تأثيرات نوعية الوسط الغذائي وكثافات زراعة المعلقات الخلوية لنبات فول الصويا بطريقة الطمر في قطرات الاكار في تكوين بادئات الكالس

مزاحم قاسم الملاح سهلة محمد زيدان
قسم علوم الحياة/كلية التربية/جامعة الموصل

الخلاصة

استحدثت مزارع كالس سيقان فول الصويا *Glycine max* والذي امتاز بلونه الأخضر وبنيته الهشة في الوسطين MS و B5 الصلبة المدعمة بإضافات متداخلة من منظمات النمو، بلغت نسبة استحداثه ٨٧% في وسط MS الصلب المدعم بإضافة نفثالين حامض الخليك Naphthalene acetic acid (NAA) والبنزايل ادنين Benzyl adenine (BA) متفوقا عن وسط B5 الصلب المدعم بنفس هذه الإضافات. ونجح استخدام كالس السيقان في إنشاء مزارع المعلقات الخلوية، إذ زرعت الكثافات ٧,٣×١٠° و ٦,٩×١٠° و ٤,٩×١٠° خلية/مل في وسط MS بينما زرعت الكثافات ٥,٠×١٠° و ٣,٨×١٠° و ١,٨×١٠° خلية/مل في وسط B5 بتقانة الطمر في قطرات الاكار المتعددة، تراوحت حيوية خلايا المعلقات الخلوية خلال نموها في وسط MS بين ٤٧-٨١% وفي وسط B5 تراوحت بين ٣٠-٥٣%. ودخلت الخلايا المطمورة في سلسلة من الانقسامات المتتالية وتكوينها للمستعمرات الخلوية البالغ عددها الكلي ١٩٨٩ مستعمرة في وسط MS الصلب وتطورت أغلبيتها مكونة بدايات الكالس بواقع ٨٥%، وقد تأثرت أعداد بدايات الكالس المشتقة من المستعمرات الخلوية على كثافة الزرع ونوعية الوسط.

المقدمـة

أشارت بعض الدراسات التي تناولت الزراعة النسيجية لنباتات فول الصويا (Soybean) *Glycine max* وجود صعوبات كبيرة تواجه استجابتها في الوسط الزرعي (Moore وCollins ، ١٩٩٣)، بالرغم من محاولة بعض الباحثين في اعتماد أصناف مختلفة بهدف التغلب على هذه المشاكل إلا أن عامل الصنف لم يساهم في تجاوزها. وذكرت دراسة النعيمي و رشيد (١٩٩٦ب) أن عملية استحداث الكالس من أجزاء بادرات الصنف William من فول الصويا واجهت مثل هذه الصعوبات، ولجأ بعض الباحثين أحيانا إلى تعريض مزارع هذا الكالس إلى أشعة كاما بهدف أحداث تغايرات وراثية فيه (البياتي، ٢٠٠٢) وتمكنت إحدى الدراسات من التغلب على صعوبات الحصول على مزارع الكالس من الأجزاء النباتية باستحداثه من الأجنة غير الناضجة (النعيمي وآخرون، ١٩٩٦أ). واتضح أن النباتات الناتجة من هذا الكالس كانت مقاومة لبعض الإصابات الفطرية (Jin وآخرون، ١٩٩٦) أو اللجوء في أحيان أخرى لاستخدام كالس الأجنة اللاجنسية (المتكونة على الكالس المشتق من مزارع المعلقات الخلوية) لفول الصويا (Finer و Nagasawa، ١٩٨٨). وقد نجحت إحدى الدراسات الحديثة من التغلب على مشاكل استحداث الكالس وتمايزه من خلال إنشاء مزارع المعلقات الخلوية من كالس سيقان فول الصويا وزراعتها بتقنية قطرات الاكار المتعددة (النعمة، ٢٠٠٥)، ونجحت دراسة مماثلة في إنتاج نباتات كاملة من كالس المعلقات الخلوية لنباتات الباقلاء *Vicia faba* بتقنية قطرات الاكار المتعددة (الملاح و زيدان، ٢٠٠٤).

