تعريض المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا للمعاملة الكهربائية أو مزجها مع بلازميدات Ri في تكوين الكالس في قطرات الأكار المتعددة

سهلة محمد زيدان جميلة هزاع رشيد قتيبة شعيب النعمة
قسم علوم الحياة-كلية التربية-جامعة الموصل
الموصل- العراق

تاريخ الاستلام 2005/11/28 تاريخ القبول 2006/4/3

ABSTRACT

The present study successed in obtaining callus from embedding cell suspension of *Glycine max* in agar using Multiple Drop Array (MDA) technique.Results indicate that liquid Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.1 mg/L NAA and 2.0 mg/L BA promot divisions of cell and colonies formation.Moreover,electro-treatment of those cell suspension before culture enhanced division of cells and increased colonies formation. Interestingly, the results indicate that mixing certain quantity of Ri-plasmid with cell suspension also stimulate formation of cellular colonies. Generally all these treatments led to the formation of small pieces of callus in agar drops. These fragments of callus continued its growth on subculture medium.

الخلاصـــة

بينت النتائج إن خلايا المعلقات الخلوية التي سبق تعريضها للمعـــاملات الكهربائيـــة لفترات وفولتيات متباينة بدأت في انقساماتها مبكراً وأدت الى زيادة أعداد المستعمرات الخلوية المتكونة اعتماداً على الكثافات المزروعـــــة منها. وأظهـــــرت النتـــائج ان زراعـــة مزيج المعلقـــات الخلوية بمرافقة بلازميدات Ri المحفزة لتكوين الجذور الـــشعرية(Root inducing plasmid) شجعت أيضا في حدوث الانقسامات المبكرة لخلايا المعلقات الخلوية. وعموماً فقد ادت هذه المعاملات جميعها إلى تكوين الكالس في قطرات الاكار، وتمكنت هـــذه القطع الصغيرة من الكالس مواصلة نموها وزيادة احجامها في وسط الادامة.

المقدمة

من المعروف ان العديد من الانواع النباتيـــة البقـــولية وخـــاصة الحبـــوب منــــها (grain legumes) قد درست على نحو واسع في المزارع النسيجية وعلى الرغم من ذلك فقد أظهرت بعض منها مثل نباتات فول الصويا *Glycine max* صعوبات واضحة فــي هــذه المـــزارع (1).

لقد اشارت العديد من البحوث الى تكوين مزارع الكالس من النبات البقولي فول الصويا *Glycine max* وقابلية هذا الكالس على انتاج النباتات (1). وبرهنت احدى هذه الدراســات على ان اضافة مركب Tocopherol مع تراكيز مرتفعة نسبياً من الحديد الى الوسط الغذائي قد شجع نمو الكالس وانقسام خلاياه في عدد من البقوليات في حين ادى غيابها من الوسط الى عرقلة نمو الكالس (2). وتناولت دراسات مختلفة انشاء مزارع المعلقات الخلوية في العديد من الانـــواع البقوليـــة كالبـــاقلاء *Vicia faba* (3) ونباتـــات الحلبـــة *Trigonella foenum graecum* (4). وأشارت مجموعة أخرى من الدراسات الى أهمية اعتمـــاد تقانـــة زراعـــة المعلقات الخلوية للبروتوبلاست او تلك المشتقة من الكالس (5) فضلاً عن ان نجاحها يعتمـــد على كثافة الخلايا المزروعة ونوع الوسط المستخدم (6). وتشير المعلومات المتوفرة الى ان عدداً من البقوليات وعدداً غير محدود من محاصيل الحبوب منها التي تعاني من صـــعوبات واضحة في تمايزها في الوسط الزرعي أمكن التغلب عليها باعتماد زراعة البروتوبلاست او المعلقات الخلوية المشتقة من الكالس كما في نباتات الباقلاء (3).

