تأثير تعريض كالس سيقان نبات الحبة السوداء (*Nigella sativa L.*) لأشعة كاما على فعالية أنزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز وكمية الفوليت المستخلصة منه

د. ساجدة عزيز عبود
كلية العلوم / قسم علوم الحياة
جامعة الموصل

الاستلام 02 / 12 / 2007
القبول 07 / 04 / 2008

Abstract

The present study was conducted to determine the effects of gamma rays on specific activity of dihydrofolate reductase and folate content of Black seed (*Nigella sativa L.*) callus. The effect was dependent on doses of gamma rays.

The obtained results showed that specific activity of dihydrofolate reductase increased with the growth period at doses 5, 10, 30 and 50 rad, the total folate content increased substantially, but the high doses of rays (70, 90 rad) led to decrease of dihydrofolate reductase activity and folate content extracted from callus of different ages.

On the other hand, the results revealed that the exposed callus at 5 rad exhibited high level resistance to 10^{-1} M of aminpterin and trimethoprime. The specific activity of dihydrofolate reductase and total folate content were partly reserved as a result of radiation compared with non-radiated callus.

الملخص

تهدف الدراســة الحالية إلى معرفة مدى تاثير اشــعة كاما على الفعالية النوعية لانزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز وكمية الفوليت المســتخلصــة من كالس نبات الحبة الســوداء *(Nigella sativa L.)*.

اكدت النتائج إلى حصـول زيادة في الفعالية النوعية لانزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز خلال فترات النمو المختلفة عند اســتخدام الجرع 5، 10، 30، 50 راد واتخذت الزيادة في كمية الفوليت المســتخلصــة من خلايا الكالس انماطاً مشــابهة الى حد ما للزيادة في الفعالية النوعية لانزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز ولوحظ ان الجرع 70 و 90 راد ســببت انخفاضــاً في فعالية الانزيم وكمية الفوليت المسـتخلصــة من الكالس باعمار مختلفة، هذا من جهة ومن جهة أخرى وجد أيضــاً ان كالس نبات الحبة السوداء المعرض إلى الجرعة 5 راد اظهر مقاومة معينة لمشابهات الفوليت الامينوبترين والترايميثوبريم بتركيز 10^{-1} مولار أي ان الفعـالية النوعيـة للانزيم وكميـة الفوليـت المثبطـة تم اسـتعادتها جزئياً عند تعريضـها لأشـعة كاما مقارنة بالكالس غير المعرض للاشـعة الذي اظهر نسـبة عالية من التثبيط بمشابهات الفوليت.

المقدمة

يعمل انزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز (E.C.1.5.1.3) على اختزال الداي هيدروفوليت الى التتراهيدروفوليت بوجود العامل المســاعد المختزل NADPH، ثم يدخل التراهيدروفوليت في تفـاعلات أيضــية متعددة بعد تحولـه إلى المســاعدات الانزيميـة للفوليـت ذي الـدور الهـام لبنـاء نيوكليوتيدات البيورين والتايمين وبعض الأحماض الامينية في الكائن الحي (2,1)، وبذلك يقوم انزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز (DHFR) بدور مهم ورئيس في بنـاء الحـامض النووي الديوكســي رايبوزي (DNA)، وكذلك يعمل على ثبات مسـتوى الفوليت في جسـم الكائن الحي (3) وبذلك يمنع الفوليت بعض أنواع السرطانات بواسطة حفظه للمادة الوراثية في الخلية (2).

تحدث الإشـعاعات الكهرومغناطيسـية ومنها اشـعة كاما التغيرات الكيميائية والبايولوجية في الخلايا الحية من خلال تـأثيرها على الحـامض النووي DNA الحيوية للخليـة او على جدار الخليـة الداخلي او على جسيم المايتوكوندريا المسؤولة عن تحرير الطاقة في الخلية، الا ان معظم الدراسات تشير إلى ان الحامض النووي DNA تعتبر الهدف الأكثر تأثراً بالأشعة وذلك يعود إلى وجود الشفرة

الوراثية محمولة على تلك المادة الوراثية (4). تشـير دراسـات إلى تأثير أشـعة كاما في الصـفات المورفولوجية والتشريحية والإنتاجية في نبات القطن(5) والحبة السوداء(6). تعد أشعة كاما من اكثر المصـادر الإشـعاعية في إحداث الطفرات بسـبب ترددها العالي فهي تسـتطيع النفاذ داخل الأنسـجة النباتية (7). توفر زراعة الأنسـجة النباتية نظاماً مثالياً لانتخاب الطفرات الناتجة من تأثيرات تلك الأشعة لإنتاج سلالات من نباتات ذات صفات وخصائص مرغوب بها (8).

