مزارع الكالس المشتقة من المعلقات الخلوية المعاملة كهربائياً لنباتات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. والمطمورة في قطرات الاكار تعبر عن طاقتها الكامنة

Callus Cultures derived from electrotreated cell suspension of *Dianthus caryophyllus* L. embedded in agar drops express their totipotency

سهلة محمد زيدان جميلة هزاع رشيد

كلية التربية / جامعة الموصل

المستخلص

انتجت مزارع الكالس الهش من أوراق بادرات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. المعقمة في وسط الاستحداث MS الصلب المدعم بإضافات 0.5 ملغم/لتر$^{-1}$ 2,4-D ثاني كلوروفينوكسي حامض الخليك و 0.1 ملغم/لتر$^{-1}$ (BA) من البنزايل ادنين . وأنشئت مزارع المعلقات الخلوية منه في وسط استحداث الكالس عينه بغياب الاكار سجلت كثافات هذه المزارع في الاسبوع الاول من عمرها 143 × 10^3 خلية /مل وتراوحت حيوية خلاياها 41-90% .عرضت مجموعة عينات من مزارع المعلقات الخلوية تمثل سبعة كثافات متباينة إلى ثلاثة معاملات كهربائية 300V/50sec ، 500V/100sec ، 700V/150sec . زرعت هذه العينات بطمرها في قطرات الاكار بأعتماد المزرعة الصلبة ـ السائلة . وبرهنت مزارع الكالس المشتقة من البادئات المشتقة من هذه المعلقات قدرتها على تكوين نباتات القرنفل متمثلة بتمايز الافرع الخضرية في الوسط وتجذيرها بسهولة .

Abstract

Callus cultures were produced from leaf, excised from axenic carnation, *Dianthus caryophyllus* L. seedling, on agar-solidified MS medium supplemented with 0.5 mgl^{-1} of 2,4-D and 0.1 mgl^{-1} of BA. Cell suspension was initiated in liquid MS medium containing the above growth regulators. This suspension reported the density of 143 × 10^3 cell /ml and its viability was ranged between 41-90%. Samples of cell suspension represents seven different densities were exposed to three electrotreatment 300v/50 msec, 500v/100msec. and 700v/150 msec. These electrotreated samples were cultured by embedding in to agar drops in solid- liquid cultures. Callus derived from cell suspension expressed their totipotency forming carnation plants.

المقدمة

يمثل الكالس الهش اساساً في إنشاء مزارع المعلقات الخلوية ، وعند اضافته إلى الوسط السائل وتحريكه تنتشر خلاياه في هذا الوسط مكونة مزرعة المعلق الخلوي .وذكر احد الباحثين ان مثل هذه الخلايا تمتلك طاقة كامنة فضلاً عن قدرتها في تصنيع مجموعة من المركبات المرتبطة بالنبات الكامل [1] .

ويميز المعلقات الخلوية النموذجية كثرة خلاياها المفردة وقلة الكتل الخلوية واظهارها معدلات عالية من الانقسامات الخلوية . ولهذا فان المعلقات الخلوية تمنح فرص حدوث انقسامات خلوية سريعة منتجة خلايا عديدة [2] . وظفت المعلقات الخلوية المشتقة من الكالس او البروتوبلاست في انتاج نباتات جديدة أو انتخاب اصناف مرغوبة [4,3] . تؤكد العديد من الدراسات ان المجال الكهربائي يحدث تغيراً في تركيب الاغشية البلازمية يترتب عنه تكوين فتحات مؤقته تزيد من نفاذيتها دخول الجزيئات المختلفة إلى داخلها [5] . وقد شجعت تمايز كالس التبغ [6] . من خلال حث النقل القطبي للاوكسين في الانسجة [7] . وذكرت بعض الدراسات ان تعريض المعلقات الخلوية لبروتوبلاست اوراق كل من نباتات فول الصويا *Glycine canescens* والعرموط *Prunns communis* وعنيب الذيب *Solanum nigrum* إلى جهد كهربائي يتراوح بين 250-1000 فولت ، حفزت انقسام خلاياه وتكوين المستعمرات الخلوية وزيادة تضاعف الحامض النووي DNA في بروتوبلاست عنيب الذيب *Solanum dulcamora* عند تعريضه لفولتيات تراوحت بين 250-1250 فولت [8] . ودعمها

