دراسة تأثير المطفر النايتروزوجواندين NTG في نشوء وبقاء الكالس من الاجنة الناضجة لنبات الفاصوليا (*Phaseolus vulgaris*)

Effect of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) on callus induction and survival rate on mature embryos of beans (*Phaseolus vulgaris*)

ستار عبد الله شلاهي **زهرة نوري الحطاب***

مركز بحوث التقنيات الاحيائية/ جامعة النهرين
*قسم الهندسة الوراثية/ وزارة العلوم و التكنولوجيا

Sattar A. Shlahi **Zahra N. Hashim Al- Hattab***

Biotechnology Research Center/ Al- Nahrain University
* Genetic Engineering Department/ Ministry of Science andTechnology

المستخلص

نفذ البحث لدراسة تأثير المطفر الكيمائي (NTG) في نسبة بقاء الكالس الناشئ من أجزاء الجنين الناضج للفاصوليا صنف Harvester . اذ عوملت البذور بتوليفات مختلفة من المطفر و بتركيزين [0.2 ،0.4] ملمولر مع نسب مختلفة من الكحول الاثيلي لمدة 24 ساعة . استخدم الوسط الغذائي MS بوجود 0.5 ملغم/ لتر من البنزيل ادينين (BA) ، و 1 ملغم\ لتر من أندول حامض ألخليك (IAA) و 100 ملغم/ لتر من كل من متحلل الكيزين ، الكلايسين ، الاسبراجين ، التايروسين والاينوسيتول لنشوء نسيج الكالس . اظهرت النتائج تفوق السويق الجنيني معنوياً على كل من الجذير و الرويشة في معدل بقاء الكالس الناشيء منها اذ بلغت 57.5% . وكان لمعاملات التطفير تأثير ملحوظ على نسبة بقاء الكالس اذ ان المعاملتين (0.2، 0.4) ملمولر NTG مع الكحول الاثيلي بنسبة 8% من المحلول كانت مميتة للكالس في حين تفوقت المعاملة 0.4 ملمولر NTG بدون الكحول الاثيلي معنويا على جميع التوليفات الأخرى باستثناء السيطرة . أما فيما يخص التداخل بين الأجزاء الجنينية والتوليفات التطفيرية فان اقل نسبة بقاء كانت للكالس الناشيء من الرويشة عند معاملتها بتوليفة 0.2 ملمولر + الكحول الاثيلي 4% اذ بلغت 8.8% . كان لمعاملة NTG تأثير في معدلي الوزن الطري و الجاف للكالس الناشيء من الأجزاء الجنينية ، فقد تفوق الوزن الطري للكالس الناشيء من معاملة السويق الجنيني بالمطفر بتركيز 0.4 ملمولر NTG بدون الكحول الاثيلي معنوياً على جميع المعاملات بما فيها السيطرة ، اذ بلغ الوزن الطري 347.2 ملغرام ، في حين كان اقل وزن طري متحصل عليه من الكالس الناشيء من الجذير المعامل بتوليفة 0.4 ملمولر NTG + الكحول الاثيلي4% اذ بلغ 60 ملغرام . وتفوق الوزن الجاف للكالس الناشيء من السويق الجنيني للمعاملة 0.4 ملمولر NTG بدون الكحول الاثيلي و البالغ 22.5 ملغرام معنويا على جميع المعاملات الاخرى بما فيها السيطرة البالغ 17.2 ملغم . بينما كان اقل وزن جاف متحصل عليه من الكالس الناشيء من الجذير المعامل بتوليفة 0.4 ملمولر NTG + كحول اثيلي 4% والذي بلغ 3 ملغرام . تظهر الدراسة الحالية تفوق الكالس الناشيء من السويق الجنيني المعامل بتركيز 0.4 ملمولر NTG بدون الكحول بنسبة البقاء كما تفوق بالوزن الطري والجاف . في حين ان اضافة الكحول الاثيلي بنسبة 4% خفضت نسبة البقاء وعلى ما يبدو انه يزيد من نفوذ المطفر إلى الخلايا .