وأوضحت دراسات أخرى أن للمعاملة الكهربائية دوراً مشجعاً لانقسام خلايا المعلقات الخلوية في عدد من الانظمة النباتية من ذوات الفلقتين والفلقة الواحدة، فقد اشار قسم منها الى ان اخضاع هذه الانظمة لتقانة التثقيب الكهربائي Electroporation شجع بوضوح انقـــسام خلايا بروتوبلاست المعلقات الخلوية وتلك المشتقة من الكالس فـــي نباتـــات *Pennisetum Spuamu latum* (7). ولخصت الدراسة كذلك ان حيوية الخلايا المعاملة تراوحت بين 90-95 % وبدأت عملية اعادة تشكل الجدار ومباشرة الانقسامات الخلوية مبكراً خلال أربعة أيام من الزراعة، مقارنة بنظيرتها غير المعاملة التي استغرقت سبعة أيام، مع استمرارها بالانقسام وتكوين المستعمرات الخلوية وتطورها الى منشآت الكالس (7). أشارت دراسات أخرى الـــى اهمية زراعة المعلقات الخلوية في احداث التحول الوراثي بوساطة بلازميدات Ri في عدد من النباتات القريبة من البقوليات (8). وذكرت مجموعة من الدراسات نجاح استخدام هذه البكتريا او بلازميداتها بوصفها نواقل في عملية التحول الوراثي للنباتات باستخدام مزارع المعلقـــات الخلوية كما في عدد من ذوات الفلقتين كالحلبة (9) والفاصوليا (10) أو نباتات ذوات الفلقـــة الواحدة (11).

هدفت الدراسة الحالية إلى معرفة تأثير الكثافات المختلفة من المعلقات الخلوية لنبات فول الصويا التي سبق تعريضها للمعاملة الكهربائية أو بمزجها مع تراكيز مختلفة من بلازميدات Ri وزراعتها بتقانة الطمر في قطرات الأكار المتعددة على تكوين الكالس.

مواد وطرائق العمل

المادة النباتية

عقمت بذور فول الصويا _*Glycine max* (الصنف المحلي) باتباع طريقة التعقيم المعتمدة من بعض الباحثين (1) بغمرها في محلول هايبوكلورايت الصوديوم (NaOCl) بنسبة 2حجم ماء: 1حجم قاصر مدة 10 دقائق بعدئذ غسلت البذور جيداً، ونقلت الى سطح 25 مل من وسط موراشيج وسكوج MS (12) الصلب الخالي من منظمات النمو في دوارق زجاجية حجم 100 مل وبمعدل بذرة واحدة / دورق، حفظت العينات في ظروف ظلام تام مدة ثلاثة ايام بدرجة حرارة 25+2م في غرفة الزرع ثم نقلت الى نظام الاضاءة التعاقبي 16 ساعة ضوء/ 8 ساعات ظلام. استخدمت البادرات المعقمة الناتجة بعمر أربعة أسابيع مصدراً لاستئصال قطع السيقان لاستحداث الكالس منها.

إنشاء مزارع المعلقات الخلوية من كالس السيقان

استخدم وسط MS الصلب المدعم باضافة 2.0 ملغم/لتر من البنزايل ادنين Benzyle Adenine (BA)، 1.0 ملغم/لتر من نفثالين حامض الخليك (NAA) Naphthalene Acetic Acid لاستحداث كالس سيقان فول الصويا (1،13) اللازم لأنشاء المعلقات الخلوية.

نقل غرام واحد من الكالس الهش الفتي الى 25 مل من وسط استحداث الكالس المشار اليه ولكن بحالته السائلة. حفظت المزارع في الحاضنة الهزازة (New Brunswick, USA) بظروف ظلام تام ودرجة حرارة 28°م وسرعة 150 / دورة / دقيقة مدة 24 ساعة. بعدئذ رشحت المزروعة من خلال منخل معقم حجم فتحاته46 µm(Plant Genetic Manipulation Group. Nott . Univ. U. K.) لعزل الكتل الخلوية الكبيرة غير المفككة وجمعت المزرعة الحاوية للخلايا المفردة والكتل الخلوية الصغيرة واكمل حجمها الى 25 سم^3 باضافة الوسط نفسه. اعيدت المزارع الناتجة الى الحاضنة الهزازة وتوبع انقسام الخلايا المزروعة الى اليوم السابع وتحديد كثافاتها. واديمت هذه المزارع دورياً بازالة الدوارق من الحاضنة الهزازة والسماح لركود خلاياها بوضع الدوارق الزجاجية مدة 3-4 ساعة بطريقة مائلة مستندة الى كابينة الزرع، بعدئذ سكب الوسط القديم بعناية مع الحفاظ على الخلايا

المترسبة، وأضيف اليها حجم مماثل من الوسط الغذائي نفسه (5) وأعيدت الى الحاضنة الهزازة بالظروف المشار اليها.

