الزراعة النسيجية لنبات اليانسون *Pimpinella anisum* L. خارج الجسم الحي

عبد الله نجم النعيمي سهام احمد محمود
قسم علوم الحياة – كلية التربية – جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2004/7/7 تاريخ القبول 2004/12/15

ABSTRACT

This study carried out the induction of callus from different explants (leaves, stems and roots) of the medicinal plant *Pimpinella anisum* by using MS medium which contained different concentrations of Benzyl adenin BA and Naphthaline acetic acid NAA. The results showed that MS medium with 2.0 mg/l BA and 1.0 mg/l NAA was the best medium for the induction and growth of callus. Regeneration of plants from the callus was obtained, specially from callus of leaves which gave the higher percentage, then followed by the callus of stems and roots. Also, the results showed the one step regeneration for all the callus in the MS medium which contained 1.0 mg/l for each of BA and NAA. The best medium for rooting was MS with 1.0 mg/l NAA.

الخلاصة

تناولت الدراسة الحالية استحداث الكالس من الاجزاء (الاوراق ، السيقان ، الجذور) لنباتات اليانسون *Pimpinella anisum* L. الطبية باستخدام وسط MS الصلب المجهز بتراكيز متباينة من منظمات النمو NAA و BA. وتبين ان وسط MS الصلب الحاوي 2.0 ملغم/لتر من البنزايل ادنين BA و 1.0 ملغم/لتر من نفثالين حامض الخليك NAA كان افضل الاوساط المستخدمة لاستحداث الكالس وادامته. واظهر كالس الاجزاء المختلفة لنباتات اليانسون قابلية عالية على التمايز وتكوين الافرع الخضرية في الوسط الزرعي ، اذ اعطى كالس الاوراق اعلى نسبة لتكوين الافرع الخضرية ، يليه كالس السيقان ثم الجذور. فضلاً عن حصول ظاهرة تكوين الافرع الخضرية بمرحلة واحدة One step regeneration ولجميع انواع الكالس وكان افضل وسط للتمايز هو وسط MS الحاوي 1.0 ملغم/لتر من كل

من BA و NAA ، وجذرت الافرع الخضرية في وسط MS الحاوي على 1.0 ملغم/لتر NAA.

المقدمة

يعد نبات اليانسون *Pimpinella anisum* L. من النباتات الطبية المهمة التابعة للعائلة المظلية Umbelliferae ، وهو معروف باستخدامه كتوابل غذائية ويستخدم بشكل واسع في الطب الشعبي ، ففي دول امريكا الجنوبية يستخدم نبات اليانسون كمقشع ومسكن ومضاد للتشنج (1).

وبالنظر للمشاكل والتأثيرات الجانبية للمواد الصيدلانية الكيميائية ، اعادت الدول المصنعة للادوية استخدام النباتات الطبية وبشكل متسارع (2) ، اذ اتجهت هذه الدول لدراسة الامكانيات بصورة علمية فأسست لها معاهد متخصصة تخرج اطباء يعالجون بالاعشاب بالرغم من توفر وسائل الطب الحديث فيها (3).

واليانسون نبات طبي تكمن اهميته في احتواء ثماره وبذوره على زيت طيار تزيد نسبته على 4% ويحتوي هذا الزيت الطيار على مادة انيثول Anethole بنسبة 80-90% من الزيت (4).

ويستعمل اليانسون في علاج السعال والحكة واكدت الابحاث والدراسات اهمية اليانسون واثره في زيادة معدل ادرار الحليب (5). ولليانسون استعمالات اخرى اذ يستعمل زيته في غسول ومعاجين الاسنان للحفاظ على صحتها. ويستخدم المستحلب (مغلي اليانسون) لتقوية جهاز الهضم عند المسنين ومعالجة المغص المعوي عند الاطفال وفي مقاومة نوبات الربو ولتقوية المبايض في سن اليأس ولتسهيل عملية الولادة وزيادة ادرار الحليب عند الرضع ، واستنشاق مسحوق اليانسون يشفي من الصداع ، ويستعمل زيته لابادة القمل وذلك بدلكه في فروة الرأس (6).