Abstract

This research was conducted to study the effect of the chemical mutagen N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine on the percentage of callus induction and survival from mature beans embryos harvester cultivar. Seeds were treated with (0.2 or 0.4)

millimolar of the mutagen NTG in combination with 0.0, 4 or 8% of ethanol, pH 5±2 .0 for 24 h. Calli were induced on mature embryos by using MS medium with 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. Results showed that the hypocotyl surpassed the radical and the plume significantly in terms of survival reached 56.3%. Mutagen treatments showed asignificant effect on calli survival. Treatment with 8% Ethanol was lethal for all explants. While treatment with 0.4 mM NTG without Ethanol gaved the highest survival rate. The interaction between the treatments and the explants showed that the lowest survival percentage was which 8.8% that was for shoots treated with 0.2 mM of 4% Ethanol. Calli induced on hypocotyls treated with 0.4 mM NTG without Ethanol gave the highest fresh weight (347.2) mg while the lowest was (60) mg for calli induced on the radical treated with 0.4 mM NTG with 4% Ethanol. Moreover the highest dry weight was 22.5 mg for calli induced from hypocotyls treated with 0.4 millimolar NTG without Ethanol that was higher than the control 17.2 mg.The lowest dry weight obtained from calli induced on the radical treated with 0.4 mM NTG with 4% Ethanol was 3 mg. In conclusion the results showed that 0.4 mM NTG without Ethanol gave the highest survival rate and the highest fresh and dry weight for calli induced on the hypocotyl.

المقدمة

يعد مطفر النايتروزوكواندين N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) من اهم المطفرات الكيميائية المعروفة بفعاليتها القوية لحد الان. ويعتمد النشاط التطفيري للـ NTG في النباتات الراقية على الـ pH لمحلول التطفير، اذ تظهر سمية الـ NTG وتأثيراته الكلاستوجينية (**Clastogenics**) عند الرقم الهيدروجيني 4.4 ، وليس له أي تأثير في الاوساط القاعدية . كما تنخفض قدرته السمية والتطفيرية بوجود الضوء في حين تزداد بارتفاع درجة الحرارة [1] . وقد اضيف الـNTG الى المزارع النسيجية لمقارنة تأثيراته التطفيرية على الجبلات الاحادية (Haploid Protoplasts) و الثنائية (Diploid Protoplasts) في كل من الداتورة والبيتونيا ووجد أن معدلات البقاء للجبلات الاحادية في كلا النوعين انخفضت اسياً (Exponentialy) مع ازدياد جُرع الـ NTG ، اما الجبلات الثنائية فقد اظهرت مقاومة بقاء اعلى من الاحادية في الجرع العالية [2] . كذلك تم الحصول على مستعمراتٍ مقاومة للفالين في جبلات التبغ عند معاملتها بالـ NTG[3] . في حين ان النباتات التي تم الحصول عليها من متوك التبغ المعومة فوق محلول الـ NTG لم تختلف في اشكالها المظهرية [4] .

يهدف البحث الحالي دراسة تأثير المطفر الكيماوي الـNTG في نشوء الكالس من الاجنة الناضجة لنبات الفاصوليا وقدرته على البقاء و النمو وتحديد الظروف المثلى للمعاملة .

المواد و طرائق العمل

نفذت الدراسة في قسم التقنيات الحياتية في منظمة الطاقة الذرية العراقية (سابقا) واستخدمت بذور الفاصوليا الناضجة الجافة صنف Harvester . إذ عقمت البذور بغسلها اولاً بالماء و مسحوق الغسيل المحلي ثم غمرت بالكحول الاثيلي (70%) لمدة دقيقة واحدة تحت ظروف غرفة العزل مع التحريك المستمر، ثم استُبدل الكحول بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بنسبة 1.88% (محلول القاصر المحلي) والمضاف اليه2 -3 قطرات من المادة الناشرة Tween 20 لمدة نصف ساعة مع مراعاة التحريك بين حينٍ وآخر . بعدها غسلت البذور بماءٍ مقطر معقم ثلاث مرات لمدة 5 دقائق لكل مرة ثم تركت البذور في الماء المقطر او محلول معاملة التطفير لمدة 24 ساعة في الظلام وبدرجة حرارة الغرفة . أعيدت عملية التعقيم السطحي السالفة الذكر في اليوم التالي بجميع خطواتها بأستثناء عملية اضافة محلول هايبوكلورات الصوديوم اذ كانت فترة التعقيم السطحي 20 دقيقة [5] . بعدها أزيل غلاف البذور واستؤصل الجنين وقسم إلى ثلاثة أجزاء (جذير، سويقة جنينية ، رويشة) ثم زرعت على الاوساط الغذائية .