عزل البلازميدات Ri من بكتريا *Agrobacterum rhizogenes*

استخدمت مزرعة السلالة 1601 من بكتريا *Agrobacterum rhizogenes* النامية في وسط Morgan (14) الحاوي 100 ميكروغرام / مل من المضادين الحيويين الكاربنسيلين والكاناميسين وبظروف تحضين مهتز (Shaking incubator Co. Inc. Edision, NS., USA) بدرجة حرارة 28+ 1م وبظروف ظلام تام وسرعة دورانية بلغت 150 دورة / دقيقة ولفترة 48 ساعة من التحضين واستخدمت الطريقة المعتمدة لعزل البلازميدات (15).

زراعة المعلقات الخلوية في قطرات الاكار المتعددة (MDA)

اعتمدت الطريقة والكثافات المتبعة في زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس فول الصويا (16) والتي قدرت حيوية خلاياها باستخدام صبغة الايفان الزرقاء (17).

تعريض مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان للمعاملة الكهربائية

وضع 1سم^3 من المزرعة الخلوية وبالكثافات 122×10^3، 174×10^3 خلية/سم^3 في حجرة جهاز التثقيب الكهربائي المعقمة. بعدئذ ربطت الحجرة بأقطاب الجهاز(18) وانتخبت الفولتيات (1000V./110msec.,1000V./100msec.,1000V./50msec.,1000V./20msec.) فضلاً عن عينة المقارنة، وبعد انتهاء تعريض العينات فصل الجهاز عن مصدر الطاقة الكهربائية وفصلت اقطابه، واخذت محتويات الحجرة الحاوية للمزرعة المعاملة داخل كابينة الزرع لغرض زراعتها بتقانة قطرات الاكار(5).

الزراعة المرافقة للمعلق الخلوي مع بلازميدات Ri .

اخذت عينات من المزارع الخلوية وبحجم 1 سم^3 بالكثافات 122، 174×10^3 خلية/سم^3 النامية في الوسط السائل MS + 1.0 ملغرام/لتر NAA + 2.0 ملغرام/لتر BA مع أضافة تراكيز50,30,10 مايكروليتر من بلازميد Ri لكل عينة. وزع مزيج المزرعة والبلازميد بشكل قطرات متماثلة الحجم بمعدل 8-10 قطرات في قاعدة طبق بتري بلاستيكي قطر 5 سم وبعد تصلبها اضيف 2 سم^3 من الوسط السائل كما ذكر سابقاً.

النتائج

أستحداث مزارع المعلقات الخلوية.

بينت النتائج أن الوسط MS السائل بكامل قوته التركيبية المدعم بأضافة BA(1:2)، NAA ملغم/لتر على التوالي المستخدم لإنشاء المعلقات الخلوية قد شجع انقسام خلايا المزرعة اذ سجلت كثافتها الاولى 60 × 10 ^{3} خلية / سم ^{3} بعد 24 ساعة من النمو وتوالت الخلايا بانقسامها وبلوغها أعلى كثافة 174 × 10 ^{3} خلية/ سم^3 في اليوم السابع من الزراعة وبعد ذلك توقفت الخلايا عن الانقسام.

الحصول على بلازميدات Ri

اظهرت النتائج الحصول على بلازميدات Ri بدرجة عالية النقاوة وبلغت كثافتها 7.55 ملغم/ مل عند الطول الموجي 260 نانوميتر.

