الكشف عن التأثير الوراثي للمطفر الكيمائي نايتروزوجواندين في الكالس الناشئ من ألأجنة الناضجة لنبات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris*

The genetic effect of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine on callus induced from mature embryos of beans *Phaseolus vulgaris*

ستار عبد الله شلاهي **زهرة نوري الحطاب***
مركز بحوث التقنيات الإحيائية/ جامعة النهرين
* وزارة العلوم و التكنولوجيا

Sattar A. Shlahi **Zahra N. Al- Hattab***
Bio-technology Research Center/ Al- Nahrain University
*Ministry of Science and Technology

الملخص

نفذ البحث لدراسة تأثير المطفر الكيمائي نايتروزوجواندين NTG في كروموسومات نسيج الكالس الناشئ من أجزاء الجنين الناضج للفاصوليا صنف Harvester. إذ عوملت البذور بتوليفات مختلفة من المطفر و بتركيزين 0.2،0.4 ملمولر مع نسب مختلفة من الكحول الاثيلي فضلا عن السيطرة لمدة 24 ساعة. استخدم الوسط الغذائي MS المزود بـ 0.5 ملغم. لتر^{1} من البنزيل أدينين (BA)، و 1 ملغم. لتر^{1} من أندول حامض الخليك (IAA) و 100 ملغم. لتر- ^{1} من كل من متحلل الكيزين، الكلايسين، الاسبرجين، التايروسين والاينوسيتول لنشوء نسيج الكالس. استخدمت ثلاث محاليل للمعاملة التمهيدية هي 1، 2-بنزين ثنائي الكلوريد، وبارا – بنزين ثنائي الكلوريد ومحلول الكولشسين كما استخدمت طريقتين لتصبغ الكروموسومات المحضرة من خلايا قمم الجذور النامية وخلايا نسيج الكالس الناشئ من الأجنة. أظهرت النتائج أن أفضل المحاليل للمعاملة التمهيدية هو بارا - بنزين ثنائي الكلوريد ولكلا نوعي الخلايا، في حين كانت أفضل صبغة بالنسبة لخلايا الجذور هي صبغة الاسيتو أورسين، بينما لم تلق هذه الصبغة النجاح المنشود عند تجربتها مع خلايا الكالس وإنما كانت صبغة الفولكن هي الأفضل لتصبغ كروموسومات خلايا الكالس. كما أظهرت نتائج الفحص الخلوي أن عدد كروموسومات نبات الفاصوليا هو 22 كروموسوم عند تحضير الشرائح من قمم الجذور(السيطرة)، في حين احتوت خلايا الكالس على أعداد مختلفة من الكروموسومات عند تحضير الشرائح من نسيج الكالس سوءا المعامل بالمطفر أو غير المعامل. إذ كانت أعلى نسبة خلايا ذات العدد الكامل من الكروموسومات 96% لنسيج الكالس غير المعامل بالمطفر في حين انخفضت إلى 60% لنسيج الكالس المعامل بتوليفة (0.4مطفر +4 % كحول اثيلي). وكذلك أظهرت النتائج وجود تضاعف لعدد الكروموسومات في اغلب المعاملات إلا التوليفات الحاوية على الكحول.

الكلمات المفتاحية: طفرة وراثية، أعداد الكروموسومات، الاسيتو أورسين فولكن، كولشسين.

Abstract

This research was conducted to study the effect of the chemical mutagen N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)on the chromosomes of callus induced from mature bean embryos, Harvester cultivar. Seeds were treated with 0.2 or o.4 mM of the mutagen that mixed with different percentages of ethanol for 24 hrs. Calli were induced on MS medium in the presence of 0.5 mg/L of Benzyl adenine (BA), 1 mg/L Indole acetic acid (IAA) and 100 mg/L from each of Casein hydrolysate, Glycine, Asparagine, Tyrosine, and Myo-Inositol. Samples were pretreated with 1, 2- benzene dichloride, Para –dichlorobenzene, or Colchicine. Two different staining methods were used to stain the chromosomes from root tips and calli.The results showed that Para –dichlorobenzene is the best pretreatment for both root tips and callicells. However, the stain acetoorcein was the best for the root tips while Feulgen stain was the best for calli cells. Chromosome count showed that there were 22 chromosomes in all the cells of bean root tips (control). While a wide range of chromosome numbers were obtained from calli cells with or without mutagen treatment. Ninety six percent of the non treatedcalli gave the normal number of chromosomes while only 60% of calli treated with (0.4 mM+4% ethanol) gave the normal number of chromosomes. Calli cells from all the treatments showed chromosome multiplication except in the presence of ethanol.