استخدم الوسط الغذائي MS [6] مضافاً إليه (30) غرام/ لتر سكروز ، 100 ملغم/ لتر من كل من مايواينوسيتول والكلايسين والتايروسين و الاسبرجين ومتحلل الكيزين (Casein Hydrolysate)، و0.5 ملغم/ لتر من البنزيل ادينين (BA) ، و 1 ملغم/ لتر من الاندول حامض الخليك (IAA)، 0.6% آجار. زرعت أجنة 100 بذرة لكل معاملة ووضعت الزر وعات في غرفة الحضن وبدرجة حرارة (2±23) م وبتعاقب ضوئي 16 ساعة يومياً وشدة اضاءة 1000 لوكس . بعد مرور 4 اسابيع على نشوء الكالس حسبت نسبة البقاء للاجزاء المزروعة ، ووزني الكالس الناشيء الطري والجاف من المعاملات المختلفة . نفذت التجربة باستخدام تصميم تام التعشية (Completely Randomized Design) CRD وقورنت المتوسطات حسب اختبار L.S.D وعلى مستوى احتمال 5% .

تحضير المطفر النتروزوجواندين (NTG)

1. تحضير محلول دارىء فوسفات ـ الليمون

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل [7] في تحضير المحلول الدارىء وذلك بمزج (48.6%) من محلول حامض الليمون بتركيز 0.1 ملمولر مع (51.4%) من محلول اصل فوسفات الصوديوم ثنائية القاعدة بتركيز 0.1 ملمولر لجعل المحلول برقم هيدروجيني 5 ± 0.2 .

2. **تحضير محلول اصل المطفر النتروزوجواندين (NTG)**

اذيب 18 ملغرام من مسحوق مطفر NTG في 50 مللتر من محلول دارىء فوسفات ـ الليمون اعلاه ، ثم اكمل الحجم الى 100 مللتر وعليه اصبح رقم المحلول الهيدروجيني 5 ± 0.2 [8] . ثم تم تحضير تراكيز مختلفة من مطفر الـ NTG وتوليفها مع نسب مئوية مختلفة من الكحول الاثيلي وكما موضح في الجدول (1) .

أتلاف المطفر

تم التخلص من خاصية التطفير للـ NTG اما بأ ستخدام القاعدة NaOH [1] عياري، أو باستخدام مستخلص اوراق الشاي السوداء الجافة بمعدل 3: 1 من المستخلص: المطفر على التتالي وكما ورد في [9] .

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

تركيز المطفر الـ NTG في المحلول	الكحولالاثيلي %	طريقة تحضير المحلول
0	0	محلول دارىء فوسفات الليمون فقط
0.2 ملمولر	0	8.3 مللتر من محلول اصل الـ **NTG** + 41.7 مللتر من الدارىء
0.2 ملمولر	4	8.3 مللتر من محلول اصل الـ**NTG** +39.7 مللتر من الدارىء + 2 مللتر كحول اثيلي
0.2 ملمولر	8	8.3 مللتر من محلول اصل الـ **NTG** +37.7 مللتر من الدارىء + 4 مللتر كحول اثيلي
0.4 ملمولر	0	16.6 مللتر من محلول اصل الـ **NTG** + 33.4 مللتر من الدارىء
0.4 ملمولر	4	16.6 مللتر من محلول اصل الـ **NTG** + 31.4 مللتر من الدارىء +2 مللتر كحول اثيلي
0.4 ملمولر	8	16.6 مللتر من محلول اصل الـ **NTG** + 29.4 مللتر من المحلول الدارىء + 4 مللتر كحول اثيلي