زراعة المعلقات الخلوية المعاملة كهربائياً

أظهرت النتائج ان حيوية خلايا المعلقات الخلوية التي عرضت للمعاملة الكهربائية قد تراوحت بين 47-81% وقد اظهرت هذه الخلايا المزروعة في قطرات الاكار والمضاف اليها الوسط السائل استجابة واضحة لهذه التقانة منذ الزراعة بدلالة حصول الانقسامات الخلوية في المعاملات المستخدمة جميعاً. فقد باشرت الخلايا بالانقسام الاول بعد ثلاثة أيام من تعريضها ثم دخلت هذه الخلايا انقسامها الثاني بعد 48 ساعة من حصول الانقسام الاول وتوالت المراحل اللاحقة من الانقسامات بعد مرور 7 أيام من الزراعة اذ باشرت بتكوين المستعمرات الخلوية خلال 20-25 يوماً من بدء الزراعة وتطورت الى منشآت الكالس الذي تمكن رؤيته بالعين المجردة، وقد أوضحت النتائج ان للمعاملة الكهربائية دوراً كبيراً في تكوين اعداد كبيرة من المستعمرات الخلوية التي نشأت في قطرات الاكار (الجدول 1). وتظهر نتائج الجدول نفسه ان الكثافة 122× 10^3 خلية/سم^3 شجعت تكوين اعداد كبيرة من المستعمرات قياساً على الكثافة 174×10^3 لكن الاخيرة تفوقت في إعداد البادئات التي تكونت فضلاً عن اعدادها التي تطورت الى قطع كالس ويلاحظ ان المعاملتين الاوليتين شجعتا طردياً اعداد البادئات المتكونة (الشكل 1 ، b ، c) قياساً على عينة المقارنة (الشكل 1 ، a) في حين ادت المعاملة الثالثة الى انخفاض اعداد البادئات (الشكل 1 ، d) وازداد هذا الانخفاض مع زيادة مدة التعريض مما ادى الى قلة اعداد البادئات المتكونة (الشكل 1 ، e).

الجدول (1): تأثير المعاملة الكهربائية في تكوين بادئات الكالس من زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا بالكثافات $10x122^3$، $10x174^3$ خلية/سم^3 في قطرات الأكار المتعددة

المعاملات	الكثافة المزروعة $10x122^3$			الكثافة المزروعة $10x174^3$		
	العدد الكلي للمستعمرات	العدد الكلي للبادئات	عدد البادئات المكونة للكالس	العدد الكلي للمستعمرات	العدد الكلي للبادئات	عدد البادئات المكونة للكالس
المقارنة	1449	258	65	1139	231	78
1000V./20msec.	1525	261	88	1289	688	108
1000V./50msec.	2593	1174	145	1426	736	423
1000V./100msec.	2134	1161	120	1285	688	111
1000V./110msec.	1422	785	95	1525	794	155

القيم الواردة في الجدول ناتجة من مجموع 25 مكرر (قطرة) / معاملة.

الشكل (1): تأثير تعريض المعلقات الخلوية المشتقة من فول الصويا (بكثافة 174 × 10^3 خلية/سم^3) للمعاملة الكهربائية وزراعتها بتقاتنة قطرات الاكار المتعددة.

a. بادئات الكالس المتكونة من زراعة المعلقات الخلوية غير المعاملة (المقارنة).