وتم التوصل الى ان الفعل التثبيطي لبعض النباتات ضد الاحياء المجهرية يكمن في زيوتها الاساسية ، اذ درست الفعالية التثبيطية لعدد من الزيوت المستخلصة من نباتات مزروعة في العراق مثل الثوم ، البصل ، الكراث ، الريحان ، النعناع ، اليانسون والزعتر على الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام وكذلك الفطريات (7).

وفي دراسة اخرى تم استخلاص زيت اليانسون (الانيثول Anethole) واختبار فعاليته التثبيطية ضد 13 نوع من الاحياء المجهرية واظهر المستخلص فعالية وتثبيط واسع ضد هذه الجراثيم (8) وفي نفس الدراسة تم اختبار تأثير الانيثول ضد خمسة انواع من الفطريات ووجد ان له تأثير مثبط ضد فطر *Aspergillus niger* بشكل اكثر وضوحاً من بقية الانواع.

وفي الاونة الاخيرة جرى اهتمام كبير بالنباتات الطبية ومنتجاتها الطبيعية ، ونظـــراً لاحتواء اليانسون على الزيوت الطيارة فهو من النباتات الطبية التي تناولتها بحوث الزراعـــة النسيجية والاكثار الخضري الدقيق (9) و (10).

وفي بحث اخر تم الاكثار الخضري الدقيق لـــ 13 نبات طبي من ضمنها اليانســـون والنعناع البلدي والفلفلي والشمر والشبنت وغيرها عن طريق زراعة الانسجة والتي شـــملت زراعة القمم النامية وقطع السيقان المشتقة من البادرات النامية في انابيب الاختبار من زراعة البذور وقد تم تكوين اعضاء خضرية Regeneration من كالس خمس نباتات من ضمنـــها اليانسون (11).

وبالنظر للاهمية الكبيرة لنبات اليانسون ، فقد اجريت العديد من البحـــوث المتعلقـــة بمكوناته الكيميائية ، وعن طريق زراعة الانسجة في الاوساط السائلة تم دراسة بناء العديـــد من المركبات الكيميائية لليانسون مثل فينايل الانين Phenylalanine وحـــامض الســـناميك Cinnamic acid وغيرها (12). وفي مجال التحول الوراثي هنالك دراسات عديـــدة منـــها دراسة تراكم الزيوت الاساسية في نبـــات اليانســـون المحـــول وراثيـــاً بواســـطة بكتريـــا *Agrobacterium tumefaciens* (13).

وهدف هذه الدراسة هو التعرف على استجابة اجزاء مختلفة مـــن نبـــات اليانســـون المحلي للزراعة النسيجية.

مواد وطرائق العمل

1.الاوساط الغذائية

حضر مختبرياً وسط MS (14) باذابة كافة مكوناته اذابة تامة في حجم مناسب مـــن الماء ثم اضافة السكروز (30 غم/لتر) والاكار (8 غم/لتر) واكمل الحجم النهائي الـــى لـــتر واحد ، وضبط الاس الهيدروجيني pH بحدود (5.8-6.0). وزع الوسط في دوارق زجاجية وغطيت فوهاتها وعقم الوسط بدرجة حرارة 121°م وضغط 1كغـــم/ســـم^3 لمـــدة 20 دقيقـــة باستخدام جهاز المعقام Autoclave واستخدم هذا الوسط لزراعة البذور واستحداث الكـــالس وتمايزه.

2.مصدر البذور وانتاج البادرات

استخدمت بذور اليانسون *Pimpinella anisum* L. التي تم الحصول عليـــها مـــن السوق المحلية وتم تصنيفها في كلية التربية – قسم علوم الحياة. عقمت البذور بغمرها فـــي

محلول من الماء المقطر وهايبوكلورات الصوديوم NaOCl تركيز 6% بمعدل (1حجم مادة معقمة: 2حجم ماء مقطر) ولمدة 10 دقائق (15). زرعت البذور المعقمة على سطح 20 مل من وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو في انابيب اختبار بمعدل بذرتين في كل انبوبة ، وحفظت العينات في الحاضنة بدرجة حرارة 25 ± 2م وظروف ظلام في الاسبوع الاول من الزراعة. بعد انباتها نقلت الى فترة اضاءة 16 ساعة ضوء في اليوم وبشدة اضاءة 2000 لوكس وتحت نفس ظروف الحاضنة اعلاه.