النتائج و المناقشة

تأثير الـ NTG على بقاء الكالس

أظهرت النتائج استجابة ضعيفة للاجزاء الجنينية المعاملة بالتوليفة المكونة من تركيزي المطفر (0.2، 0.4) ملمولر مع الكحول الاثيلي بنسبة 8% من محلول المعاملة وكما هو مبين في الشكل (1) اذ كانت نسبة البقاء 1.9% للكالس الناشيء من جميع الاجزاء الجنينية عند المعاملة بتركيز 0.4 ملمولر على حين كانت 0.6% للكالس الناشيء من جميع الاجزاءالجنينية عند المعاملة بتركيز 0.2 ملمولر ، وعليه عُدت هاتين التوليفتين مميتة واستبعدتا من التحليل الاحصائي . وبهذا تختلف هذه النتيجة مع ما حصل عليه [8] عند معاملة بذور نبات الـ Arabidopsis thaliana بنسبة (8%) فلم تكن ذات تأثيرٍ يذكر في نسبة الإنبات في حين خَفّضت نسبة 16% **(** كحول اثيلي) نسبة الإنبات في

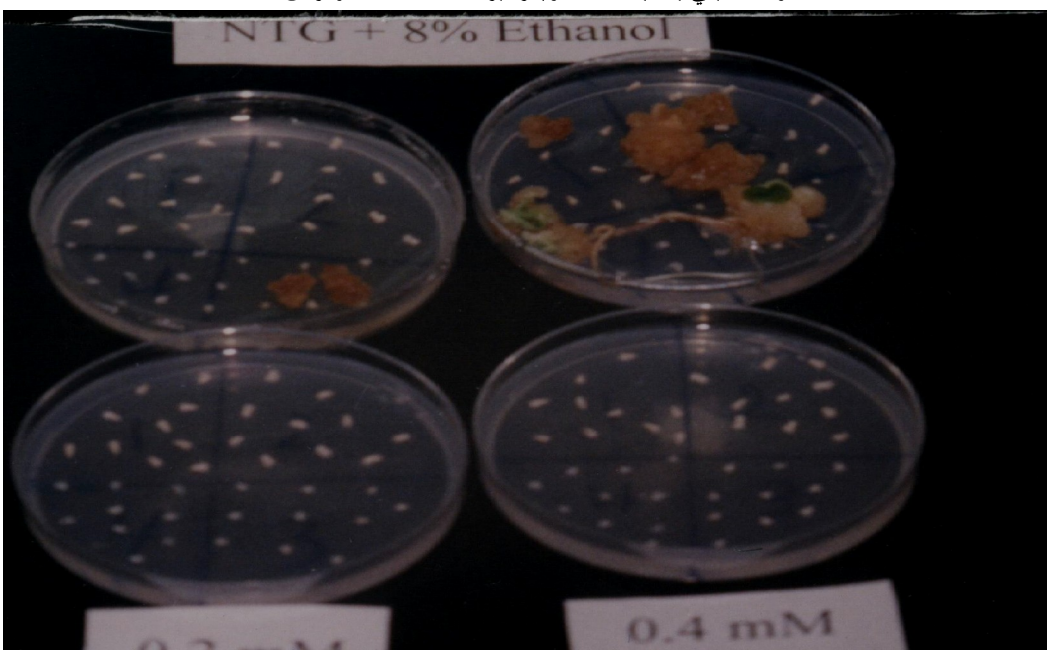
الـ A. thaliana إلى (60-90%) . قد يعود السبب في الدراسة الحالية على الفاصوليا إلى زيادة نسبة الكحول الاثيلي النافذة إلى الأجزاء الجنينية لنبات الفاصوليا وذلك نتيجة معاملات التعقيم التي تضمنت التعقيم بالكحول الاثيلي مرتين مما يزيد من سمية الكحول للأجزاء الجنينية ، أو بسبب تضافر التأثير السمي للكحول العالي التركيز مع المطفر المستخدم (NTG) .