وتهدف الدراسة الحالية إلى التعرف على دور نوعية الوسط الغذائي وكثافة الزراعة على تكوين بادئات الكالس.

مواد البحث وطرائقه

عقمت بذور الصنف المحلي (إباء) من فول الصويا *Glycine max* تعقيما سطحيا بغمرها في الكحول الاثيلي ٩٦% (البياتي،٢٠٠٢). واستخدمت البادرات المعقمة الناتجة على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو مصدرا للحصول على القطع النباتية.

تكوين مزارع كالس السيقان: استخدمت بادرات فول الصويا *Glycine max* الناتجة من البذور المعقمة سطحيا والنامية في وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو بعمر ثلاثة أسابيع مصدرا لاستئصال القطع النباتية لاستحداث الكالس منها. واعتمد وسط MS الصلب (Murashige وSkoog، ١٩٦٢)

تأريخ تسلم البحث ٢٠٠٨/٤/١٥ وقبوله في ١٩ /٦/ ٢٠٠٨

ووسط B5 الصلب (Gamborg وآخرون، ١٩٦٨) المدعم كل منها بإضافة ٢,٠ ملغم/لتر من البنزايل ادنين (BA)، ١,٠ ملغم/لتر نفثالين حامض ألخليك (NAA) لاستحداث مزارع الكالس، وضعت أجزاء السيقان بطول ٢ سم المستأصلة من البادرات المعقمة على سطح ٣٠ مل من وسط الاستحداث في دوارق حجم ١٥٠ مل وبمعدل ثلاث قطع/دورق. وحفظت العينات النباتية في غرفة الزرع بدرجة حرارة ٢٥ ± ٢ درجة سيليزية وإضاءة ٢٠٠٠ لوكس (البياتي، ٢٠٠٢)، مع الإدامة الدورية للكالس مرة كل ٣ أسابيع على الوسط نفسه لإكثاره واستخدامه في إنشاء مزارع المعلقات الخلوية.

إنشاء مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان: اعتمدت أوساط استحداث الكالس بحالتها السائلة لإنشاء مزارع المعلقات الخلوية بعد تجهيزها بإضافات متداخلة مشتركة من نفثالين حامض ألخليك (NAA) والبنزايل ادنين (BA) وانتخاب الأوساط الآتية :

MS + ١,٠ ملغم / لتر NAA + ٢,٠ ملغم / لتر BA	B5 + ١,٠ ملغم / لتر NAA + ٢,٠ ملغم / لتر BA
MS + ٠,٢ ملغم / لتر NAA + ٠,٥ ملغم / لتر BA	B5 + ٠,٢ ملغم / لتر NAA + ٠,٥ ملغم / لتر BA
MS + ٠,٥ ملغم / لتر NAA + ٥,٠ ملغم / لتر BA	B5 + ٠,٥ ملغم / لتر NAA + ٥,٠ ملغم / لتر BA

وأنشئت مزارع المعلقات الخلوية بوضع قطع بوزن غرام واحد/قطعة من كالس السيقان الهش بعمر ٢١ يوما في ستة دوارق زجاجية حجم ٢٥٠ مل يحتوي كل منها على ٥٠ مل من احد الأوساط المشار إليها. وضعت هذه المزارع في الحاضنة الهزازة (New Brunswicks, USA) بظروف ظلام تام ودرجة حرارة ٢٨ درجة سيليزية وبسرعة دورانية ١٥٠ دورة/دقيقة لمدة ٢٤ ساعة (Rôper، ١٩٧٩). رشحت المزارع المتكونة من خلال منخل بلاستيكي معقم حجم ٤٦ مايكروميتر(Plant Genetic Manipulation Group, Nott. Univ. U.K) لإزالة الكتل الخلوية غير المفككة والسماح للخلايا المفردة من ذات الحجم بالمرور من خلالها، حفظت المزارع في الظروف السابقة وتمت إدامتها مرة كل ثلاثة أيام بإزالة الدوارق من الحاضنة ووضعها مستندة بصورة مائلة للسماح لركود الخلايا، بعدئذ سكب الوسط القديم بعناية واستبداله بحجم مماثل من الوسط الجديد بإضافته إلى الخلايا المترسبة، أعيدت مزارع المعلقات الخلوية إلى الحاضنة الهزازة بنفس ظروف التحضين التي ذكرت سابقا.