Key words: Mutation, chromosomes, Acetoorcein, Feulgen, Colchicine

المقدمة

يعد مطفر النايتروزوكواندينN-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG or NTG) من أهم المطفرات الكيميائية المعروفة بفعاليتها القوية لحد ألان. ويعتمد النشاط التطفيري للـ NTG في النباتات الراقية على الـ pH لمحلول التطفير، إذ تظهر سمية الـ NTG وتأثيراتها لكلاستوجينية (Clastogenics) عند الرقم الهيدروجيني 4.4، وليس لهأي تأثير في الأوساط القاعدية. كما تنخفض قدرته السمية والتطفيرية بوجود الضوء في حين تزداد بارتفاع درجة الحرارة [1]. وقد أضيف الـNTGإلى المزارع النسيجية لمقارنة تأثيراته التطفيرية على البروتوبلاست الأحادية)ProtoplastsHaploid والثنائية Diploid Protoplasts في كل من الداتورة والبيتونيا ووجد أن معدلات البقاء للبروتوبلاست الأحادية في كلا النوعين انخفضت أسيا (Exponentially) مع ازدياد جُرع الـ NTG، أما البروتوبلاست الثنائية فقد أظهرت مقاومة بقاء أعلى من الأحادية في الجرع العالية [2]. كذلك تم الحصول على مستعمراتٍ مقاومة للفالين في بروتوبلاست التبغ عند معاملتها بالـ NTG[3]. في حين إن النباتات التي تم الحصول عليها من متوك التبغ المعومة فوق محلول الـ NTG لم تختلف في أشكالهاالمظهرية [4].

يهدف البحث الحالي الكشف عن التأثير الوراثي للمطفر الكيمائي الـNTG في نشوء الكالس و محتواه الوراثي (الكروموسومات) من أجزاءالأجنة الناضجة لنبات الفاصوليا وقدرته على البقاء.

المواد و طرائق العمل

استخدمت بذور الفاصوليا الناضجة الجافة صنف Harvester. إذ عقمت البذور بالطريقة الموصوفة من قبل [5] ثم تركت في الماء المقطر (السيطرة) أو محلول معاملة التطفير لمدة 24 ساعة في الظلام وبدرجة حرارة الغرفة. بعدها أزيل غلاف البذور وفصلت السويقة الجنينية ثم زرعت على الوسط الغذائي.

استخدم الوسط الغذائيMS[6] مضافاً إليه 30غرام\ لترسكروز، 100 ملغم\ لتر من كل من مايواينوسيتول والكلايسين والتايروسين والاسبرجين ومتحلل الكيزين (Casein Hydrolysate)، 0.5 ملغم\ لتر من البنزيل أدينين(BA)، و 1ملغم\ لتر من الأندول حامض ألخليك(IAA) ،0.6% أجار. زرعتالسويقة الجنينية من 100 بذرة لكل معاملة بواقع 10\ طبق بتري، وضعت الزروعات في غرفة الحضن وبدرجة حرارة (2±23) م وبتعاقب ضوئي 16ساعة يومياً وشدة إضاءة 1000 لوكس. بعد مرور أسبوعين على نشوء الكالس حسبت نسبة البقاء للأجزاء المزروعة، ثم اجري عليها معاملات الفحص الخلوي الآتية.

تحضير المطفر النتروزوجواندين (NTG)

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل [7] في تحضير المحلول الدارئ، وأذيب18 ملغرام من مسحوق مطفر NTG في 50 مللتر من محلول دارئ فوسفات ـ الليمون أعلاه، ثم أكمل الحجم إلى100 مللتر وعليه أصبح رقم المحلول الهيدروجيني 0.2±5 [8]. ثم تم تحضير تراكيز مختلفة من مطفر الـ NTG وتوليفها مع نسب مئوية مختلفة من الكحول الاثيلي وكما موضح في الجدول(1).