أظهرت النتائج في الشكل (2 ،3 ، 4) ، تفوق معدل نسبة بقاء الكالس للتركيز 0.4 ملمولر من المطفر بدون الكحول الاثيلي على جميع التوليفات الأخرى حيث بلغت 56.3% باستثناء السيطرة البالغة 69.4% التي تفوقت عليه معنوياً . في حين انخفض معدل نسبة البقاء للتوليفة (0.2 ملمولر +كحول اثيلي4%) مختلفاعن جميع التوليفات الأخرى فقد بلغت 17.7% . أما بشأن الأجزاء الجنينية فقد تفوقت السويقة الجنينية معنوياً على كل من الجذير و الرويشة في معدل نسبة البقاء للكالس الناشيء منها اذ بلغت 57.5% . وتفوق الجذير 36.2% معنوياً على الرويشة اذ بلغت نسبة بقاء الكالس لهما (36.2 و17.7) % على التوالي .

أما فيما يخص التداخل بين الأجزاء الجنينية والتوليفات التطفيرية فقد تفوقت السويقة الجنينية عند معاملته بتوليفة 0.4 ملمولر بدون الكحول الاثيلي على جميع الأجزاء الأخرى إذ بلغت نسبة البقاء له 86.7% بينما كانت للسيطرة 95.6% . في حين بلغت اقل نسبة بقاء للكالس الناشيء من الرويشة عند معاملتها بتوليفة 0.2 ملمولر + الكحول الاثيلي 4% والتي كانت 8.8% .

يستنتج من هذا إن الأجزاء الجنينية في مختلف التوليفات لم تختلف في سلوكها عن السيطرة من حيث تفوق السويقة الجنينية على الأجزاء الأخرى حيث يمكن اعتماد هذا الجزء كأفضل جزء جنيني يمكن استخدامه لتنشئة الكالس منه بعد معاملته بالمطفر مع الأخذ بنظر الاعتبار تأثير القتل الناتج عن المعاملة بالمطفر. فضلاً عن ذلك فان لوجود الكحول الاثيلي في محلول المعاملة كان ذو تأثير سلبي على نسبة نشوء و بقاء الكالس وبجميع النسب المئوية المستخدمة . وبهذا تتفق هذه النتائج مع نتائج كل من [10] في الشعير؛ و [11] في A.thaliana ، و [12] في فستق الحقل ، و [13] في الفاصوليا . في حين تختلف هذه النتائج مع ما توصل اليه كل من [10] في A. thaliana ، و [14] في الشعير والذرة البيضاء .

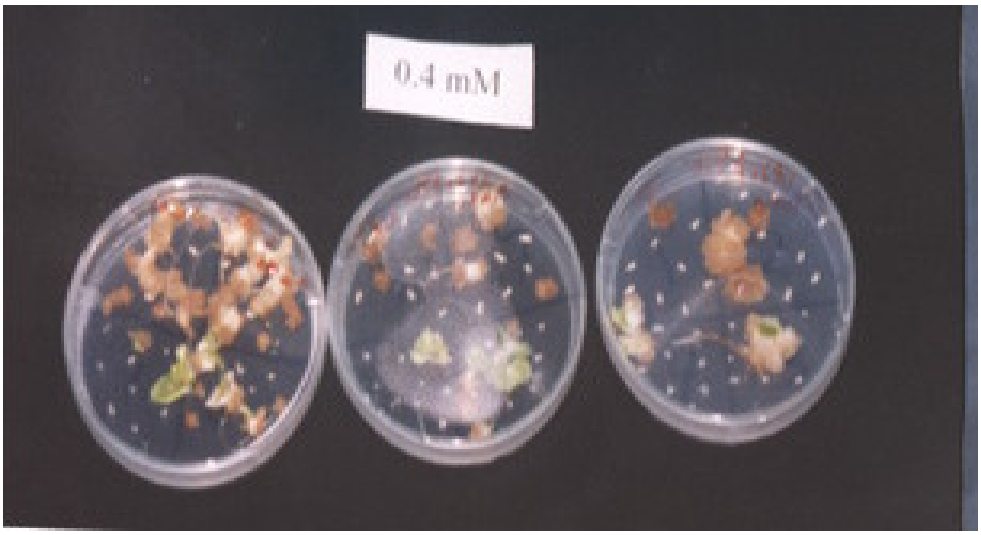
الكحول الاثيلي بنسبة 8 % وبتركيز 0.4 ،0.2 ملمولرمن الـ NTG