تقدير حيوية خلايا المعلق الخلوي: مزج ملليتر واحد من مزرعة المعلق الخلوي مع ملليتر واحد من محلول ٠,٥% من صبغة الايفان الزرقاء (BDH Chemical Ltd Pool U.K) لمدة ١٠ دقائق، حسبت حيويتها من معرفة أعداد الخلايا غير المصبوغة والمصبوغة عند فحصها بالمجهر الضوئي (Antoni وآخرون، ١٩٨٠).

زراعة المعلقات الخلوية بطريقة الطمر في قطرات الاكار المتعددة: اخذ ملليتر واحد من مزرعة المعلقات الخلوية في وسط MS بالكثافات ٣,٧ × ١٠ ^{٥} و ٦,٩ × ١٠ ^{٥} و ١٠ × ١٠ ^{٥} خلية/مل. وكذلك اخذ حجم مماثل من مزرعة المعلقات الخلوية في وسط B5 بالكثافات ٥ × ١٠ ^{٥} و ٣,٨ × ١٠ ^{٥} و ١,٨ × ١٠ ^{٥} خلية/مل. أضيف لكل منها ملليتر واحد من محلول ٣% من الاكار (Fluka U.K) المعقم السائل الموجود في حمام مائي بدرجة ٤٠ درجة سيليزية، وخلط المزيج بسرعة وسحب المزيج بواسطة ماصة معقمة ووزع بهيئة قطرات متماثلة وبواقع عشرة قطرات/طبق بتري بلاستيكي قطر ٩ سم (Sterilin U.K)، تركت الأطباق مفتوحة داخل كابينة الزرع لإتمام تصلب القطرات بعدئذ أضيف إلى كل طبق ٥ ملليتر من وسط الإنشاء المناسب MS أو B5 (Dixon، ١٩٨٥). غطيت الأطباق بأغطيتها وسدت بالبارافيلم. وحفظت العينات بدرجة حرارة ٢٥ درجة سيليزية وشدة إضاءة ٧٠٠-٨٠٠ لوكس لمدة ١٦ ساعة إضاءة، فحصت العينات دوريا لملاحظة ابتداء انقسام الخلايا وتواصلها وبدء تكوين المستعمرات الخلوية وتطورها.

النتائج والمناقشة

تكوين مزارع كالس السيقان: أظهرت قطع سيقان بادرات فول الصويا *G. max* عند زراعتها على الوسط MS + ٢,٠ ملغم/لتر BA + ١,٠ ملغم/لتر NAA الصلب تفوقها في استحداث الكالس مقارنة باستحداثه على وسط B5 الصلب المدعم بإضافات متماثلة من BA ، NAA (الجدول، ١)،

وبالرغم من تباين نسب الاستحداث إلا أن الكالس المتكون اتصف بقوامه الهش ولونه الأخضر الزاهي في كلا الوسطين واستمر في نموه في وسط الاستحداث نفسه.

الجدول (١): التباين في تكوين مزارع كالس سيقان نباتات فول الصويا *Glycine max* في الوسطين MS و B5 المدعمة بإضافات متماثلة من البنزيل ادنين (BA) ونفثالين حامض ألخليك (NAA).

