف جبرائيل ، رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل (٢٠٠٢).

١٤) القصيمي ، علياء حازم عبد الرزاق سليمان ، رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل (٢٠٠٦).

15) Al-Barhawi. N. I. and Al-Mallah, M. K., Agriculture Rafidyn Journal, 2 :39, (2011).

١٦) البرهاوي، نجوى إبراهيم و صالح، شفاء مهدي، مجلة تكريت للعلوم الصرفة، مجلد ١٣، العدد ١، ٣٢ -٣٤ (٢٠٠٨).

١٧) البرهاوي، نجوى إبراهيم خليل والقصيمي، علياء حازم عبد الرزاق ، وقائع المؤتمر العلمي الأول لعلوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل (٢٠٠٩).

18) Vincent, J.M., "A Manual For the Practical Study of Root Nodule Bacteria". Ed. IBP Handbook No.15. Oxford: Blackwell Scientific Publications, Oxford (1970).

19) Ervin, S. E., and Hubbell, D. H., Appl. Environ. Microbiol., 49:61-68 (1985).

20) Henry, R. J.; Cannon, D. C. and Winkelman, J.W., "Clinical Chemistry Principles and Techniques", 2nd Ed. Harper and Row (1974).

21) Schroder, G.; Waffenschmidt.; Weiler, E. W. and Schroder, J., Eur. J. Biochem., 138: 387-391 (1984).

٢٢) ياسين، بسام طه، مطابع دار الشرق، قطر(٢٠٠١).

٢٣) محمد، عبد العظيم كاظم ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جام عة الموصل، كلية الزراعة، مديرية مطبعة جامعة الموصل، العراق (١٩٨٥).

24) Skorupska, A. Jancszasek, M.; Marczek, M.; Mazur, A. and Krol, J., Microbial Cell Factories, 5: 7 (2006).

25) Badigannavar, A. M. and Kuruvinasdshetti, M. S., Agricultural Sciences, 19:25, 35-38 (1996).

٢٦) الكناني ، فيصل رشيد ناصر ، زراعة الانسجة والخلايا النباتية، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل (١٩٨٧).

٢٧) سلمان، محمد عباس ، أساسيات زراعة الخلايا والأنسجة النباتية، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة بغداد (١٩٨٨).

28) Ammirato, P.R. Evans, D. A. Sharp, W.R. and Yamada, Y., Hand book of plant cell culture , University of Manchester, U.K. (1984).

٢٩) محمد، عبد المطلب سيد و عمر، مشير صالح ، المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والأنسجة والأعضاء للنبات، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل (١٩٩٠).