الشكل (1): تأثير توليفات المطفر مع نسب مختلفة من الكحول الاثيلي في نشوء وبقاء الكالس

إن انخفاض نسبة البقاء للتوليفات المكونة من المطفر و الكحول الاثيلي قد يعود إلى السمية للأجزاء الجنينية وموتها قبل الشروع بنشوء الكالس [8] . اما بصدد اختلاف نسب البقاء ونشوء الكالس فانه يمكن ان يعود إلى تظافر التأثير بين المطفر NTG مع الـ IAA وحسب التركيز المستخدم اذ يعمل منظم النمو على تحفيز الانقسام وجعل القواعد النووية عرضة للمطفر الذي يكون تأثيره حسب التركيز كما سبق بيانه [15] .

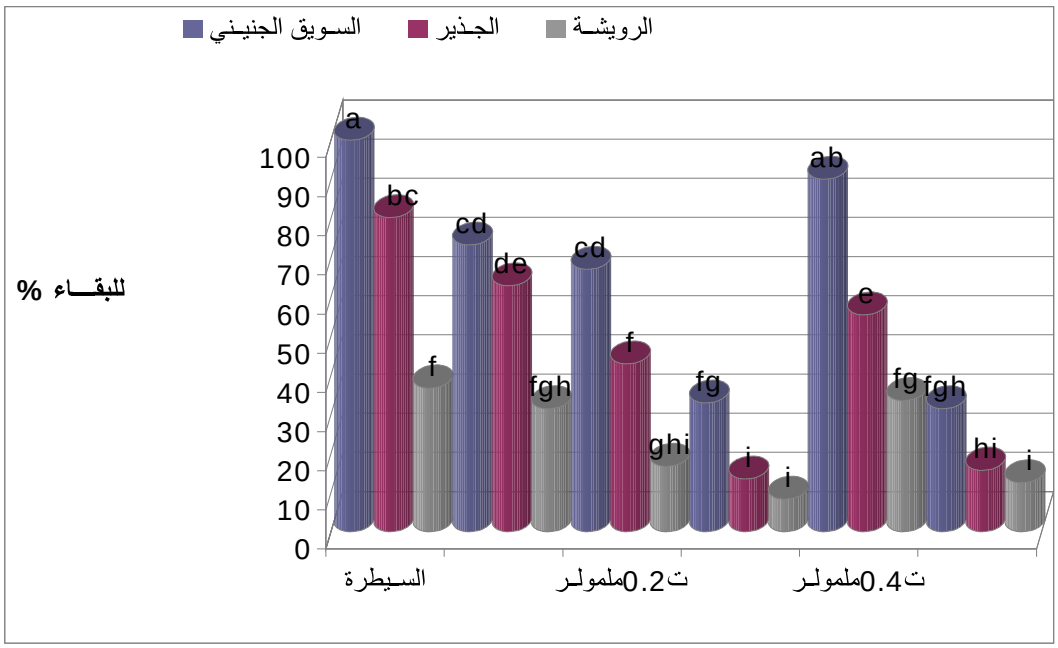
الكحول الاثيلي من اليمين الى اليسار 8%، 4%، 5% على التوالي



الشكل (2): تأثير توليفات المطفر NTG (0.4) ملمولر مع نسب مختلفة من الكحول الاثيلي في نشوء وبقاء الكالس