3.استحداث الكالس

استعملت النباتات السليمة النامية في ظروف معقمة وبعمر شهر واحد كمصدر للاجزاء النباتية Explants اذ تم احداث جرح في الاوراق الكاملة وقطعت السيقان والجذور بطول 1سم لكل منها باستخدام مشرط معقم وفي جو كامل التعقيم ، زرعت الاجزاء النباتية المعقمة في دوارق زجاجية حجم 100-125 مل والحاوية وسط MS المدعم بتراكيز مختلفة من السايتوكاينينات والاوكسينات والتي تضمنت استخدام بنزايل ادنين BA بتراكيز (0.0 ، 0.5 ، 1.0 ، 2.0 ملغم/لتر) مع نفتالين حامض الخليك NAA وبالتراكيز (0.0 ، 0.5 ، 1.0 و 2.0 ملغم /لتر) وتمت الزراعة بمعدل (10 قطع/جزء نباتي/معاملة).

4.تمايز الكالس

نقل الكالس المستحدث من قطع الاجزاء النباتية (السيقان ، الاوراق والجذور) بوزن (1غم/قطعة) على سطح 40-50 مل من الاوساط المخصصة للتمايز (وهي وسط MS الحاوي تداخلات من البنزايل ادنين BA بتراكيز 0.5 و 1.0 ملغم/لتر مع نفثالين حامض الخليك NAA وبالتراكيز 0.0 ، 0.56 و1.0 ملغم/لتر) وبمعدل (3 قطع/دورق) وحفظت العينات في الحاضنة في الظروف السابقة الذكر.

5.تجذير الافرع الخضرية وتكوين النباتات الكاملة

بعد تكوين الافرع الخضرية استئصلت هذه الافرع وازيل عنها بقايا الكالس وقطعت عند قاعدتها بواسطة مشرط حاد معقم ونقلت الى دوارق زجاجية حاوية وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو او MS الحاوي على NAA بتراكيز (0.1 ، 0.5 ، 1.0 ملغم/لتر) لغرض تجذيرها.

النتائج

اظهرت جميع الاجزاء النباتية المستأصلة من نباتات اليانسون في هذه الدراسة استجابة واضحة لاستحداث الكالس في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من منظمات النمو ، اذ اعطت قطع السيقان اعلى استجابة بلغت 66% تقريباً وبمدة تراوحت بين 15-21 يوماً ، في حين بلغت استجابة الاوراق 57% تقريباً على نفس الوسط وبفترة زمنية بلغت 20-30 يوماً. اما استجابة قطع الجذور فكانت منخفضة بشكل كبير وصلت الى 28% واستغرقت مدة زمنية طويلة تراوحت بين 30-35 يوماً.

والنسب المئوية المذكورة اعلاه تمثل معدل مجموع النسب المئوية الموجودة في الجداول (1) ؛ (2) و (3) على التوالي.

واظهرت نتائج زراعة قطع سيقان اليانسون على وسط MS الحاوي على تداخلات مختلفة من NAA و BA ان نسبة الاستحداث بلغت 100% في جميع الاوساط الحاوية على تداخلات كل من NAA و BA بالتراكيز 0.5 ، 1.0 و 2.0 ملغم/لتر. في حين تراوحت نسبة الاستحداث بين 10-50% في الاوساط الحاوية فقط على NAA او BA ، وبالتراكيز 0.5 ، 1.0 ، 2.0 ملغم/لتر ولم تظهر معاملة المقارنة الخالية من منظمات النمو أي تحفيز لاستحداث الكالس (الجدول 1).

كما اظهرت النتائج ان نسبة استحداث الكالس من قطع الاوراق على وسط MS الحاوي على تداخلات مختلفة من NAA و BA بلغت 100% (الجدول2). في حين لوحظ ان الوسط الحاوي على 0.5 ملغم/لتر من كل من NAA و BA اعطى نسبة استحداث 80% ، وانخفضت اكثر في غياب NAA من الوسط في حين لم تستجب اية قطعة في اوساط MS الخالية من منظمات النمو او الخالية من BA فقط.

واظهرت نتائج (الجدول 3) انخفاض نسبة استحداث الكالس من قطع الجذور في اوساط MS الحاوية على تراكيز متباينة من NAA و BA . ولوحظ ان الاوساط الحاوية على التراكيز العالية من NAA و BA (1.0 ، 2.0 ملغم/لتر) اعطت افضل نسب لاستحداث الكالس ، في حين لم تستجب قطع الجذور في الاوساط الخالية من منظمي النمو او احدهما.