يعد الامينوبترين والترايميثوبريم من مشـابهات الفوليت المثبطة لعمليات ايضـية معينة (9) وقد وجد سـابقاً بان تاثيرهما كبيراً جداً على فعالية انزيم DHFR وكمية الفوليت المسـتخلصـة من كالس نبات الحبة السوداء النامي في وسط MS المضافة إليه تلك المشابهات بتراكيز معينة (10).

تهدف هذه الدراسـة الى التعرف على تأثيرات أشـعة كاما في فعالية انزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز وكمية الفوليت المستخلصة من كالس سيقان نبات الحبة السوداء المعرض لتلك الأشعة.

مواد العمل وطرائقه

زراعة البذور وتنمية البادرات

اسـتخدم وسـط Arnon الصـلب المعقم (11) لإنبات بذور نبات الحبة السـوداء المعقمة وتنمية البادرات (12).

استحداث الكالس وتنميته

اسـتخدم وسـط MS الصـلب (13) المضـاف اليه 10^{-6} مولار من 2,4-D و 3.5% من السكروز لاستحداث ونمو الكالس من سيقان نبات الحبة السوداء المعقمة (12).

تعريض الكالس لاشعة كاما:

عرضـت عينات من كالس سيقان نبات الحبة السـوداء، بوزن 1 غرام تقريباً وبعمر 35 يوماً النامي في الوسـط القياسـي، لجرع مختلفة من اشـعة كاما ولمدد زمنية مختلفة، واعتمدت عينات من الكالس غير المعرض لاشـعة كاما معاملات للمقارنة في هذه الدراسـة، اسـتخدم لهذا الغرض جهاز الكويلت (^{60}Co) ذو طاقة بمعدل 1.20 مليون اليكترون فولت وعلى بعد 65 سم من المصدر.

الجدول (1): الجرع الإشعاعية المختلفة المعرض لها كالس سيقان نبات الحبة السوداء خلال مدد زمنية مختلفة

الجرعة الاشعاعية* (راد)	المدد الزمنية (دقيقة)
5	0.45
10	0.90
30	2.71
50	4.51
70	6.31
90	8.12

* تم تعريض الكالس لأشعة كاما في مستشفى الطب الذري والأورام السرطانية (قسم الاشعة) في الموصل

استخلاص انزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز وقياس فعاليته النوعية

الاستخلاص

أضيف 3 سم^3 من المحلول المنظم بوتاسيوم فوسفيت بتركيز 50 ملي مولار بدالة حامضية (7.0) الى 1 غرام من كالس سيقان نبات الحبة السوداء بعمر 90,60,30 يوماً. سحقت الخلايا في هاون خزفي مبرد بدرجة حرارة 4 مْ وأكمل سحق وتحطيم الخلايا باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية بتسليط 20000 ذبذبة/ دقيقة لمدة نصف دقيقة عزل الرائق عن الراسب باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد 3600 دورة/ دقيقة ولمدة نصف ساعة، واستخدم الرائق في قياس فعالية الانزيم (9).

قياس فعالية الانزيم طيفياً

قيست فعالية انزيم DHFR بتحديد مقدار الانخفاض في الامتصاص الضوئي لمحلول التفاعل عند الطول الموجي 340 نانوميتر (14) مع بعض التحويرات (15). حددت الفعالية النوعية للانزيم على انها كمية الانزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من NADPH خلال دقيقة واحدة من التفاعل لكل ملغرام بروتين، واستخدام معامل الامتصاص الضوئي لمادة NADPH والمساوي الى $6.2x10^3$ M^{-1} (16).