جدول (1): تراكيز الـ NTG المختلفة المؤلفة مع نسب مئوية مختلفة من الكحول الاثيلي

تركيز المطفر الـ NTG في المحلول	الكحولالاثيلي %	طريقة تحضير المحلول
صفر	صفر	محلول دارئ فوسفات الليمون فقط.
0.2 ملمولر	صفر	8.3 مللتر من محلول أصلاًـNTG + 41.7 مللتر من الدارئ.
0.2 ملمولر	4	8.3 مللتر من محلول أصل الـNTG +39.7 مللتر من الدارئ + 2 مللتر كحول اثيلي.
0.2 ملمولر	8	8.3 مللتر من محلول أصل الـ NTG +37.7 مللتر من الدارئ + 4 مللتر كحول اثيلي.
0.4 ملمولر	صفر	16.6 مللتر من محلول أصل الـ NTG + 33.4 مللتر من الدارئ.
0.4 ملمولر	4	16.6 مللتر من محلول أصل الـ NTG + 31.4 مللتر من الدارئ +2 مللتر كحول اثيلي.
0.4 ملمولر	8	16.6 مللتر من محلول أصل الـ NTG +29.4 مللتر من المحلول الدارئ + 4 مللتر كحول اثيلي.

تحضير الشرائح

المعاملة التمهيدية

جربت ثلاثة محاليل لمعاملة النماذج ـ سواء كانت النماذج جذور أوكالس ـ قبل تثبيتها بمحلول فارمرلانتقاء واحداً منها والاستمرار في استخدامه إلى نهاية التجربة وهذه المحاليل كما يلي :

أ ـ محلول الكولشسين 0.05 %: جرب هذا المحلول على النماذج إذ غمرت الجذور وكذلك قطع الكالس فيه لمدة - 36ساعات.

ب - 2،1 ـ بنزين ثنائي الكلوريد: جرب هذا المحلول على النماذج المذكورة أعلاه في الفقرة(أ) إذ غمرت النماذج فيه لمدة 36- ساعات.

ج - بارا ـ بنزين ثنائي الكلوريد (محلول مائي مشبع) : تم تجربة هذا المحلول على النماذج حيث تم غمرها فيه لمدة4 2- ساعات كما جاء في [9].

ألتـثبيت

نقلت الجذوروقطع الكالس بعد المعاملةالتمهيدية إلى محلول التثبيت – فارمر-(1: 3) حامض ألخليك الثلجي: كحول مطلق على الترتيب ولمدة 6 ساعات بالنسبة للجذور أما قطع الكالس فقد كانت المعاملة لها هي 24 ساعة في محلول التثبيت.

التصـبيغ

استخدمت الطريقتين التاليتين في تصبيغ الكروموسومات المراد فحصها والمحضرة من الجذور والكالس.

أ ـ التصبيغ بصبغة فولكن

1. التحلل المائي: وضعت الجذوروكذلك الكالس في حامض الـ 1N.HCl في حمام مائي على درجة حرارة 60 م ولمدة 10-15 دقيقة [10].

2. طريقة التصبيغ: وضعت الجذور أو الكالس بعد إجراء التحلل المائي لها في محلول الصبغة لمدة1-3 ساعات وعند تصبغها أخرجت من الصبغة و هرست في قطرة من صبغة الاسيتو كارمينأو حمض ألخليك45 %على شريحة زجاجية.

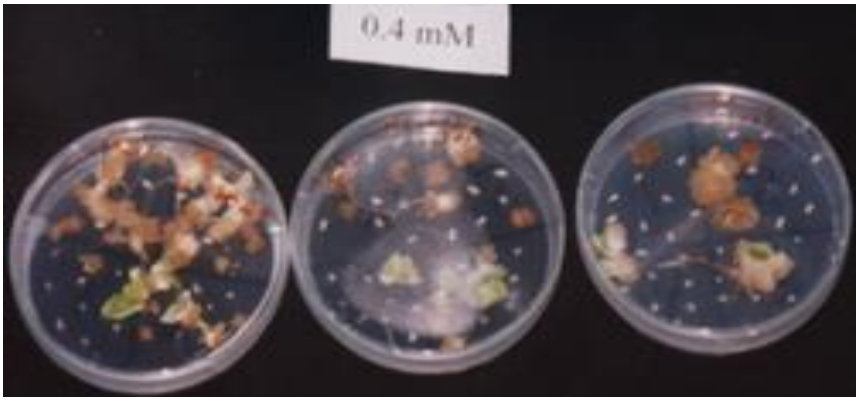
ب ـ التصبيغ بصبغة الاورسين - HCl

وضعت الجذورفي محلول الصبغةالمتكون من (8:2)حجم:حجم صبغة اسيتو أورسين2 % : حامض 1N.HCl على الترتيب لمدة (40-50) ثانية بدرجة حرارة 60 م في حمام مائي. ثم أخرجت وهرست في قطرة من صبغة اسيتو أورسين1% تحت غطاء الشريحة لتكون جاهزة للفحص [9]. وحضرت الشرائح الدائمة منها حسب ما وصفاه [11].