b. بادئات الكالس المتكونة من زراعة المعلقات الخلوية المعاملة 1000V/20msec

c. بادئات الكالس المتكونة من زراعة المعلقات الخلوية المعاملة 1000V/50msec

d. بادئات الكالس المتكونة من زراعة المعلقات الخلوية المعاملة 1000V/100msec

e. بادئات الكالس المتكونة من زراعة المعلقات الخلوية المعاملة 1000V/110msec

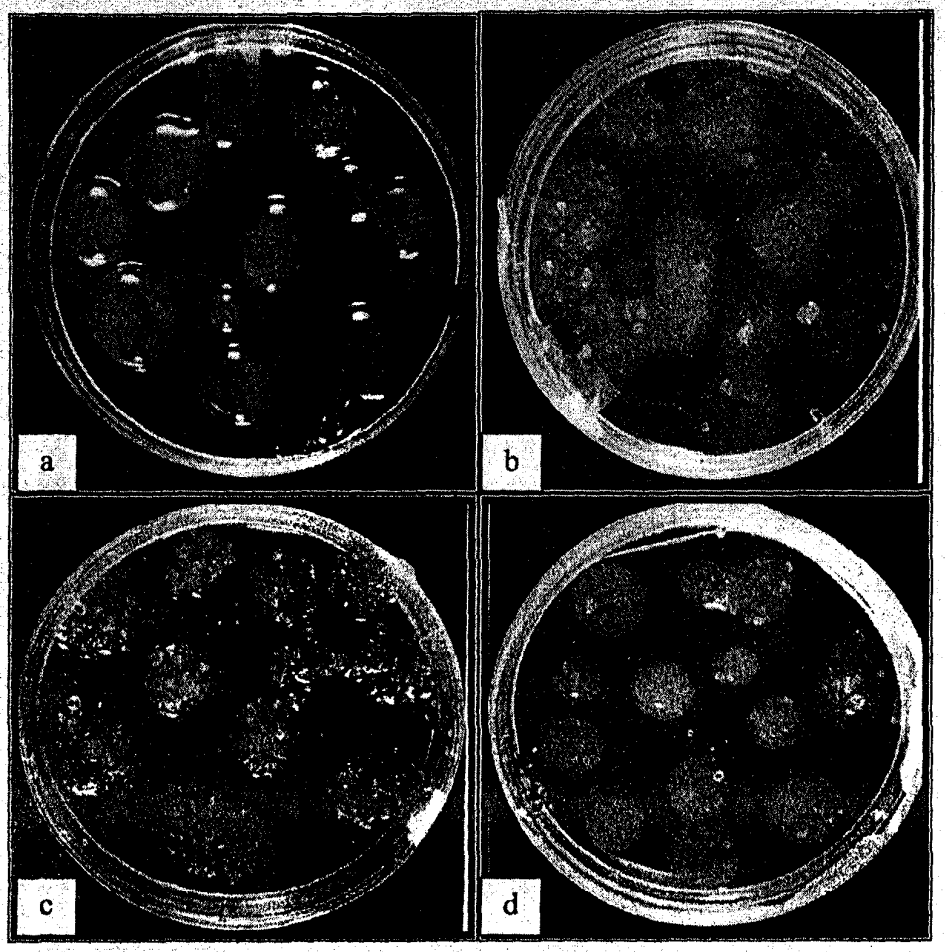
تكوين الكالس من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع بلازميدات Ri المطمورة في قطرات الاكار

أظهرت النتائج نجاح تقانة الزراعة المرافقة المتضمنة تحضين الكثافات المستخدمة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا مع بلازميدات Ri النقية وقد لوحظ عدم تلوث الوسط السائل المزروع في قطرات الاكار مما يؤكد نقاوة البلازميد Ri المستخدم. واظهرت النتائج عموماً ان اضافة بلازميدات Ri الى مزارع المعلقات الخلوية شجعت اعداد المستعمرات الخلوية المتكونة والبادئات المتطورة عنها قياساً على عينة المقارنة الخالية من اية اضافة للبلازميد (الجدول 2). ولوحظ ان اضافة 10 مايكروليتر من البلازميد ادت الى تكوين اعداد من بادئات الكالس (الشكل 2 ، b) تفوق على نحو واضح اعداده المتكونة في عينة المقارنة الخالية من اية اضافة للبلازميد (الشكل 2 ، a). ولوحظ ان اضافة 30 ، 50 مايكروليتر من البلازميد نفسه شجعت زيادة واضحة في اعداد بادئات الكالس المتكونة ولكلا الكثافتين المستخدمتين (الشكل 2 ، c ، d) قياساً على عينة المقارنة على الرغم من تفوق هذه الاعداد عند استخدام الكثافة الاولى قياساً على اعدادها المتكونة عند استخدام الكثافة الثانية.

الجدول (2): تكوين بادئات الكالس من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا بالكثافات $10x122^3$، $10x174^3$ خلية/سم^3 مع بلازميدات Ri في قطرات الأكار المتعددة

المعاملات 1سم^3 + بلازميد	الكثافة المزروعة $10x122^3$			الكثافة المزروعة $10x174^3$		
	العدد الكلي للمستعمرات	العدد الكلي للبادئات	عدد البادئات المكونة للكالس	العدد الكلي للمستعمرات	العدد الكلي للبادئات	عدد البادئات المكونة للكالس
المقارنة	1183	187	85	2480	226	77
معلق خلوي+10مايكروليتر	2121	279	112	3106	390	135
معلق خلوي+30مايكروليتر	2255	261	125	3238	443	166
معلق خلوي+50مايكروليتر	3000	366	144	1081	106	95

القيم الواردة في الجدول ناتجة من مجموع 25 قطرة (مكرر) / معاملة.