تقدير كمية الفوليت الكلية

استخدمت الطريقة المايكروبايولوجية التي اتبعتها AOAC (17) لتقدير كمية الفوليت الكلية المستخلصة من كالس نبات الحبة السوداء خلال مراحل النمو المختلفة، بقياس مقدار التعكر الحاصل نتيجة نمو بكتريا *Streptococcus faecalis* عند الطول الموجي 540 نانوميتر.

تأثير مشابهات الفوليت

نقلت قطع من كالس نبات الحبة السوداء بعد 60 يوماً من بدء تعريضها لجرعة 5 راد وبوزن 0.5 غم تقريباً الى دوارق زجاجية حاوية على وسط MS مضافاً اليه 2,4-D بتركيز 10^{-6} مولار ومشابهات الفوليت (الترايميثوبريم او الامينزبترين) بتركيز 10^{-1} مولار(10)، حددت فعالية انزيم DHFR وكمية الفوليت الكلية المستخلصة من الكالس بعد 30 يوما من نقله الى تلك الاوساط، واعتمدت المقارنة بالكالس غير المعرض والنامي في الوسط القياسي المدعم بـ 10^{-6} مولار من 2,4-D وكلك الكالس غير المعرض النامي في الوسط القياسي الحاوي على 10^{-1} مولار من احد مشابهات الفوليت (الترايميثوبريم او الامينزبترين).

النتائج

استحداث الكالس وتنميته

بدأ الكالس النامي على وسط MS المدعم بـ 10^{-6} مولار من 2,4-D مفكك الخلايا ذي لون اخضر مصفر كما وجد سابقاً (12)، مما سهل عملية استخلاص انزيم DHFR والفوليت من الكالس عند مدد نمو مختلفة.

فعالية انزيم DHFR

ازدادت الفعالية النوعية لانزيم DHFR المستخلص من كالس نبات الحبة السوداء المعرض لاشعة كاما بجرع 5، 10، 30، 50 راد ولمدد النمو المختلفة وبلغت افضل زيادة في الفعالية 59.991 مايكروغرام/ دقيقة / ملغرام بروتين بعد 90 يوما من تعرض الكالس لجرعة 5 راد مقارنة بـ 43.892 مايكروغرام/ دقيقة/ ملغرام بروتين للانزيم المستخلص من الكالس غير المعرض (معاملة المقارنة)، بينما ادت معاملة الكالس بالجرع الاشعاعية 70 و 90 راد الى موت اكثر من نصف خلايا الكالس المستحدثة تقريباً ومن ثم انخفاض كبير في الفعالية النوعية لانزيم DHFR (الجدول2).

محتوى الفوليت الكلي

قدرت كمية الفوليت الكلية المستخلصة من الكالس المعرض وغير المعرض على أساس مايكروغرام/ غرام وزن طري اذ توضح النتائج ان كمية الفوليت الكلية المستخلصة من الكالس المعرض لجرع 5 و 10 و 30 و 50 راد قد ازدادت مع زيادة مدد النمو، أدت الجرع العالية 70 و 90 راد أدت إلى انخفاض في كمية الفوليت الكلية استناداً إلى معاملة المقارنة (الوسط القياسي).

اتخذت الزيادة او النقصـــان في كمية الفوليت للكالس المعرض لجرع مختلفة أنماطاً مشـــابهة لأنماط الزيادة او النقصان في الفعالية النوعية لانزيم DHFR (الجدول 2) .

الجدول (2): الفعالية النوعية لانزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز والكمية الكلية للفوليت المستخلصة من كالس سيقان نبات الحبة السوداء بعد مدد نمو مختلفة من تعريضه لجرع مختلفة من اشعة كاما•