الكلمات المفتاحية : المعلقات الخلوية ، القرنفل ، طاقتها الكامنة

بناء البروتينات . ووجدت دراسات اخرى ان هذه المعاملة شجعت نمو كالس عنيب الذيب *Solanum nigrum* وتمايزه مكونة اعداد كبيرة من النباتات التي امكن تجذيرها بسهولة وارتباط هذه التأثيرات بزيادة البروتين والكلوروفيل في الكالس المعامل مقارنة بالكالس غير المعامل (المقارنة) [9] . وبرهنت دراسة اخرى التأثير المشجع لهذه المعاملة لانقسامات خلايا المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان الباقلاء *Vicia faba* [10] . تهدف الدراسة الحالية إلى اكثار الكالس من البادرات الناتجة من زراعة المعلقات الخلوية والكشف عن قدرتها في اعادة تكوين النباتات .

مواد وطرائق العمل

انتاج البادرات المعقمة

عقمت بذور القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. (صنف محلي) سطحياً باستخدام هايبوكلورايت الصوديوم NaOcl [11] . زرعت البذور المعقمة على سطح 25 مل من وسط MS [12] . الصلب في قنانٍ حجم 100 مل بواقع 4 بذور/ وعاء . حفظت العينات في ظروف الظلام التام بدرجة حرارة 25 ± 2 م في غرفة الزرع لحين انباتها ثم نقلت إلى نظام الاضاءة التعاقبي (16 ساعة/8 ساعات ظلام) شدة الاضاءة 2000 لوكس. استخدمت البادرات الناتجة بعمر أربعة اسابيع مصدراً لقطع الاوراق لاستحداث الكالس منها. **إنشاء مزارع المعلقات الخلوية من كالس الأوراق**

وضع غرام واحد من كالس الاوراق الهش النامي في الوسط MS +0.5 ملغم/لتر 2,4-D + 0.1 ملغم/لتر BA [11] . بعمر 25 يوماً في دوارق زجاجية تحتوي 50 مل من وسط الاستحداث المشار اليه بحالته السائلة . حفظت المزارع في الحاضنة الهزازة (New Brunswick U.S.A) في ظروف ظلام تام ودرجة حرارة 28 ± 2م وسرعة دورانية 150 دورة/دقيقة مدة 24 ساعة. مررت المزرعة من خلال منخل بلاستيكي معقم 46 مايكروميتر (PGMG.Nott Univ., U.K.) واستقبلت الخلايا المفردة واكمل حجمها إلى 50 مل بإضافة الوسط نفسه . اعيدت المزارع إلى ظروف التحضين نفسها واديمت بوضعها بصورة مائلة داخل كابينة الزرع مدة 3- 4 ساعات للسماح بركود الخلايا . سكب الوسط القديم بعناية للحفاظ على استقرار الخلايا المترسبة واضيف حجم مناسب من الوسط نفسه إلى الخلايا المترسبة في الدورق [13] .

تقدير حيوية خلايا المعلقات الخلوية

اتبعت الطريقة المعتمدة في تقدير حيوية البروتوبلاست باستخدام صبغة Evan blue [14] . أخذ 0.1 مايكروليتر من العينة المصبوغة وتحميلها على شريحة الهيموسايتوميتر Hemocytometer . حسبت الأعداد الكلية للخلايا واعداد الحية (الغير مصبوغة) منها لتحديد حيوية الخلايا .

تعريض المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الاوراق للمعاملة الكهربائية

وضع واحد ملليتر من المزرعة الخلوية لكل من الكثافات 20 ,31, 56 , 78 , 82 , 120 ,143,169×10^3 خلية/سم^3 في الحجرة المعقمة بجهاز التحفيز الكهربائي ومن ثم ربطها بأقطاب الجهاز [15] . انتخبت عشوائياً مجموعة المعاملات 300v/50 mse و 500v/100mse و 700v/150mse فضلاً عن عينة المقارنة. وبعد الانتهاء من تعريض جميع العينات تمت زراعتها في المزارع الصلبة- السائلة كما سيرد لاحقاً.