النتائج والمناقشة

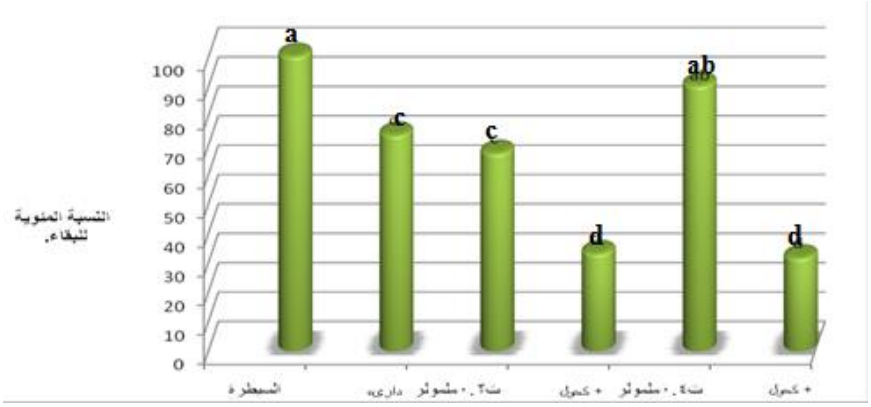
تأثير الـ NTGفي نشوء وبقاء الكالس

أظهرت النتائج استجابة ضعيفة للأجزاء الجنينية (السويقة الجنينية) المعاملة بالتوليفة المكونة من تركيزي المطفر 0.2، 0.4 ملمولر مع الكحول الاثيلي بنسبة 8% من محلول المعاملة وكما هو مبين في شكل (1) إذ كانت نسبة البقاء 1.9 % للكالس الناشئ من الأجزاء الجنينية عند المعاملة بتركيز 0.4 ملمولر على حين كانت 0.6% للكالس الناشئ من الأجزاء الجنينية عند المعاملة بتركيز0.2ملمولر، وعليه عُدت هاتين التوليفتين مميتة واستبعدتا من التحليل الإحصائي.



الكحول الاثيلي من اليمين إلى اليسار 8%، 4%، 0% على الترتيب
شكل (1): تأثيرتوليفات المطفر [0.4] ملمولر مع نسب مختلفة من الكحول الاثيلي فينشوء وبقاء الكالس

كما أظهرت النتائج تفوق معدل نسبة بقاء الكالس للتركيز0.4 ملمولر من المطفر بدون الكحول الاثيلي على جميع التوليفات الأخرى إذ بلغت86.3% باستثناء السيطرة السالبة البالغة 95.4% التي تفوقت عليه معنوياً كما مبين في الشكلين (1 و 2). في حين انخفض معدل نسبة البقاء للتوليفة (0.2؛ 0.4 ملمولر+كحول اثيلي4%) مختلفا عن جميع التوليفات الأخرى فقد بلغت 26.7%.



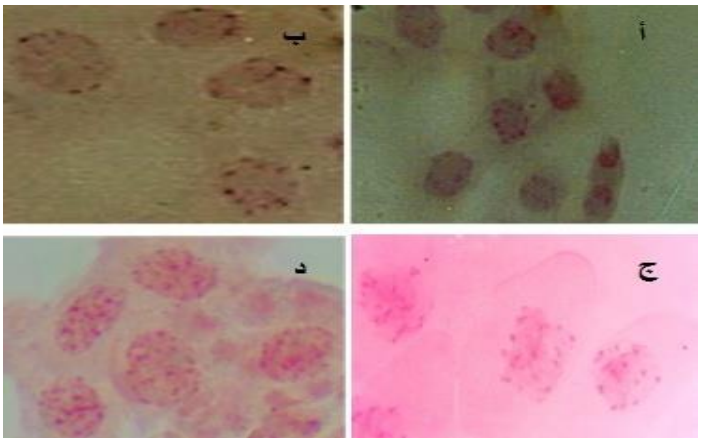
شكل (2): النسب المئوية لنشؤ الكالس نتيجة المعاملة بتوليفات الـ NTG مع الكحول الاثيلي