وسط الاستحداث (ملغم/لتر)	عدد القطع المزروعة /المستحدثة للكالس	الاستحداث(%)
MS0* (مقارنة)	٢٥/صفر	صفر
1.0NAA + 2.0BA+MS	٣٩/٤٥	٨٧
B50* (مقارنة)	٢٠/صفر	صفر
1.0NAA +2.0 BA+B5	١٥/٣٠	٥٠

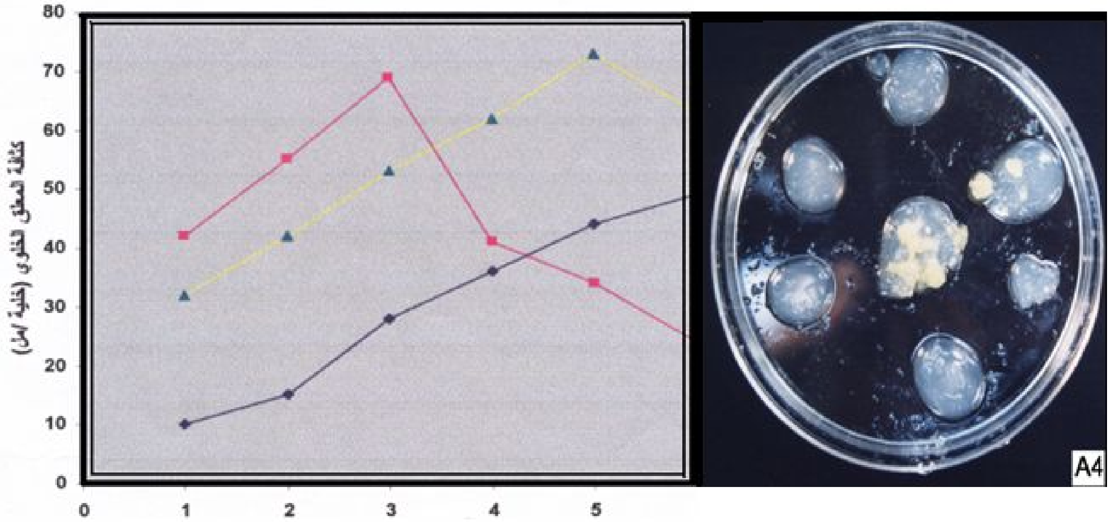
* : أوساط خالية من منظمات النمو

إنشاء مزارع المعلقات الخلوية في أوساط MS، B5 السائلة: أظهرت النتائج الأولية نجاح إنشاء المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان الهش في أوساط استحداث الكالس ذاتها لكن بحالتها السائلة. واتخذت خلايا هذه المزارع في نموها نمطا واضحا في جميع الأوساط بالرغم من التباين في تراكيز الإضافات من منظمات النمو فيها. وسجلت أعلى كثافة خلايا في هذه المزارع في وسط MS الحاوي ٢,٠ ملغم/لتر من البنزايل ادنين BA، ١,٠ ملغم/لتر نفثالين حامض ألخليك NAA (الشكل A1). يليها وسط MS الذي انخفضت فيه الإضافات من نفسها منظمات النمو (الشكل A2) أعقبه الوسط MS المدعم بإضافة ٥,٠ ملغم/لتر من البنزايل ادنين BA بوجود ٠,٥ ملغم/لتر من نفثالين حامض ألخليك NAA إذ سجلت أدنى كثافة للخلايا في اليوم السادس من عمر المزرعة (الشكل A3). وأظهرت نتائج إنشاء مزارع المعلقات الخلوية في أوساط B5 المدعمة بنفس الإضافات من أنواع ومستويات منظمات النمو، التي دعمت بها أوساط MS، أن خلايا هذه المزارع اتخذت في نموها نمطا اقل نشاطا في انقسامات خلاياها مقترنا بانخفاض كثافتها في المراحل العمرية المختلفة للمزرعة، إذ اظهر الوسط B5 المدعم بإضافة ٢,٠ ملغم/لتر بنزايل ادنين، ١,٠ ملغم/لتر نفثالين حامض ألخليك NAA أعلى كثافة للخلايا بلغت ٥,٠×١٠° خلية/مل في اليوم الرابع من عمر المزرعة (الشكل B1) في حين انخفضت كثافة خلايا المزرعة في الوسط الثاني من B5 لتصل إلى ٤,٠ ×١٠ ° خلية/مل في اليوم الرابع من عمر المزرعة (الشكل B2) في حين اظهر الوسط الثالث من B5 تحفيزا محدودا لانقسام الخلايا إذ بلغت أعلى كثافة ٣,٠×١٠° خلية/مل في اليوم الثالث من عمرها (الشكل B3).