زراعة المعلقات الخلوية المعاملة كهربائياً بطمرها في قطرات الاكار المتعددة

اخذ ملليتر واحد لكل من عينات المعلقات الخلوية المعاملة مسبقاً ومزجه جيداً مع ملليتر واحد من محلول 1.5% من الاكار السائل المعقم مسبقاً والموجود في حمام مائي بدرجة حرارة 40م . وزع المزيج على شكل قطرات متماثلة الحجم في قاعدة طبق بتري بلاستيكي قطر 9سم (Sterilin U. K.) بمعدل 8-10قطرات /طبق [16]. تركت هذه الاطباق مفتوحة داخل كابينة الزرع وبعد تصلبها اضيف إلى الطبق 4 ملليتر من الوسط السائل المستخدم في انتشاء مزارع المعلقات الخلوية . سدت الاطباق بأغطيتها وغلفت بالبارافيلم . حفظت العينات في ظروف 25م° واضاءة 700-800 لوكس بظروف الاضاءة المتعاقبة في غرفة الزرع ، فحصت العينات دورياً بالمجهر الضوئي لملاحظة مباشرة الخلايا المطمورة بأنقسامها الاول وانذاك بدأت ادامة هذه المزارع كل أربعة أيام حتى بزوغ بادئات الكالس من الاكار ورؤيتها بالعين المجردة . واشارت البيانات شكل (1) إلى العلاقة بين كثافات مزرعة المعلق الخلوي وحيويته طيلة فترة التحضين إلى وجود علاقة بارزة متناظرة بينهما .

إزالة ونقل البادئات المتكونة في القطرات وتكوين مزارع الكالس

ازيلت جميع بادئات الكالس المتكونة عند بلوغها حجما مناسباً وبزوغها من الاكار ونقلها كاملة بوساطة ملقط معقم [17] . إلى سطح 25 مل من وسط الاستحداث الصلب (MS +0.5 ملغم/لتر 2,4-D+ 0.1 ملغم/لتر BA) في دورق زجاجي حجم 100سم^3 وبمعدل 3-4 بادئات / دورق . تمت ادامتها شهرياً للحصول على مزارع من الكالس.

تمايز كالس المعلقات الخلوية المعامل كهربائياً

وضعت قطع الكالس بوزن غرام واحد في دورق زجاجي حجم 100سم^3 حاوٍ 25 سم^3 من وسط التمايز الصلب MS + 0.06 ملغم/لتر IAA و 1.0 ملغم/لتر BA [18] . باشرت قطع الكالس بعد اسبوعين من زراعتها باعطاء نموات خضرية صغيرة بطول 2سم عليها 2-3 ورقة صغيرة بعد 25 يوماً من الزراعة وتطورت إلى فروعاً خضرية تراوحت اطوالها 2-8 سم بعد 45 يوماً من الزراعة . استؤصلت هذه الافرع من قواعدها بوساطة مشرط حاد معقم ونقل كل فرع وغرست قاعدته بصورة قائمة في وسط التجذير MS الصلب الخالي من منظمات النمو[4] . حفظت العينات في الظروف السابقة نفسها .

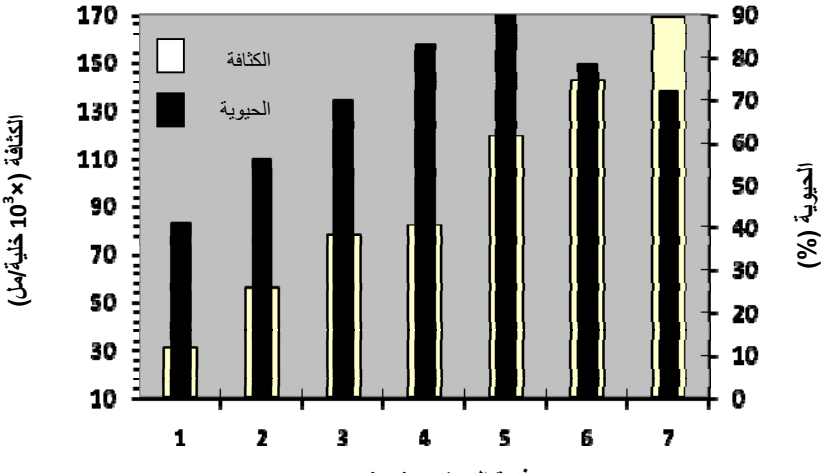
النتائج

تكوين مزارع كالس الاوراق

عبرت قطع الاوراق المستأصلة من بادرات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. المعقمة بعمر أربعة اسابيع عن طاقتها الكامنة وتكوينها الكالس في الوسط MS الصلب المدعم باضافة 0.5 ملغم/لتر من الاوكسين 2,4-D و 0.1 ملغم/لتر من السايتوكاينين BA وبلغت نسبة الاستحداث 80% في حين فشلت قطع الاوراق في تكوينه في الوسط MS0 واتصف طراز الكالس المتكون على هذا الوسط ببنيته الهشة ولونه الاخضر .