*** المتوسطات التي تحمل أحرف متشابهة لاتختلف عن بعضهامعنوياًوحسباختبارLSD وعلى مستواحتمال0.05.**

قد يعود السبب في الدراسة الحالية على الفاصوليا إلى زيادة نسبة الكحول الاثيلي النافذة إلى الأجزاء الجنينية لنبات الفاصوليا وذلك نتيجة معاملات التعقيم التي تضمنت التعقيم بالكحول الاثيلي مرتين مما يزيد من سمية الكحول للأجزاء الجنينية، أو بسبب تضافر التأثير السمي للكحول عالي التركيز مع المطفر.
اما بصدد اختلاف نسب البقاء ونشوء الكالس فقد اتفقت هذه النتائج مع نتائج بحث سابق [12] مع نبات الفاصوليا.

انتخاب أفضل معاملة تمهيدية للكالس والجذور

تم تجربة أكثر من محلول للمعاملة التمهيدية وكذلك أكثر من صبغة لأجراء الفحص الخلوي لقمم الجذور أوالكالس الواقع تحت تأثير مطفر الـ NTG فأظهرت النتائج إن محلول البارا - بنزين ثنائي الكلوريد كان الأفضل في إعطاء الطور الاستوائي المأسور mitosis -Cووضوح أكثر مع هيئة كروموسومات منفردة شكل (3: ج، د) وشكل (4) مقارنة مع استخدام الكولجسين شكل (3 :أ، ب) إذ كانت الكروموسومات غير واضحة لقصرها أولا و عدم تفرقها عن بعضها أيضا. أما عن مادة (1،2 - بنزين ثنائي الكلوريد) فلم تعطي أي تأثير ايجابي في الحصول على الطور الاستوائي المأسور. وبخصوص الصبغة فان صبغة أورسين- HCl كانت الأفضل في تصبغ كروموسومات قمم الجذور من صبغة فولكن كما يبينه شكل (1:ج، د) مقارنة مع (1: ب) إذ تبين أن عدد كروموسومات نبات الفاصوليا هو 22 كروموسوم. كذلك فان صبغة فولكن تحتاج إلى مدة زمنية طويلة (1-3) ساعة في حين تستلزم صبغة (أورسين- HCl) اقل من دقيقة للتصبيغ بها. أما في حالة الكشف عن التأثير الوراثي للمطفر NTG في خلايا الكالس فقد أظهرت النتائج أن صبغة فولكنكانت هي الأفضل في التصبيغ من صبغة (أورسين- HCl) كما يبينه شكل (3) إذ لم يمكن النجاح في الحصول على خلايا مصطبغة الكروموسومات.



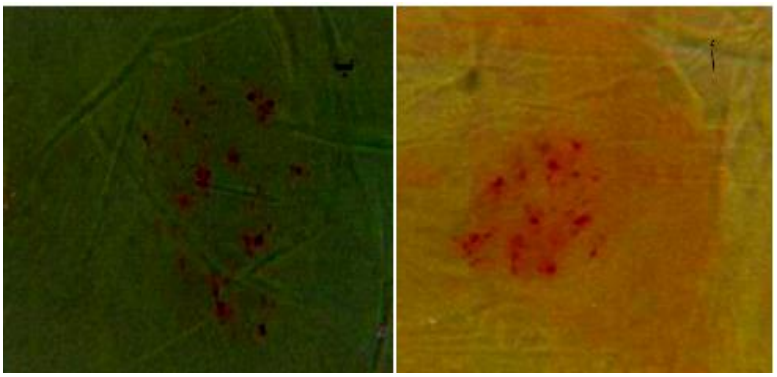
شكل (3):كروموسومات نبات الفاصوليا وكما تظهر بعد تصبيغها بصبغتي (الأورسين- HCl) و الفولكن:أ- كولشسين+ صبغة فولكن ب- كولجسين+ صبغة (أورسين- HCl) ، ج، د - بارا بنزين ثنائي الكلوريد+ (الأورسين- HCl).