الجرع الإشعاعية (راد)	الفعالية النوعية لانزيم DHFR (مايكرو غرام/ دقيقة/ ملغرام بروتين)*			كمية الفوليت الكلية (مايكروغرام/ غرام وزن طري)		
	عمر الكالس (يوم)			عمر الكالس (يوم)		
	30	60	90	30	60	90
معاملة المقارنة (0.0)	42.421 ±0.031	43.422 ±0.012	43.892 ±0.011	1.001 ±0.031	1.452 ±0.091	1.892 ±0.123
5	56.321 ±0.021	58.30 ±0.121	59.991 ±0.020	2.252 ±0.033	3.591 ±0.032	4.421 ±0.071
10	50.231 ±0.011	51.421 ±0.008	53.421 ±0.131	2.011 ±0.032	3.011 ±0.022	3.981 ±0.031
30	45.331 ±0.112	46.621 ±0.023	48.801 ±0.056	1.421 ±0.110	2.042 ±0.081	2.441 ±0.001
50	43.221 ±0.022	43.926 ±0.089	44.201 ±0.210	1.042 ±0.081	1.522 ±0.002	1.942 ±0.008
70	38.240 ±0.003	38.842 ±0.014	**	0.981 ±2.023	1.021 ±0.021	**
90	35.211 ±0.023	35.325 ±0.099	**	0.251 ±0.078	0.264 ±0.066	**

* الفعالية النوعية للانزيم: كمية الانزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحدة من مادة NADPH خلال دقيقة واحدة من التفاعل لكل ملغرام بروتين.

** موت معظم خلايا الكالس. ± الخطأ القياسي. •كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات

تأثير مشابهات الفوليت في فعالية انزيم DHFR

أدت إضافة كل من الترايميثوبريم او الامينوبترين بتركيز 10^{-1} مولار إلى الأوساط الغذائية التي تنمو فيها الكالس إلى تثبيط فعالية انزيم DHFR بنسبة 97% بعد مدة نمو 60 يوماً من نقله إلى تلك الأوساط مقارنة بالوسط القياسي (الجدول3). ويشير الجدول أيضاً ان نسبة التثبيط للامينوبترين والترايميثوبريم انخفضت إلى 50 و 30% على التوالي عند إضافتهما الى الأوساط الغذائية التي تنمو فيها الكالس المعرض لأشعة كاما وبجرعة 5 راد، هذا من ناحية ومن ناحية اخرى وجد ان إضافة كل من الحاوي على انزيم (invitro) الامينوبترين او الترايميثوبريم بتركيز 10-1 مولار إلى محلول التفاعل المستخلص من الكالس غير المعرض للأشعة الى تثبيط الفعالية 100% مقارنة بالوسط DHFR القياسي، ووجد ان نسبة التثبيط انخفضت الى 70 و 80% للامينوبترين والترايمثوبريم على التوالي المستخلص من الكالس المعرض لأشعة كاما بجرعة 5 راد وبعد 60 DHFR في حالة استخدام انزيم يوماً من بدء التعريض للأشعة (الجدول4).

المستخلص من كالس سيقان نبات الحبة السوداء DHFR الجدول (3): الفعالية النوعية لانزيم المدعم بـ10-6 مولار MS بعد 60 يوماً من تعريضه لاشعة كاما (5 راد) ونموه في وسط (invivo) و 10-1 مولار من مشابهات الفوليت D-من 2,4)

DHFR المعاملاتالفعالية النوعية لانزيم

(مايكروغرام/ دقيقة/ ملغرام بروتين)النسبة المئوية للتثبيط (%)معاملة المقارنة* (0.0)43.822 ± كالس غير مشعع + الامينوبترين1.822 ± 0.03296كالس مشعع + الامينوبترين0.011021.235 + كالس غير مشعع + الترايميثوبريم1.525 ± 0.02197كالس مشعع0.00452 ± المستخلص من الكالس النامي في وسط DHFR الترايميثوبريم30.322 ± 0.03331* فعالية انزيم الخطأ القياسي. (كل قيمة تمثل معدل ثلاث ± .D-المدعم بـ10-6 مولار من 2,4 MS مكررات

في محلول التفاعل DHFR الجدول (4): تأثير مشابهات الفوليت 10-1) مولار) في فعالية انزيم المستخلص من كالس سيقان نبات الحبة السوداء بعد مرور 60 يوماً من تعريضه لأشعة (invitro) كاما (5 راد)

DHFR المعاملاتالفعالية النوعية لانزيم

± (مايكروغرام/ دقيقة/ ملغرام بروتين)النسبة المئوية للتثبيط (%)معاملة المقارنة* (0.0)31.234 ± كالس غير مشعع + الامينوبترين0.0100كالس مشعع + الامينوبترين0.02309.525 ± كالس غير مشعع + الترايميثوبريم0.0100كالس مشعع + الترايميثوبريم0.021706.222 المدعم بـ 6-10 MS المستخلص من الكالس النامي في وسط DHFR فعالية انزيم *0.00380 الخطأ القياسي. (كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات ± .D-مولار من 2,4