تكوين بادئات الكالس من زراعة المعلقات الخلوية بطمرها في قطرات الاكار المتعددة: أكدت نتائج زراعة كثافات مختلفة من خلايا المعلقات الخلوية في الأوساط الثلاثة من MS المتباينة في إضافات منظمات النمو إليها أنها جميعا شجعت تكوين إعداد كبيرة من المستعمرات الخلوية التي تطور قسما كبيرا منها إلى بادئات الكالس (الشكل B4) حيث تراوحت إعدادها ٣١٩-٧٨١ بادئة كالس (الجدول، ٢)، وعند استبدال الوسط MS واستخدام B5 بدلا منه مع المحافظة على نفس الإضافات من NAA و BA فقد أظهرت نتائج زراعة كثافات مختلفة من المعلقات الخلوية في أوساط B5 أنها شجعت بدرجة اقل تكوين أعداد من المستعمرات الخلوية والتي تطورت ٥٠% منها إلى بادئات صغيرة من الكالس (الشكل B4) وتباينت إعدادها في الأوساط المختلفة (الجدول، ٢)، وتوضح هذه البيانات دور الكثافة المزروعة من المعلقات الخلوية في إعداد بادئات الكالس المتكونة في هذين النوعين من الأوساط وكذلك تأثير نوعية الوسط الغذائي المستخدم لزراعة هذه المعلقات، واتصفت بادئات الكالس المتكونة في جميع هذه الأوساط بأحجامها الصغيرة ولونها الأخضر وحصول زيادة في أحجامها وبزوغها من قطرات الاكار مسببة تشققه. ويستخلص من هذا أن للكثافة المزروعة دورا بارزا في إعداد بادئات الكالس المتكونة بغض النظر عن تأثيرها على أحجام هذه البادئات.

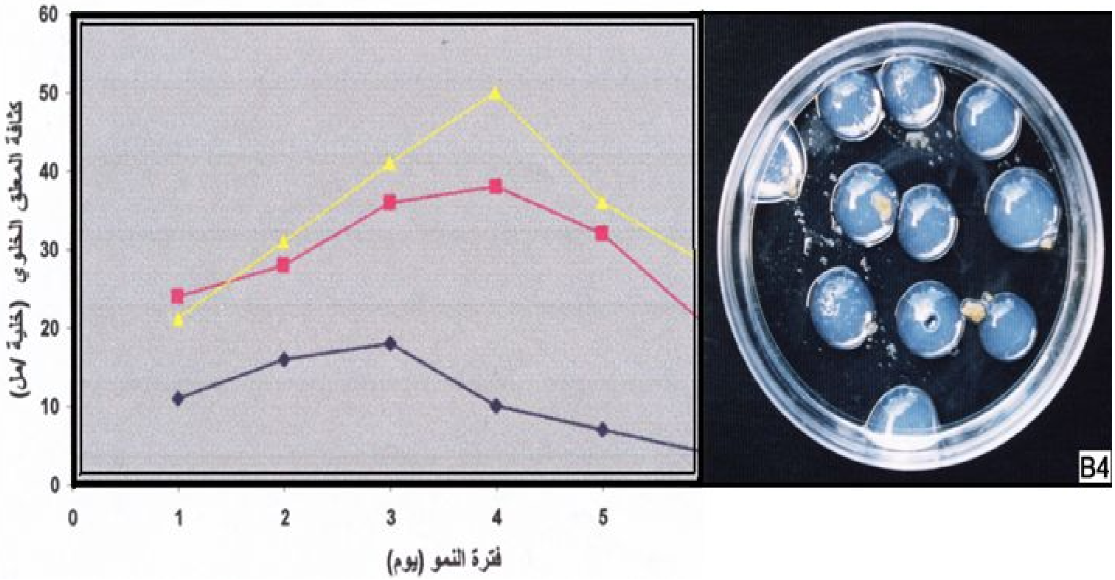
إن العديد من الدراسات والتقارير أشارت إلى العقبات التي تواجه زراعة أنسجة النبات ألبقولي فول الصويا *Glycine max* في الوسط الزرعي (Gamborg وآخرون، ١٩٨٣) فضلا عن أن عامل النوع النباتي لم يساهم في حل هذه المشكلة (Moore و Collins، ١٩٩٣) . وبالرغم من ذلك فقد تمكن بعض الباحثين من تكوين مزارع كالس الأوراق الفلقية لفول الصويا صنف William في وسط MS الصلب المدعم بإضافة ٢,٠ ملغم/لتر BA وبوجود ١,٠ ملغم / لتر NAA (النعيمي ورشيد ،