الجدول (1): استحداث الكالس من قطع سيقان * نباتات اليانسون *Pimpinella anisum* L. في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من منظمات النمو.

منظمات النمو		عدد القطع المنتجة للكالس	النسبة المئوية للاستحداث
NAA ملغم/لتر	BA ملغم/لتر		
0.0	0.0	0	0
0.0	0.5	1	10
0.0	1.0	2	20
0.0	2.0	4	40
0.5	0.0	1	10
0.5	0.5	10	100
0.5	1.0	10	100
0.5	2.0	10	100
1.0	0.0	3	30
1.0	0.5	10	100
1.0	1.0	10	100
1.0	2.0	10	100
2.0	0.0	5	50
2.0	0.5	10	100
2.0	1.0	10	100
2.0	2.0	10	100

* عدد القطع المزروعة 10/معاملة.

الجدول (2): استحداث الكالس من قطع اوراق * نباتات اليانسون *Pimpinella anisum* L. في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من منظمات النمو.

منظمات النمو		عدد القطع المنتجة للكالس	النسبة المئوية للاستحداث
NAA ملغم/لتر	BA ملغم/لتر		
0.0	0.0	0	0
0.0	0.5	0	0
0.0	1.0	1	10
0.0	2.0	2	20
0.5	0.0	0	0
0.5	0.5	8	80
0.5	1.0	10	100
0.5	2.0	10	100
1.0	0.0	0	0
1.0	0.5	10	100
1.0	1.0	10	100
1.0	2.0	10	100
2.0	0.0	0	0
2.0	0.5	10	100
2.0	1.0	10	100
2.0	2.0	10	100

* عدد القطع المزروعة 10/معاملة.

الجدول (3): استحداث الكالس من قطع جذور * نباتات اليانسون *Pimpinella anisum* L. في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من منظمات النمو.

منظمات النمو		عدد القطع المنتجة للكالس	النسبة المئوية للاستحداث
NAA ملغم/لتر	BA ملغم/لتر		
0.0	0.0	0	0
0.0	0.5	0	0
0.0	1.0	0	0
0.0	2.0	0	0
0.5	0.0	0	0
0.5	0.5	0	0
0.5	1.0	2	20
0.5	2.0	5	50
1.0	0.0	0	0
1.0	0.5	1	10
1.0	1.0	6	60
1.0	2.0	10	100
2.0	0.0	0	0
2.0	0.5	2	20
2.0	1.0	8	80
2.0	2.0	10	100

*** عدد القطع المزروعة 10/معاملة.**

ومن الجدير بالذكر في نتائج هذه الدراسة ان وسط MS المدعم بـ (2.0 و1.0) ملغم/لتر BA و NAA على التوالي كان افضل الاوساط المستخدمة لاستحداث الكالس بدلالة نسبة الاستحداث (100%) للاجزاء النباتية الثلاث والوزن الطري للكالس الناتج مقارنة بالاوساط الاخرى. اذ بلغ وزن الكالس المستحدث من قطع الاوراق 2.0 غم والسيقان 1.6

غم والجذور 0.9 غم ، وتميز الكالس المستحدث من قطع الاوراق بلونه الاخضر البراق (الشكل1-1) ، وكالس السيقان والجذور بلونه الاخضر المائل الى الابيض (الشكل 1-2 و1-3) وكان قوام جميع انواع الكالس هشاً.

وقد رافقت مرحلة تكوين الكالس في وسط MS الحاوي 1.0 ملغم/لتر من كل من BA و NAA عملية تكوين الافرع الخضرية من الكالس وفي الوسط نفسه أي بمرحلة واحدة (الشكل 1-4 ، 1-5 و 1-6) للاوراق والسيقان والجذور على التوالي.

كما اوضحت نتائج اختبارات قدرة الكالس على التمايز وتكوين الافرع الخضرية في وسط MS المدعم بتراكيز متباينة من NAA و BA ان كالس الاوراق اظهر اعلى قابلية على تكوين الافرع الخضرية ، يليه كالس السيقان ثم الجذور الذي استغرق اطول فترة زمنية للتمايز (14-21) يوماً (الجدول 4).

الجدول (4): تكوين المجاميع الخضرية من تمايز كالس الاجزاء المختلفة لنباتات اليانسون *Pimpinella anisum* L. في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من منظمات النمو.