ان نتيجة عدد الكروموسومات لنبات الفاصوليا 22 كروموسوم قد عززت النتائج السابقة التي حصل عليها [5، 9]، كما ان سبب عدم النجاح في الحصول على خلايا مصطبغة الكروموسومات عند استخدام صبغة (أورسين- HCl) في خلايا الكالس لكونها تحتاج إلى مدة تحلل مائي أطول في حامض الهيدروكلوريك (المنخفض العيارية) كما في استخدام صبغة فولكن لكونها –خلايا الكالس - تكون بشكل كتلة فضلا عن قصر المدة الزمنية للتصبيغ بصبغة الاورسين [13،14، 15]، وقد اختلفت النتائج السابقة في استخدام صبغة الفولكن مع كروموسومات خلايا الجذور مع [5] وذلك بسبب المعاملة التمهيدية المختلفة في حين اتفقت مع [5] في خلايا الكالس.

تأثير المطفر NTG في فترة إعادة الزراعة وبقاء الكالس الناشئ

أظهرت النتائج أن للمطفر تأثير في فترة إعادة الزراعة للكالس الناشئ إذ لم يستمر الكالس الناشئ في بقاءه حيا لفترة أربعة أسابيع المعتمدة لإعادة زراعته على أوساط غذائية جديدة (بنفس المحتوى لوسط النشؤ) بل فقد حيويته حتى عندما قصرت الفترة إلى ثلاثة بدل من أربعة أسابيع وهذه النتيجة كانت مطردة مع زيادة تركيز المطفر واقترانه مع الكحول الاثيلي في حين لم يتضرر الكالس الناشئ من معاملة السيطرة السالبة (ماء مقطر فقط) وكذلك معاملة دارئ المستخدم كسيطرة موجبة وكان بقاءه محتفظ بحيويته لغاية فترة إعادة زراعة أربعة أسابيع.

إن سبب فقدان الكالس لحيويته هو نتيجة الأضرار الوراثية الحادثة بسبب المعاملة بالمطفر وكما موضح في شكل (4) إذ يظهر التشوه الكروموسومي في خلايا الكالس كقطع مكسرة وبأحجام مختلفة من الكروموسومات المتعرضة للمطفر إذ تعمل المطفرات الكيميائية على إحداث تشوهات في الكروموسومات وخصوصا العوامل الايكالية كالـ NTG كما وجده [16،17] مع الشعير وEMS و MMS... كما وجده(Bhat 2007،2006) [18، 19].



شكل (4):أ، ب- التشوهات الكروموسومية في خلايا الكالس المستحث من الأجزاء الجنينية المعاملة بالـ NTG حيث يتبين وجود قِطع صغيرة بلون فاتح مع الكروموسومات الغامقة اللون.

التأثير الوراثي للمطفرNTG ونتائج الفحص الخلوي للكالس

أظهرت النتائج إن لمعاملة بذور الفاصوليا بمطفر الـNTG تأثيراً واضح في النسب المئوية لخلايا الكالس التي تحتوي عدد كروموسومات طبيعي.

يبين جدول(2) النسب المئوية لخلايا الكالس الحاوية أعدادا طبيعية، وكذلك كروموسومات طبيعية - غير مشوهة - او مشوهة إذ بلغت أعلى نسبة مئوية للخلايا التي تحوي كروموسومات مشوهة 40% عند استخدام المطفر بتوليفة (0.4 ملمولر NTG + الكحول الاثيلي 4%) وزراعتها على الوسط الغذائي شكل (4: أ، ب)،في حين كانت اقل نسبة تشوه هي عند السيطرة السالبة(معاملة البذور بالماء المقطر فقط) إذ بلغت (0.0%) ،كذلك ظهرت بعض الخلايا الحاوية أعدادا مضاعفة من الكروموسومات (Tetraploid) إذ بلغت أعلى نسبة لها عند معاملة البذور بالماء وزراعتها على الوسط الغذائي فيحين كانت اقل نسبة لها عند استخدام توليفات المطفر مع الكحول الاثيلي.

كذلك يبين جدول (2) العلاقة الطردية بين تركيز المطفر ونسبة التشوه الكروموسومي وخصوصا عند اقترانه بالكحول الاثيلي في حين تكون العلاقة عكسية بالنسبة إلى الكروموسومات الطبيعية.