الشكل (2). تأثير مرافقة مزارع المعلقات الخلوية بكثافة 174 $\times 10^3$ خلية/سم^3 المشتقة من كالس فـول الصويا وبلازميدات Ri في تكوين الكالس بعد 30 يوماً من الزراعة بتقانـة قطـرات الاكـار المتعددة.

a. تكوين بادئات الكالس من زراعة المعلقات الخلوية وحدها (المقارنة).

b. تكوين بادئات الكالس بوجود بلازميدات Ri بتركيز 10 مايكروليتر.

c. تكوين بادئات الكالس بوجود بلازميدات Ri بتركيز 30 مايكروليتر.

d. تكوين بادئات الكالس بوجود بلازميدات Ri بتركيز 50 مايكروليتر.

المناقشة

ان نتائج استحداث الكالس من قطع سيقان فول الصويا في الوسط الزرعي كانت مماثلة لنتائج عدد من الدراسات التي اجريت على هذا النبات على الرغم من اختلاف الاضافات من منظمات النمو في وسط MS (1).

ان اعتماد مزارع المعلقات الخلوية في هذه الدراسة مثلت نظاماً بيولوجياً وفر فرصاً كبيرة لمتابعة سلوك الخلايا في المزارع النسيجية من حيث انقساماتها وتكوينها للمستعمرات الخلوية. وقد تعزى الزيادة الحاصلة في معدلات انقسام خلايا المعلق الخلوي الى توفر الاحتياجات الاساسية لأنقسام الخلايا في الوسط الزرعي متضمنة تأثيرات منظمات النمو المضافة، كما قد يعزى توقفها عن الانقسام الى التركيز العالي من منظمات النمو وهذا ماذكرته احدى الدراسات الحديثة التي تناولت زراعة المعلقات الخلوية لنباتات الخس في قطرات الاكار (19)، وأظهرت نتائج الدراسة ان زراعة خلايا المعلقات الخلوية بتقانة قطرات الاكار المتعددة بوجود NAA, BA كان لها تأثير واضح في حيوية الخلايا وانقسامها منذ الاسبوع الاول من الزراعة وفي استمرار الانقسامات الخلوية وتكوينها المستعمرات وصولا الى تكوين بادئات الكالس كما في زراعة المعلقات الخلوية لنباتات الباقلاء (3). ان تعريض المعلقات الخلوية للمعاملة الكهربائية مسبقاً انعكس ايجابيا على مباشرة خلايا المزرعة بأنقسامها مبكراً، فقد ذكرت احدى الدراسات ان هذه المعاملة شجعت بناء الحامض النووي DNA ثم انها زادت من معدلات الانقسامات التي تعاني منها هذه الخلايا (20)، واكدت دراسات اخرى ان المعاملة الكهربائية شجعت انقسام الخلايا كما حصل في تمايز كالس التبغ (21). ان استخدام مزارع المعلقات الخلوية تمثل اتجاهاً حديثاً في مجال التحول الحيوي للنباتات بأستخدام النواقل البكتيرية فقد اشارت العديد من الدراسات الى استخدام بلازميدات Ri في التحول الوراثي لنباتات الباقلاء، وتعزى الزيادة الحاصلة في تكوين بادئات الكالس الناتجة من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع هذا البلازميد الى زيادة تضاعف DNA (22). فضلاً عن ان مجموعة من المصادر اشارت الى قدرة الخلايا المفردة في المعلقات الخلوية على الانقسام بمعدل اكثر مما في مزارع الكالس (23). ومن المحتمل ان يكون مزج الخلايا بالبلازميد plasmid-DNA عاملاً مشجعاً في بناء منظمات النمو مما يترتب عنها زيادة المحتوى الداخلي للهرمونات في هذه الخلايا، وهذا قد يكون مؤشراً لاستعداد الخلايا للتحول وراثياً (24). ان الزيادة الحاصلة في نسب الانقسامات وتكوين المستعمرات الخلوية وانتاج الاعداد الكبيرة من بادئات الكالس المتكونة من زراعة مزيج المعلق الخلوي مع تراكيز معينة من هذا البلازميد قد تعزى الى تأثير T-DNA من البلازميد واقترانه بالذخيرة الوراثية لخلايا

المعلقات الخلوية (25). وهذا قد يفسر اكتساب هذا الكالس اللون الاخضر الغامق مقارنة بنظيره المستحدث من المعلقات الخلوية فقط (26) ولعل ذلك كان بسبب حصول زيادة في الانتقال القطبي للاوكسينات في الخلايا المعاملة (27). وبهذا قدمت الدراسة الحالية بروتوكولاً مفصلاً عن انشاء المعلقات الخلوية وزراعتها وتوظيفها للتعرف الى تأثيرات المعاملة الكهربائية ودورها في نمو الكالس باعتماد تقانة الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع بلازميدات Ri المعزولة من البكتريا.