مزارع الكالس	وسط BA + NAA + MS		المدة الزمنية (يوم)
	عدد قطع الكالس * المستخدمة	عدد الافرع الخضرية المتكونة	
الاوراق	15	35	14-7
السيقان	15	20	14-7
الجذور	15	10	21-14

* 1غم كالس/قطعة/جزء نباتي

كما لوحظ من النتائج ان وسط MS الحاوي على 1.0 ملغم/لتر من كل من BA و NAA كان الافضل في تمايز كالس الاجزاء النباتية المستخدمة لنبات اليانسون مقارنة مع الاوساط الاخرى المستخدمة في هذه الدراسة (الجدول 5).

الجدول (5): قابلية الكالس * المستحدث من الاجزاء المختلفة لنباتات اليانسون *Pimpinella anisum* L. لتكوين الافرع الخضرية في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من NAA و BA.

منظمات النمو		عدد الافرع الخضرية المتكونة		
NAA ملغم/لتر	BA ملغم/لتر	كالس الاوراق	كالس السيقان	كالس الجذور
0.0	1.0	5	2	1
0.5	0.5	3	1	1
0.5	1.0	10	6	2
1.0	0.5	5	3	1
1.0	1.0	12	8	5

عدد قطع الكالس 3/معاملة.

وبالنسبة لتجذير الافرع الخضرية الناتجة من الكالس ، اظهرت النتائج صعوبة ذلك اذ ان تجذير الافرع الخضرية لم ينجح على وسط MS الخالي من منظمات النمو وكذلك على وسط MS الحاوي 0.1 او 0.5 ملغم/لتر NAA وانما حصل التجذير للافرع الخضرية فقط عند نقلها على وسط MS الحاوي على 1.0 ملغم/لتر NAA وتكونت نباتات كاملة (الشكل 1-7).

الشكل (1): تكوين نباتات جديدة من كالس الاجزاء المختلفة لنبات اليانسون *Pimpinella anisum* L.

1-1 مزرعة الكالس المشتق من قطع الاوراق على وسط MS الحاوي (2.0 و1.0) ملغم/لتر BA و NAA على التوالي.

2-1 مزرعة الكالس المشتق من قطع السيقان على وسط MS الحاوي (2.0 و1.0) ملغم/لتر BA و NAA على التوالي.

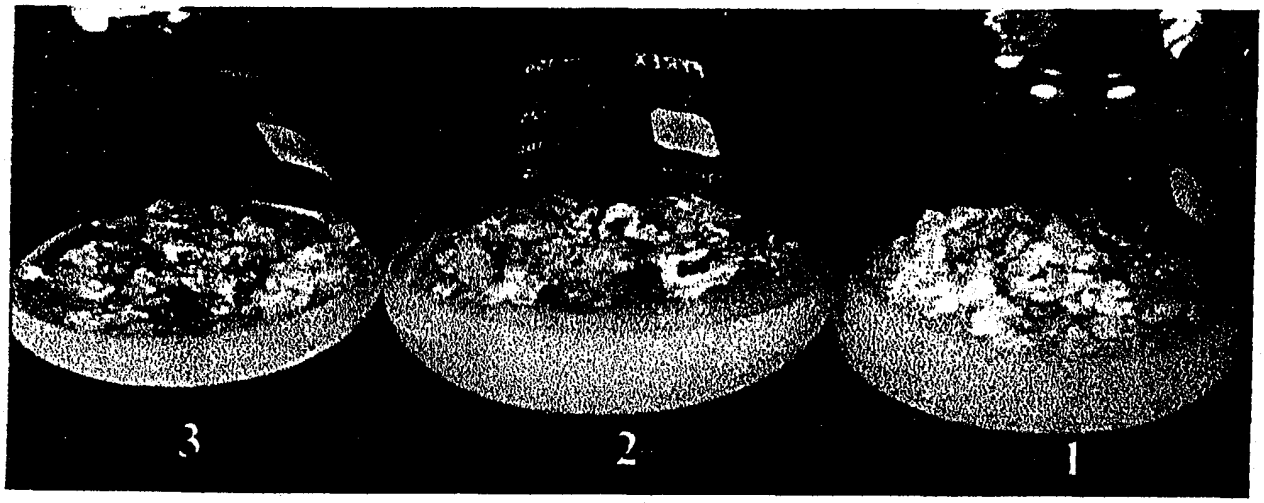
3-1 مزرعة الكالس المشتق من قطع الجذور على وسط MS الحاوي (2.0 و1.0) ملغم/لتر BA و NAA على التوالي.