جدول رقم (2): النسب المئوية للتشوه الكروموسومي الناتجة عن التراكيز المختلفة من المطفر الـ NTG

نتيجةالفحص الخلوي للكروموسوم	المعاملات					
	ماء مقطر	توليفات مطفر الـNTG ملمولر + الكحول الاثيلي 4%				
		دارئ فوسفات- الليمون	0.2	0.2+ كحول	0.4	0.4 + كحول
طبيعي	96	83	70	68	62	60
مشوه	0.0	12	28	32	35	40
مضاعف	4	5	2	0.0	3	0.0

إن التشوه الكروموسومي هو ناتج عن تضافر عمل كل من الـNTGمع الـ IAA (المضاف إلى الوسط الغذائي) كما بينه [20] حيث يعمل الأخير على تفاعل المطفر مع الدنا بشكل أوسع منهفي حالة غياب الـ IAA حيث يجعل القواعد النتروجينية أكثر عرضة للمطفر نتيجة تحفيز التضاعف المفرط للدنا في خلايا الكالس الناشئ من السويقة الجنينية وعليه سوف يتحفز نظام الإصلاح بالقص للعمل والذي يكون سائداً في اغلب الأحياء عند استخدام هذا المطفر كما وجده مجموعة من الباحثين [21،17،22]، حيث يتم استئصال النيوكليوتيدات المؤلكلة بوساطة أنزيم DNA glycosidase من سلسلة الدنا و إعادة تكوينهابالدنا بوليمريز الذي يستخدم الخيط المكمل كقالب، وتوصّل الِكسر حديثة التكوين بأنزيم لايجيز الدنا DNA ligase مع الخيط الأصلي [23].

إن أنزيم لايجيز الدنا يحتاج في عمله إلى مركب الـATP [24،25]، لتوصيل الأشرطة المقطوعة ونتيجة لارتفاع جرع المطفر وطول فترة المعاملة 24 ساعة في السويقة الجنينية كما مر بيانه فعندها يلزم كمية اكبر من مركب الـ ATP منها في حالة عدم المعاملة بالمطفر أو في حالة كون الجرع قليلة نسبتاً لظروف التجربة وعليه فقد لا تكفي كمية الـ ATP المتكونة في مرحلة الـ G_1 لتوصيل كل الثغرات المتكونة مما يؤدي إلى إحداث كسور في اذرع الكروموسومات.

مما سبق يستنتج أن المعاملة بمطفر الـ NTGتحتاج إلى مركب الـ ATPلترميم السويقة الجنينية الذي تتميز بسرعة نموها وشدة استجابتها لنشؤ الكالس مما يقلل من فترة إكثار الكالس المستحث وكذلك الأوساط المستخدمة لهذا الغرض حيث أن استخدام مركب الـ ATP كمادة مرممة من قبل [5] اظهر نجاحاً كبيراً في زيادة معدل خلايا الكالس ذات العدد والشكل الطبيعي للكروموسومات بعد تعريض كلا البذور والكالس بعد الاستحثاث إلى أشعة كاما وبجرع عالية والتي تؤدي إلى حدوث تكسرات في سلسلة الدنا مماثلة للتأثير الذي يسببه مطفر الـ NTG.