توظيف الكالس الهش في تكوين المعلقات الخلوية

أظهر الوسط MS0 السائل بكامل قوته التركيبية المدعم باضافة 0.5 : 0.1 ملغم/لتر من 2,4-D : BA على التوالي تأثيراً مشجعاً في بناء مزارع خلوية متجانسة اغلبها خلايا مفردة وقليل من الكتل الخلوية وبلغت كثافتها 31×10^3 خلية والتي اعتبرت كثافة الانشاء في هذه المرحلة. وتوالت انقسامات الخلايا طوال فترة عمرالمزرعة وبلوغ كثافتها القصوى 169×10^3خلية/سم^3 في يومها السابع،وكانت حيويتها 72% شكل (1)



شكل (1): العلاقة بين كثافة وحيوية المعلق الخلوي المشتق من كالس القرنفل *Dianthus caryophyllus L.* في وسط MS السائل + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.1 ملغم لتر$^{-1}$ BA

زراعة المعلقات الخلوية غير المعرضة والمعرضة للمعاملة الكهربائية بطمرها في قطرات الاكار المتعددة

أفرزت نتائج زراعة كثافات متباينة من المعلقات الخلوية ، التي سبق تعريضها للمعاملات الكهربائية، في قطرات الاكار تحمّلها لمجموعة الفولتيات المنتخبة بدلالة دخولها في انقساماتها الخلوية . فقد باشرت بانقسامها الاول بعد يومين من زراعتها في الوسط وواصلت انقسامها الثاني بعد يومين من حدوث الانقسام الاول اعقبها

ظهور المراحل ثلاثية ورباعية للخلية بعد 7 أيام من الزراعة. وعبرت هذه الخلايا عن طاقتها باستمرار انقساماتها وتكوينها المستعمرات الخلوية خلال اسبوعين من بدء الزراعة. وتطورت هذه المستعمرات بعد 20 يوماً اخرى منتجة اعداد من البادئات الدقيقة الحجم من الكالس التي أمكن ملاحظتها بالعين المجردة بعد زيادة احجامها متحولة إلى قطع صغيرة من الكالس ذو اللون الاخضر الفاتح . وادى تعريض المعلقات الخلوية بكثافة 169 ×10^3خلية/مل للمعاملة 300v/50mse إلى زيادة اعداد المستعمرات الخلوية المتكونة وشجع تكوين بادئات الكالس جدول (1) .

واوضحت النتائج عن تفوق الكثافة 78×10^3خلية/سم^3 من المعلقات الخلوية المعرضة للمعاملة 500v/100mse عن بقية المعاملات في الأعداد الكلية للمستعمرات الخلوية وبادئات الكالس المتكونة جدول(2).

جدول (1): تأثير الكثافات المزروعة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس اوراق القرنفل *Dianthus caryophyllus* L التي سبق تعريضها للمعاملة 300v/50mse في تكوين المستعمرات الخلوية وبادئات الكالس في قطرات الاكار

كثافة المعلق الخلوي(×10^3 خلية/سم^3)	الأعداد الكلية				بادئات الكالس (%)
	القطرات المزروعة	المستعمرا ت المتكونة	للقطرات المستحدثة للكالس	لبادئات الكالس المتكونة	
20*	15	90	9	88	60
31	25	117	18	96	72
56	14	122	11	102	79
78	18	143	13	112	72
82	16	178	10	150	63
120	15	260	12	198	80
143	17	210	12	153	71
169	16	320	10	162	63

- **المقارنة لم تعرض للمعاملة الكهربائية**

جدول(2): تأثير الكثافات المزروعة من المعلقات الخلوية المشتقة من اوراق القرنفل .*Dianthus caryophyllus* L التي سبق تعريضها للمعاملة 500v/100mse في تكوين المستعمرات الخلوية وبادئات الكالس في قطرات الاكار