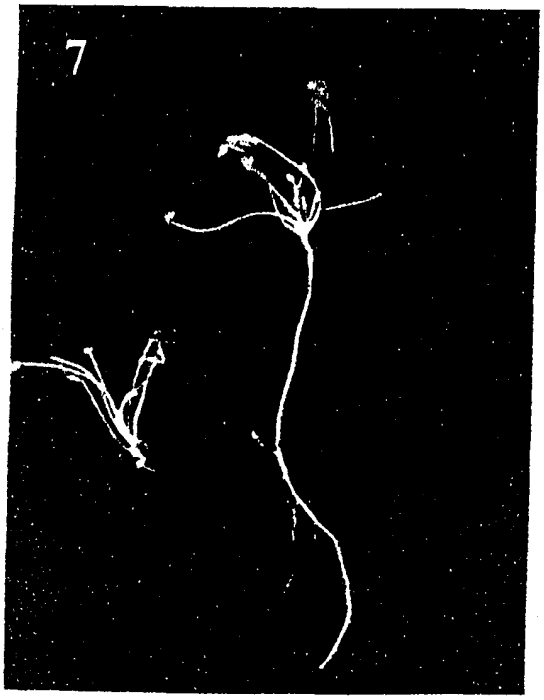
4-1 افرع خضرية متكونة من كالس الاوراق في وسط الاستحداث MS الحاوي 1.0 ملغم/لتر من كل من BA و NAA.

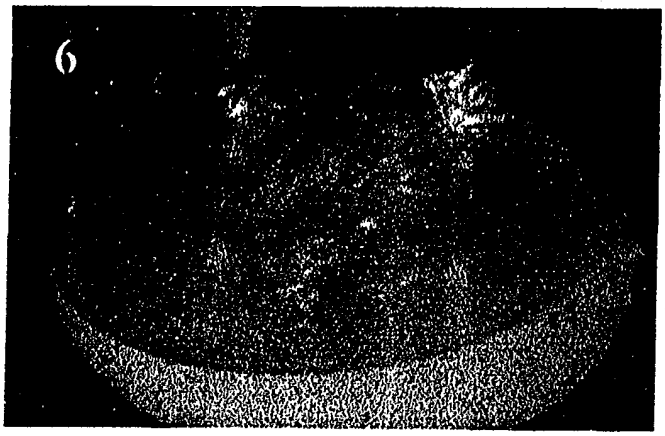
5-1 افرع خضرية متكونة من كالس السيقان في وسط الاستحداث MS الحاوي 1.0 ملغم/لتر من كل من BA و NAA.

6-1 افرع خضرية متكونة من كالس الجذور في وسط الاستحداث MS الحاوي 1.0 ملغم/لتر من كل من BA و NAA.

7-1 تجذير الافرع الخضرية المتكونة من الكالس في وسط MS الحاوي 1.0 ملغم/لتر NAA.







شكل (1) : استحداث وتمايز الكالس من أجزاء نبات اليانسون ***Pimpinella anisum*** **L**

المناقشة

اشارت نتائج الدراسة الحالية بصورة عامة الى الاستجابة الجيدة لنباتات اليانسون *Pimpinella anisum* L. لنظام الزراعة النسيجية متمثلة بنجاح الاجزاء الثلاثة (السيقان ، الاوراق والجذور) في استحداث الكالس. وقد ابدت قطع السيقان اعلى استجابة لاستحداث الكالس تلتها قطع الاوراق ثم الجذور ، وهذا يؤكد ان استحداث الكالس في نبات اليانسون يعتمد على نوع الجزء النباتي وعلى التوافق بين المحتوى الداخلي للاجزاء النباتية من هورمونات نباتية مع التراكيز المضافة من منظمات النمو الى الوسط الغذائي (16) و (17).

فضلاً عن الطاقة الكامنة للخلايا وعددها مما يدعم من معدلات انقسام الخلايا لتكوين الكالس (18).