تأثير مشابهات الفوليت على كمية الفوليت الكلية

يشير الجدول (5) إلى ان الإشعاع بجرعة 5 راد سبب زيادة في مقاومة الكالس لمشابهات الفوليت الامينوبترين والترايميثوبريم عند إضافتهما إلى الأوساط الغذائية بتركيز 1- 10 مولار، وان نسب التثبيط انخفضت الى 51 و 30% للامينوبترين والترايميثوبريم على التوالي وجاء الانخفاض في نسبة التثبيط مقارباً لذلك الانخفاض في نسب تثبيط فعالية انزيم الداي هيدروفوليت رديكتيز (الجدول 3 و4).

الجدول (5): تأثير مشابهات الفوليت 10-1) مولار) في كمية الفوليت الكلية المستخلصة من كالس) سيقان نبات الحبة السوداء بعد مرور 60 يوماً من تعريضه لأشعة كاما (5 راد)

DHFR المعاملاتالفعالية النوعية لانزيم

± (مايكروغرام/ دقيقة/ ملغرام بروتين)النسبة المئوية للتثبيط (%)معاملة المقارنة* (0.0)1.521 كالس غير مشعع + الامينوبترين0.055 ± 0.05296كالس مشعع + الامينوبترين0.01200.744 + كالس غير مشعع + الترايميثوبريم0.013 ± 0.02299كالس مشعع0.10051 ± MS الترايميثوبريم1.066 ± 0.04230* كمية الفوليت الكلية المستخلصة من الكالس النامي في وسط الخطأ القياسي. (كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات ± .D-المدعم بـ10-6 مولار من 2.4

المناقشة

استخدمت الطفرات في تربية النباتات من اجل زيادة التغيرات الوراثية في النباتات. المطفرات هي العوامل المسببة لحدوث الطفرة وتكون إما مواد كيمياوية (18) او عوامل فيزياوية كاشعة كاما والاشعة فوق البنفسجية والأشعة السينية (4) أشارت نتائج الدراسات السابقة وجود تأثير لأشعة كاما

بجرعات مختلفة في الوزن الطري لكالس نبات الحبة السوداء ومحتوى الزيادة من البروتين وهذا يؤكد بان التعرض لأشعة كاما لا يؤدي إلى ،(6) RNA و DNA والأحماض النووية بنوعيها .تغير في الصفات المظهرية للنباتات فقط وإنما يؤدي إلى تغير في محتواها من المركبات (5، 19) وكمية الفوليت المستخلصة من كالس DHFR ان أنماط الزيادة او النقصان في الفعالية النوعية لانزيم نبات الحبة السوداء المعرض لجرعات إشعاعية مختلفة جاءت مقاربة لأنماط الزيادة والنقصان في والبروتين خلال مراحل النمو المختلفة في الدراسة السابقة (6) RNA و DNA محتوى الخلايا من في بناء التراهيدروفوليت التي تتحول بدورها إلى المساعدات الانزيمية DHFR وهذا يؤكد دور انزيم للفوليت ذي الدور الهام في تفاعلات أيضية متعددة لبناء نيوكليوتيدات البيورين والبريمدين وبعض وكذلك في DNA دوراً مهماً ورئيساً في بناء DHFR الأحماض الامينية (20) وبذلك يقدم انزيم .المحافظة على مستوى الفوليت في جسم الكائن الحي (3)