كثافة المعلق الخلوي (×10^3 خلية/سم^3)	الأعداد الكلية				بادئات الكالس (%)
	القطرات المزروعة	المستعمرات المتكونة	للقطرات المستحدثة للكالس	لبادئات الكالس المتكونة	
20 *	12	74	8	66	67
31	14	275	11	163	79
56	18	322	13	182	72
78	11	408	10	299	90
82	14	160	10	158	71
120	26	175	18	122	69
143	19	257	13	108	68
169	15	178	10	166	67

*** المقارنة لم تعرض للمعاملة الكهربائية**

وتظهر نتائج الجدول نفسه ان الكثافتين 31 , 56 × 10^3 خلية/سم^3 شجعت تكوين اعداد من المستعمرات مقارنة بالكثافات الأخرى مع تفوقها في اعداد البادئات المتكونة فضلاً من اعدادها التي تطورت بعد 28 يوماً من الزراعة إلى قطع الكالس .

اشارت نتائج تعريض الكثافات المختلفة من المعلقات الخلوية للمعاملة 700v/150mse عن دعمها تكوين بادئات الكالس في قطرات الاكار جدول (3) وتفوقت الكثافة 78 × 10^3 خلية/سم^3 في اعداد المستعمرات الخلوية والبادئات الناتجة منها ظهورها مبكراً إذ استلزمت 20 يوماً قياساً بالكثافتين 82×10^3 , 120× 10^3خلية/سم^3 .

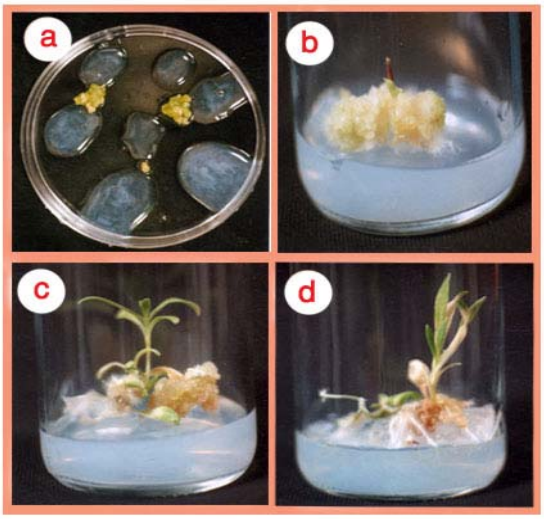
جدول (3): تأثير الكثافات المزروعة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس اوراق القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. التي سبق تعريضها للمعاملة 700v/500mse في تكوين المستعمرات الخلوية وبادئات الكالس في قطرات الاكار

كثافة المعلق الخلوي (10^3) خلية/سم^3)	الأعداد الكلية				
	القطرات المزروعة	المستعمرات المتكونة	للقطرات المستحدثة للكالس	لبادئات الكالس المتكونة	بادئات الكالس (%)
20 *	14	97	8	77	57
31	12	140	8	110	67
56	24	169	18	113	75
78	22	327	18	150	82
82	15	300	11	198	73
120	22	320	17	212	77
143	18	185	12	88	67
169	14	120	10	75	71

* المقارنة لم تعرض للمعاملة الكهربائية

تمايز كالس المعلقات الخلوية المشتقة من أوراق القرنفل

اظهرت النتائج نجاح نقل بادئات الكالس المتكونة من زراعة المعلقات الخلوية التي سبق تعريضها للمعاملة الكهربائية في قطرات الاكار شكل(2-a) وتكوينها لمزارع الكالس النموذجية شكل(2-b) . وبينت تجارب نقل قطع الكالس من مزرعة هذا الكالس إلى وسط التمايز الصلب MS + 0.06 ملغم/لتر IAA + 1.0 ملغم/لتر BA قدرته في تكوين الافرع الخضرية خلال اسبوعين بمعدل2 – 3 فروع/قطعة كالس وبلغ معدل طول الافرع 4سم وتراوح عدد الاوراق التي تحملها 2- 6 ورقة شكل(2-c) واستمر نمو الافرع الخضرية وتطورها إلى افرع كاملة بعد شهرين على تمايزها . وتمكنت الافرع الخضرية الفتية المستأصلة من التجذير بسهولة عند غرسها في وسط MS0 وتكوينها لمجموعة جذرية مناسبة تضم في معدلاتها 4 جذور/فرع خضري وبلغت اطوالها 3سم /جذر شكل(2-d) وتمت اقلمتها ونقلها إلى التربة بنجاح .