الكحول الاثيلي من اليسار الى اليمين 8%، 4%، 5% على التوالي

الشكل (3): تأثير توليفات المطفرNTG (0.2) ملمولر مع نسب مختلفة من الكحول الاثيلي في نشوء وبقاء الكالس



الشكل (4): النسب المئوية للبقاء نتيجة المعاملة بتوليفات الـ NTG مع الكحول الاثيلي

*** المعدلات التي يحمل احرف متشابهة لاتختلف عن بعضها معنوياً وحسب اختبار LSD وعلى مستوى احتمال0.05.**

تأثير مطفر الـ NTG على الوزن الطري للكالس الناشيء

أظهرت النتائج تفوق معدل الوزن الطري للكالس الناشيء على الأجزاء الجنينية وبشكل معنوي نتيجة معاملتها بمطفر الـ NTG وبتوليفة 0.4 ملمولر NTG بدون الكحول على جميع التوليفات الأخرى اذ بلغ 235.3 ملغم ، في حين انخفض معدل الوزن الطري للكالس الناشيء على الأجزاء الجنينية وبشكل معنوي نتيجة المعاملة بالمطفر وبتوليفة 0.2 ملمولر NTG +كحول اثيلي 4% عن جميع المعاملات الأخرى اذ بلغت 68.8 ملغم جدول (2) . اما عن الأجزاء الجنبنية فقد تفوق معدل الوزن الطري للكالس الناشيء على السويقة الجنينية وبشكل معنوي فقد بلغ 222.6 ملغم على كالس الجذير البالغ 90.7 ملغم .

أما بشأن التداخل بين الجزء الجنيني و تركيز المطفر فقد تفوق الوزن الطري للكالس الناشيء من معاملة السويقة الجنينية بالمطفر بتركيز 0.4 ملمولر NTG بدون الكحول الاثيلي معنوياً على جميع المعاملات بما فيها السيطرة اذ بلغ 347.2 ملغم ، في حين كان اقل وزن متحصل عليه هو للكالس الناشيء من الجذير المعامل بتوليفة 0.4 ملمولر NTG + الكحول الاثيلي 4% اذ بلغ 60 ملغرام .

الجدول(2) الوزن الطري (ملغرام) للكالس الناشيء من السويقة الجنينية والجذير المعاملان بالـ NTG

المعاملات الاجزاء الجنينية	السيطرة	توليفات المطفر NTG ملمولر + الكحول الاثيلي 4 %					المعدل
		داريء الفوسفات	0.2	0.2 +كحول	0.4	0.4 +كحول	
السويقة الجنينية	143.5 de	292 b	248.4 c	137.6 e	347.2 a	167 de	222.6 a
الجذير	90.2 f	94.1 ef	177 d	0.0 h	123.3 e	60 g	90.7 b
المعدل	116.9 d	193 c	212.7 b	68.8 e	235.3 a	113.5 d	

*** المعدلات التي تحمل احرف متشابهة لاتختلف عن بعضها معنوياً وحسب اختبار LSD وعلى مستوى احتمال 0.05 .**

تأثير مطفر الـ NTG على الوزن الجاف للكالس الناشيء

يبين الجدول (3) تأثير المطفر على الوزن الجاف اذ بلغ معدله للكالس الناشيء من السويقة الجنينية (16.83 ملغم) الذي تفوق معنوياً على الوزن الجاف لكالس الجذير و البالغ 6.86 ملغم. اما عن التداخل بين الاجزاء الجنينية و

المعاملات المختلفة جدول (3) فقد تفوق الوزن الجاف للكالس الناشيء من السويقة الجنينية و المعاملة بالمطفر وبتركيز 0.4 ملمولر بدون الكحول الاثيلي معنويا على جميع المعاملات الاخرى بما فيها السيطرة البالغة (17.2 ملغم) إذ بلغ 22.5 ملغرام . في حين كان اقل وزن جاف متحصل عليه من الكالس الناشيء من الجذير المعامل بتوليفة 0.4 ملمولر NTG + كحول اثيلي 4% والذي بلغ 3 ملغرام .