وذكرت احدى الدراسات ان المحتوى الكلي للفينول والانيثول يحدد من اضافة البنزايل ادنين BA وثيديازورون Thidiazuron اللذان يحفزان تكوين الافرع الخضرية في الجذور المحولة وراثياً (19).

وبينت نتائج الدراسة الحالية القابلية العالية للكالس الناتج من قطع الاوراق والسيقان والجذور على التمايز واعادة تكوين الافرع الخضرية وهذا يتفق مع ما جاء في دراسة (11) والتي تناولت استحداث وتمايز كالس الاجزاء النباتية المختلفة لنبات اليانسون وعدد من النباتات الطبية.

واكدت النتائج ان تمايز كالس الاوراق جاء في المرتبة الاولى ثم السيقان فالجذور وقد يعزى ذلك الى استجابة هذا الكالس الى ظروف الوسط المستخدم واحتوائه على مستويات معينة من منظمات النمو مقارنة بباقي الاجزاء النباتية المستخدمة او قدرة خلاياه على التمايز (16) او ربما يعزى الى مصدر الكالس (20).

لقد اوضحت الدراسة الحالية القابلية العالية لقطع الاوراق والسيقان والجذور على تكوين الكالس وانتاج الافرع الخضرية في الوسط نفسه وبمرحلة واحدة One Step Regeneration دون الحاجة الى نقل الكالس الى اوساط التمايز وهذا يطابق ما جاء في دراسة حياوي على نباتات التبغ (15) ودراسة Salih و Al-Mallah على نباتات عنيب الذيب (21).

واشارت النتائج الى عدم امكانية تجذير الافرع الخضرية على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو وانما يحتاج الى اضافة الاوكسينات وهذا يطابق ما جاء في دراسة (22) على نبات الداتورا.

المصادر

1.White, A. Herbs of Equador ; Ediciones Libri Mandi: Quito, pp34-35 (1985).

2.حدادين ، موفق. الاعشاب الطبية . مجلة الدواء العربي. 5:1 (1999).

3.W.H.O, Monographs on selected medicinal plants. World Health Organization, Geneva (1999).

4.حسين ، فوزي طه قطب. النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها. مطبعة دار المريخ للنشـر ، الرياض (1981).

5.هيكل ، محمد السيد وعمر ، عبد الله عبد الرزاق. النباتات الطبية والعطرية كيمياؤهـــا – انتاجها – فوائدها. منشأة المعارف بالاسكندرية مركز الدلتا للطباعة (1977).

6.الكاتب ، يوسف منصور. تصنيف النباتات البذرية ، جامعة بغداد (1988).

7.Shareef, A.Y. Ph.D. Thesis, College of Science, University of Mosul, Iraq (1998).

8.Kabo, I ; Himejima, M. J. Agric. Food. Chem., 39, 2290-2292 (1991).

9.Bajaj, Y.P.S., Medicinal and aromatic plants II. Berlin, Springer-Verlag (1989).

10.Peter, KV. Indian-Journal of Agricultural Sciences, 68:8 Special Issue 527-532 (1998).

11.Sajina, A. ; Geetha, SP. ; Minoo, D. ; Rema, J. Calicut. India. 8:79-86 (1997).

12.Reichling, J. ; Martin, R. and Kemmerer, B. Plant. Cell, Tissue and Organ culture, 43:2, 131-136 (1995).

13.Salem, K. ; Charlwood, B. Plant Cell. Tissue & Organ Clture , 40:3, 209-215 (1995).

14.Murashige, T. and Skoog, F. Physiol. Plant. 15:473-797 (1962).

15.حياوي ، سهام احمد محمود. رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل (2001).

16.Hartmann, H.T. ; Kester, D.E. and Davies, F.T. Plant Propagation, Principles and Practices. 5th Ed. Prentice. Hall Inter. Limited, London, U.K. (1990).

17.Bela, J. ; Shetty, K. J. Food Biochem., 23(1):17-32 (1999).

18.Negrutui, I. ; Jacobs, M. and Dorina, C. Z. Pflanzen Physiol, 86:113-124 (1978).

19.Andarwulan, N. ; Shetty, N. J. Agric. food Chem., 47:4, 1776-1780 (1999).

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

21.Salih, S.M. and Al-Mallah, M.K. Dirasat Agricul. Sci. 27:64-71 (2000).

22.يونس ، اواب وعد الله. رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل (1997).