شكل (2): تكوين نباتات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. من كالس المعلقات الخلوية المزروعة

a) بادئات الكالس الناشئة من المعلقات الخلوية للاوراق المعاملة كهربائياً والمطمورة في قطرات الاكار المتعددة .
b) مزرعة كالس الاوراق في (A) . النامي في وسط MS الصلب + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.1 ملغم لتر$^{-1}$ BA
c) تمايز كالس المعلقات الخلوية المعاملة كهربائياً إلى افرع خضرية في وسط MS + 0.06 ملغم لتر$^{-1}$ و 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA
d) تجذير الافرع الخضرية في وسط MS0 والحصول على نباتات كاملة

المناقشة

ان مزارع المعلقات الخلوية في هذه الدراسة وفّرت نظاماً بيولوجياً مناسباً لمتابعة سلوك الخلايا في انقساماتها وتكوينها للمستعمرات الخلوية [19]. ان كثرة الخلايا المفردة في مزارع المعلقات الخلوية الناتجة من الكالس تعزى إلى البنيه الهشة للكالس وشجع توفر الاحتياجات الغذائية وملائمة منظمات النمو المضافة دخول خلاياها في الانقسام عند زراعتها في قطرات الاكار ، ومجموعة هذه المراحل اكدتها احدى الدراسات التي تناولت إنشاء زراعة المعلقات الخلوية لنبات القرنفل في قطرات الاكار المتعددة [4]. ان التعريض المسبق لمزارع المعلقات الخلوية للمعاملة الكهربائية انعكس ايجابياً على مباشرة الخلايا المكونة لها بانقسامها مبكراً ومن المحتمل ان يفسر هذا التأثير الايجابي إلى تشجيع بناء الحامض النووي DNA وكذلك بناء البروتين في هذه الخلايا كما حصل في نباتات *Solanum dulcamara* [9]. وترتب عن زيادة بناء الحامض النووي DNA زيادة في معدلات الانقسامات التي تعاني منها الخلايا كما في نبات *Trifolium resupinatum* [20] .

وأكدت دراسات متعددة ان تعريض مجموعة خلايا او مزارع كالس بعض الانواع النباتية إلى مجموعة متباينة ان المعاملات الكهربائية شجعت تمايز كالس التبغ [6]. وكالس الباقلاء [10]. وكالس عنيب الذيب [9]. ان وجود علاقة بين كثافة المعلقات الخلوية ونسب تكوين بادئات الكالس يعد عاملاً مهماً في مسارات الانقسامات الخلوية وعاملاً محدداً لاعداد المستعمرات الخلوية المتكونة وما يتطور منها إلى بادئات وعززت عملية التعويض لفولتيات معينة مسارات انقسامات الخلايا وهذا يكمن كما ذكر سابقاً في زيادة بناء الحامض النووي والبروتين في الخلايا المعرضة واللذان يعدان من متطلبات حدوث الانقسام الخلوي [21]. ان احتفاظ الكالس المتكون من المعلقات الخلوية بقدرته على التمايز وتكوين النباتات بسهولة قد يمثل احدى امكانيات التغلب على صعوبة او عدم تمايز بعض انواع الكالس المشتق من الاجزاء النباتية لبعض الأنواع [22].

ان طريقة زراعة خلايا المعلقات الخلوية بتقنية قطرات الاكار[1]. بوجود منظمات النمو 2,4-D و BA كان لها تأثيرات واضحة في حيوية الخلايا واستمرارها بالانقسامات وصولاً إلى تكوين بادئات الكالس ، ويبدو واضحاً نجاح الكالس المشتق من المعلقات الخلوية في تمايزه واظهر قدرته الواضحة عند نقله إلى اوساط MS المدعمة IAA و BA في تكوين الافرع الخضرية والحصول على النباتات من هذا الكالس [22]. في الحصول على نباتات القرنفل في تمايز الكالس النامي في سط MS الصلب الحاوي على الفحم المنشط Activated Charcool و 2.0 ملغم/لتر kin و 0.5 ملغم/لتر NAA التي جذرت في وسط MS الصلب المحتوي على 0.5 – 0.2 ملغم/لتر IBA.