المصادر

1. Al-Mallah, M. K. and Al-Nemi, A. N., J. Educ. & Sci., 25:41-49 (1996).

2. Oswald, T. H. ; Smith, A. E. and Phillips, D. V., Physiol. Plant. 39: 129-134 (1977).

3. الملاح، مزاحم قاسم؛ زيدان، سهلة محمد. مجلة التربية والعلم. 2: 35-47 (2004).

4. الملاح، مزاحم قاسم؛ الزبيدي، لمى ذنون (قيد النشر)(2004)

5. Dixon, R. A., Plant Cell Culture, A Practical Approach. IRL. Press. Oxford. U.K (1985).

6. Purohit, S. S., Agricultural Biotechnology P. G. Department of Botany Dungar College, Bikaner, India (1999).

7. Cocking, E. C. and Davey, M. R., Plant Physiol., 133: 547-459 (1988).

8. Kifle, S. ; Shao, M. ; Jung, C. and Cai, D., Plant Cell Repts., 18: 514-519 (1999).

9. Al-Mallah, M. K. and Yassen, J. M., J. Biotech. Res., 4(2):106-116 (2002).

10. Zhang, J. ; Li, T. and Deng, Y., J. Am. Soc. 122: 300-305 (1997).

11. Hansen, G. and Wright, M. S., Plant. Trends Plant Sci., 4 : 226-231 (1999).

12. Murashige, T. and Skoog, F. Physiol. Plant., 15: 473-497 (1962).

13. البياتي، فراس عباس. التغيرات الوراثية في بذور ونباتات وكالس فول الصويا *Glycine max* (صنف اباء) باستخدام اشعة كاما وتأثيراتها على المحتوى البروتيني ونسبة الزيت. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل (2002).

14. Morgan, A. J.; Cox, P. N.; Turner, D. A.; Peel, E.; Davey, M. R.; Garthand, K. M. and Mulligan, B. J. Plant Sci. 49: 37-49(1987).

15. Brinboim, H. C. and Doly, J., Nucleic Acid Res., 7: 1513-1523 (1979).

16. النعمة، قتيبة شعيب. مجلة التربية والعلم، المجلد (17)، العدد (1) (2005).

17. Birkenhead, K. and Willmer, C. M., J. Exp. Bot. 37: 119-128 (1986)..

18. Al-Mallah, M. K., Invention of electroporator (Al-Jihad 1) and its applications in plant tissue culture. Patent system 3033. Office of standardization and quality control. (in Arabic) (2002).

19. البياتي، جميلة هزاع رشيد نجم؛ محمد، عبد المطلب سيد. مجلة علوم الرافدين، المجلد (16)، العدد (6): 210-217 (2005).

20. Michael, M. O. ; Bapat, V. A. and Schieder, O., Z. Pflanzenphysiol. Bd., 106: 173-177(1982).

21. Al-Mallah, M. K., Electroporation enhanced plant regeneration from the callus of *Nicotiana tabacum*. 2nd Arab Conf. Modern Biotech. 24-28 April, Amman, Jordan (1993).

22. Rech, E. L.; Ochatt, S. J.; Chand, P. K.; Davey, M. R.; Mulligan, B. J. and Power, J. B., Bio / Technol., 6: 1091-1093 (1988).

23. Anelia, I. and Trinh, T. H., Early events of direct somatic embryo formation from single cell in *Medicago truncatula* observed using green fluorescent protein. (Internet) (2000).

24. David, C. and Tempe, J., Plant Cell Repts., 7: 88-91 (1988).

25. Meyer, A. D.; Tempe, J. and Costantino, P., Plant Microbe Inter., 5: 1-39 (2000).

26. Droste; Annette, Bodanese and Helena, M., Plant Mol. Biol. Repts., 18: 5-9 (2000).

27. Goldsworthy, A. and Rathore, K. S., J. Exp. Bot., 36: 1134-1141 (1985).