المصادر

1. Gichner, T. and Veleminsky, J.J.J. (1982). Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homolog's. Mutation Res. 99:192-242.
2. Krumbiegel, G. (1979). Response of haploid and diploid protoplast from Daturainnoxia and Petunia hybrida to treatment with X-ray and chemical mutagen. Enviro. Exp. Bot. 19:99-103.
3. Caboche, M. and Muller, J.F. (1980). Genetic effects of N-methyl-N'- nitro-N-nitrosoguanidine and its homologues. In: Gichner, T. and Veleminsky, J. J. J. Mutation Res. 99 (1982) 192-242.
4. Przewoz'ny,T., Schieder and Wenzel, G. (1980). Genetic effects of N-methyl-N'- nitro-N-nitrosoguanidine and its homolog's. In: Gichner, T. and Veleminsky, J.J.J. Mutation Res. 99 (1982)192-242.
5. طه ، آلاء جبار. (2002). استخدام أشعة كاما (كوبالت) وزراعة الأنسجة في استحداث تغايرات وراثية في نبات وأنسجة كالس الفاصوليا Phaseolus vulgaris L. . أطروحة دكتوراه.كلية العلوم ـ الجامعة المستنصرية ـ العراق.
6. Murashige,T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue-Physiol. Plant. 15: 473-497.
7. Mcllvaine, T. C. (1921). Guide to protein purification. In: Deutscher, M.P. Methods in Enzymology. Vol: 182; pp: 32.
8. Gichner, T. and Veleminsky, J.J. (1987). The organic solvents acetone, ethanol and dimethyl formamid the mutagenic activity of N - Methyl – N' – Nitro – N – Nitrosoguanidine no Effect on the mutagenic potential of N – Methyl – N – Nitrosourea. Mut. Res. 192:31-35.
9. Sarbhoy, R. K. (1980). Karylogical studies in the genus Phaseolus. Linn. Cytologia. 45: 363 – 373.
10. Nogola, K.K. and Klimaszewska, K,K. (1994). Karyotype analysis and optimization of mitotic induced in pieca marina preparation seedling root tips and embryonic culture. Heredity.73:11-17.
11. Cotios de Oliverira, A.L.P and de Aguiar-Perecin, M.L.R. (1999). Karyotype evolution in the Genus Crotalaria (Leguminosae). Cytologia. 64:165-174.
12. Fadl, F.A.M. (1988).Use of induced mutation in beans and peasfor resistance to rust. International Atomic energy Agancy press. Vienna orgaized by the Joint FAO/ Iaea. p: 189 – 195.
13. Smith, R. H. (2000). Plant tissue culture techniques and experiments, 2d Ed, p: 218.
14. المختار، كواكب عبد القادر و العلاف، سهيلة محمود و العطار، عدنان عبد الأمير. (1982). التحضيرات المجهرية. وزارة التعليم العالي و البحث العلمي. كلية العلوم- جامعة بغداد- العراق.
15. شلاهي، ستار عبد الله . (2010). دراسة تأثير بعض العوامل في استحثاث الكالس من متوك نبات الفاصوليا.مجلة ديالى للعلوم الصرفة،6 (4):209-226.
16. Nicoloff, H., Gecheff, K. I. and Stoilov, L. (1980). Effects of caffeine on the frequencies and location of chemically induced chromatids aberration in barley. Mutation Res. 70: 193 – 201.

17. Gordon, Alasdair. J. E. Schy, William, E. and Glickman, Barry. W. (1990). Non- phenotypic selection of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-directed mutation at a predicted hotspot site. Mut. Res. 243:145-149.

18. Bhat, T. A., Parveen, S. and Khan, A. H. (2007). Meiotic Studies in Two Varieties of Viciafaba L. (Fabaceae) after EMS Treatment**,** Asian Journal of Plant Sciences. 6 (1):51-55.

19. Bhat, T. A., Parveen, S. and Khan, A. H. (2006). MMS-Induced Cytomixis in Pollen Mother Cells of Broad Bean (Viciafaba L.), Turk. J. Bot. 30: 273-279.

20. Tarasenko, N.D. (1971). Genetic effects of N-methyl-N'- nitro-N- nitrosoguanidine and its homologues. In: Gichner, T. and Veleminsky, J, J. Mutation Res. 99(1982)192-242.

21. Ong, Tong – man and Converse. J. O. (1983). Comparison of the cytotoxic and mutagenic effects of selected mutagens on excision – sufficient and deficient AD – 3 mutants of Nerosporacrasa. Mut. Res. 124: 61 – 67.

22. عبيد، ماجد حسين وعلي، نوريه عبد الحسين والبكري، غالب حمزة .(1999). تطفير بكتريا جديدة متحملة للملوحة. مجلة أبحاث التقانة الحيوية، المجلد الأول، العدد(صفر) :46 -55.

23. Strauss, B., Altamirano, M., Bose, K, Sklar, R. and Tatssui, K. (1979). Carcinogens: Identification and mechanism of action. In: Griffin, A. C. and Shaw, C. R. Raven, New York. pp: 229-250.

24. البكري، غالب حمزة. (1991). مبادئ الهندسة الوراثية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. كلية العلوم ـ جامعة بغداد- العراق

25. معارج، محمد عبد المحسن. (1999). مقدمة في الهندسة الوراثية. جامعة دمشق. ط1. 88 .