المصادر

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

2. Engvild, K. C. (1972). Callus and cell suspension culture of Carnation. Physiol. Plant. 26: 62-66.

3. Larkin, P. J. and Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal varetion anovel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.

4. Thakur, M., Sharma, D. R. and Sharma, S. K. (2002). *In vitro* selection and regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium Oxysporum* dianthi. Plant Cell Rep. 20: 825- 828.

5. Joersbo, M. and Brunstedt, J. (1991). Electroporation: Mechanism and transient expression, stable transformation and biological effects in plant protoplasts. Physiol. Plant. 81:256-264.

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

7. Goldsworthy, A. and Rathore, K. S. (1985). The electrical control of growth in plant tissue cultures the polar transport of auxin. J. Exp. Bot. 36: 1134 – 1141.

8. Chand, P. K., O Chatt, S. J., Rech, E. L., Power, J. B. and Davey, M. R. (1988). Electroporation stimulate plant Regeneration from protoplasts of woods medical species *Solanum dulcamara* L. J. Exp. Bota. 39: 1267 - 1274.

9. AL-Mallah, M. K. and Salih, S. M. (2003). Electroporation increased growth of callus, regeneration capability and protein content of *Solanum nigrum* L. J. Plant Biology Special issues 14: 35 - 42.

10. الملاح ، مزاحم قاسم وزيدان ، سهلة محمد . (2004) . تقنية قطرات الاكار المتعددة في انتاج النباتات من زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان الباقلاء . مجلة التربية والعلم . المجلد (16): العدد 2.

11. النزال ، فراس حميد. (2005) . استحداث وتمايز كالس القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. وتأثير المركبات الفينولية المستخلصة منه على فطريات الذيول الفيوزارمي ، رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل .

12. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Planta. 15: 473-497.

13. Davey, M. R. and Anthony, P. (2010). Plant Cell Culture, essential Tool.

14. Power, J. B., Davey, M. R., Mclellan, M. and Wilson, D. (1989). Laboratory Manual Plant Tissue Culture. PGMG Univ. Nottingham.

15. AL-Mallah, M. K. (2002). Invention of electroporation (AL - Jihad 1) and its applications in plant tissue culture. Patent System 3033. Office of Standardization and quality control.

16. محمد ، عبد المطلب سيد و البياتي ، جميلة هزاع رشيد. (2007) . الاقصى سايتوكاينينات عراقية محضرة مختبرياً بديلاً ناجحاً عن القياسية في استحداث مزارع الكالس والمعلقات الخلوية لنبات الخس (براءة اختراع) رقم 3223 .

17. رشيد ، جميلة هزاع وزيدان ، سهلة محمد. (2011) . تأثير تعريض المعلقات من كالس سيقان القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. للامواج فوق السمعية في الانقسامات الخلوية وتكوين بادئات الكالس بطمرها في قطرات الاكار المتعددة. المؤتمر العلمي الثاني لعلوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل .

18. زيدان ، سهلة محمد ، رشيد ، جميلة هزاع والنعمة ، قتيبة شعيب. (2006). تكوين نباتات القرنفل في الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية بطريقة الطمر في قطرات الاكار المتعددة. مجلة التربية والعلم ، المجلد 19 ، العدد 1: 76-84 .

19. Ruffoni, B., Massabo, F. and Volpi, L. (1992). Suspension cultures of *Dianthus caryophyllus* cells. Acta Horticulture, 1(34).

20. Grosshoff, P. M. (1980). *In vitro* culture of white clover: callus, suspension protoplast culture, and plant regeneration. Bot. Goz. 141: 157-164.

21. Gupta, H. S., Rech, E. L., Cocking, E. C. and Davey, M. R. (1988). Electroporation and heat shock stimulate division of protoplasts of *pennisetum squamulatum*. Plant physiol. Vol. 133: 457- 459.

22. Hartman, H. T., Kaster, D. E., Davis, F. T. and Genever, R. L. (2002). Plant propagation principles and practices. Printice Hall. New Jersey, U. S. A.