لمشابهات الفوليت اهمية حيوية كبيرة وذلك لاستخدامها مضادات حيوية لعمليات ايضية (18). يعمل في خلايا الكائنات الحية وذلك للتشابه DHFR الامينوبترين والترايميثوبريم على تثبيط فعالية انزيم بين تركيبها وتركيب حامض الفوليت (10,21). تشير نتائج هذه الدراسة ان تأثير كل من الامينوبترين والترايميثوبريم (بتركيز 10-1 مولار) في نمو خلايا كالس نبات الحبة السوداء أمكن التقليل منه وذلك من خلال تعريض خلايا الكالس لأشعة كاما بجرعة 5 راد قبل إضافة تلك المشابهات إلى الأوساط الغذائية التي ينمو عليها الكالس، وهذا بدوره أدى إلى استعادة في كمية الفوليت من الكالس المعرض .مقارنة بكمية الفوليت للكالس غير المعرض والذي ينمو على الأوساط الحاوية على تلك المشابهات ان المقاومة التي تبديها خلايا الكالس لمشابهات الفوليت ربما يعود إلى ان أشعة كاما سببت قلة الفة .(و2223) DHFR المثبط للانزيم او قلة في نفاذية جدار الخلية للمثبط او زيادة في مستويات انزيم

نستنتج مما سبق بان التعرض لأشعة كاما وبجرع معينة أدت إلى زيادة محتوى خلايا كالس نبات DHFR وكمية الفوليت وزيادة في فعالية انزيم (6) RNA و DNA الحبة السوداء من البروتين و مع اظهار مقاومة معينة لمشابهات الفوليت. وبذلك نتوقع بان التعريض لأشعة كاما قد سببت تغيرات .وراثية في الكالس والتي ربما أدت إلى ظهور هذه الحقائق الجديدة في هذا المجال

Reference:

1. Mouillon J. M.; Ravanel S.; Douce R. and Rebeille F., Biochem. J., 363: 313 – 319 (2002).

2. Basset G.J.C.; Ouinlivan E.P.; Gregory J.F. and Hanson A. D., Crop Sci., 45: 449 – 453 (2005).

3. Bailrgley L.B.; Gail C.R. and Gail P.A.K., Sci. J. Nutr., 133: 1961 – 1968 (2003).

4. محمد، فريد احمد، تطبيق الإشعاع في فسيولوجيا النبات. وقائع الدورة التدريبية حول استخدام الإشعاع والنظائر المشعة في الزراعة وعلوم الأحياء نظمتها الهيئة العربية للطاقة الذرية لتونس ومصرفي القاهرة للمدة 3 – 14 / 7/ 1993.

5. مرتضى، عبد القادر اسكندر، مقارنة صنفي القطن أشور وكركر 310 واستجابتهما لتأثير أشعة كاما في مظاهر وإنتاجية النباتات، رسالة ماجستير، كلية التربية جامعة الموصل، العراق (2001).

6.عبود، ساجدة عزيز والدليمي، حكمت مصطفى مجلة التربية والعلم (قيد الطبع) 2007

7.مصطفى، رأفت أنور كمال، مجلة الذرة والتنمية، 7: 30 – 41. (1995)

8. كاظم، خالد خورشيد: الإشعاع الحياتي، دار الحكمة للطباعة والنشر جامعة الموصل (1991)

9. عبود، ساجدة عزيز، دور حامض الفولك في بناء البريميدينات والبيورينات في كالس نبات الخسأطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق (1997).

10. الدليمي، حكمت مصطفى وعبود، ساجدة عزيز، مجلة العلوم الرافدين، المجلد 7، العدد2: 1-13 (2006).

11. Arnon D.I. and Hoagland D.R., Biol. Rev., 19 – 55 – 67 (1944).

12. البكر، رحاب عبد المجيد حامد عبد الله، دور بعض منظمات النمو القياسية والمصنعة حديثاً في استحداث ونمو وتمايز الكالس من نبات الحبة السوداء ومستوى المركبات الفعالة فيها، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق (2002).

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

14. Osborne M.J. and Huennekeus F.M., J. Biol. Chem., 233 : 969 – 974 (1958).

15. Mohammad A. M.S.; Al-Chalabi K.A. and Abood S.A., J.Exp. Bot., 40: 693 – 699 (1989).

16. Mathews C.K., Scimgeou K.G. and Hueunekens F.M., Methods in Enzymology, VI: 364 – 368.

17. Association of Official Agricultural Chemists, 7th ed., Washington D.C. (1950).

18. الجلبي، قصي عبد القادر، الأحماض النووية، دار الكتب للطباعة والن خصص العائلي والتحول التعايشية المهندسة وراثياً، رسالة ماجستير Rhaizobia الوراثي بين نباتات البرسيم الأبيض وبكتريا، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق (2002).