إن تفوق الوزن الجاف للكالس المستحث من السويقة الجنينية المعامل بتركيز 0.4 ملمولر من المطفر بدون الكحول قد يعود الى زيادة عدد خلايا الكالس نتيجة الانقسامات المتكررة السريعة المتسببة عن التأثير المتظافر بين المطفر والـ IAA [15] ، اذ يتفاعل المطفر مع الهستونات وخصوصاً الغنية بألـ Lysine H1 [16] مما يسهل ارتباط الـ IAA بالدنا وزيادة تكراره من جهة وزيادة لدونة جدار الخلية من جهة أخرى مما يؤدي الى زيادة المحتوى المائي للخلية لموازنة ازموزية مع ضغط امتلاء الخلية [17،18] ، بالاستناد إلى ما ذكر أعلاه سوف يتم زيادة الوزن الطري للكالس علاوة على الوزن الجاف .

الجدول(3) الوزن الجاف ملغرام للكالس الناشيء على السويق الجنيني والجذير المعاملان بالـ NTG

المعاملات / الجزء الجيني	السيطرة	توليفات المطفر NTG ملمولر + الكحول الاثيلي 4 %					
		دارىء الفوسفات	0.2	0.2 +كحول	0.4	0.4 +كحول	المعدل
السويقة الجنينية	17.2 b	18.5 b	17b	9 d	22.8a	10.8cd	16.8 a3
الجذير	10.5cd	6 e	12 c	0.0 g	8 de	3 f	b6.86
المعدل	13.85b	12.25 c	b14.5	4.5 e	15.4a	6.9 d	

*** المعدلات التي تحمل احرف متشابهة لاتختلف عن بعضها معنوياً وحسب اختبار LSD وعلى مستوى احتمال 0.05**

المصادر

1. Gichner, T. and Veleminsky, 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 Datura innoxia 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 homologs. In: Gichner, T. and Veleminsky, 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. Mutation Res., 99 (1982)192-242.
5. طه، آلاء جبار.(2002). استخدام اشعة كاما (كوبالت) وزراعة الانسجة في استحداث تغايرات وراثية في نبات وانسجة كالس الفاصوليا **Phaseolus vulgaris L.** . اطروحة 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 Velimens, J. (1987). The organic solvents aceton, 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. Jain, A. R.; Shimoi, K .Nakamura, Y.; Kada, T.; Hara, Y and I. (1989). Crud tea extracts decrease the mutagenic activity of N-methyl-N'-nitro-Nnitrosoguanidine in vitro and in intragastric tract of rats.Mutat Res., 210:1-8.
10. Gichner, T. and Velmeminssky, J. (1967). The mutagenic activity of). N - Methyl – N' – Nitro – N – Nitrosoguanidine on the barly, Mutation Res., 4: 207 – 212.
11. Jacobs, M. (1969). Mutagen assay with Arabidopsis of the U.S environmental protection agency gene – tox program. In Redei, G. P. Mutation Res., 99 (1982) 243 – 255.
12. Ashri, A. and Levey, A. (1974).Sensitivity of developmental stages of peanut (A. hypogaea) embryos and ovaries to several chemical mutagen treatments. Radiation Bot., 14:223-228.
13. 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.
14. Kutzelnigg, H. (1972). Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homolog's. In: Gichner,T. and Veleminsky, J. Mutation Res., 99(1982)192-242.
15. Tarasenko, N. D.(1971). Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and IAA. In: Gichner,T.and Veleminsky, J. Mutation Res., 99(1982)192-242.
16. Pinsky, S. D., Tew, K. D.; Smulson, M. E and Wooley, P.V. III. (1979). Cancer Res., 39: 923-928.

17. الساهوكي، مدحت. (2002). البذرة ومكونات الحاصل. مركز إباء للأبحاث الزراعية- جمهورية العراق.
18. ليفيت، يعقوب.(1985). مقدمة فسلجة النبات. ترجمة الدكتور عاصم محمود حسين. وزراة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة الموصل ـ العراق.