١٩٩٦) ، وذكرت دراسة أخرى أن إضافة Hygromycine في الوسط الغذائي وتحضين المعلق الخلوي المشتق من كالس الأجنة الناضجة لفول الصويا مع بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* أدى إلى تكوين قطع الكالس وتمايزه وتكوين الأفرع الخضرية خلال أربعة أسابيع من الزراعة (Hany و آخرون، ٢٠٠٢).



الشكل (١): نمو مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا في أوساط MS السائلة وتكوينها بادئات الكالس في قطرات الاكار المتعددة

(A1) الوسط الأول من MS (A2) الوسط الثاني من M
(A3) الوسط الثالث من MS (A4) بادئات الكالس المتكونة



الشكل (٢): نمو مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا في أوساط B5 السائلة وتكوينها بادئات الكالس في قطرات الاكار المتعددة

(B1) الوسط الأول من(B5 (B2) الوسط الثاني من B5
(B3) الوسط الثالث من B5 (B4) بادئات الكالس المتكونة

أدت تغذية المعلق الخلوي لفول الصويا صنف Merrill بالفورمالديهايد [^{14}C] أو المحلول المغذي كان له تأثير واضح على عمليات ايض الخلايا المفردة وعلى الوزن الطري للكالس الناتج منها (Giese وآخرون، ١٩٩٤) . ومن المحتمل أن يفسر هذا النجاح إلى توفر متطلبات عملية استحداث الكالس في الوسط الزرعي المستخدم والى استجابة هذا الصنف مما يشير إلى حيوية خلايا المعلقات

الخلوية في الوسط ألزرعي ،وأكدت إحدى الدراسات أن إنزيمات البروكسيديز تعمل على ايونات الألمنيوم مما أدى إلى تأثر سحب هذه الايونات وانعكس هذا التأثير المشجع في حصول انقسام خلايا المعلقات الخلوية المشتقة من كالس فول الصويا خلال أربعة ساعات من الزراعة في الوسط الغذائي وامتازت الخلايا بحيويتها العالية بالرغم من وجود تراكيز عالية من هذه الايونات في الوسط الغذائي (Rath وBraz، ٢٠٠٠).

بالرغم من اختلاف تركيب أوساط MS ، B5 في بعض المكونات إلا أن كليهما شجعا إنشاء المعلقات الخلوية ، ومن المؤكد أن بنية الكالس الهشة كانت احد عوامل نجاح إنشاء هذه المزارع واحتوائها على أعداد كبيرة من الخلايا المفردة ، وهذا يفسر نشاط الانقسامات الخلوية وتواصلها حتى تكوينها قطع صغيرة من الكالس ويحتمل أن يعزى هذا إلى الفعل المنشط الحاصل بين المجاميع الكبيرة من الخلايا المفردة (Cuddihy و Bottino،١٩٨٢). فضلا عن أن محتوى هذا الوسط من منظمات النمو المضافة كان مناسبا لانقسامات الخلايا بأفضل حالاتها ترتب عنها الحصول على إعداد كبيرة من المستعمرات الخلوية ، وقد أشارت بعض المصادر (Oswald و آخرون، ١٩٧٧) أن نسبة ١ : ٢ من منظمات النمو في أوساط إنشاء مزارع المعلقات الخلوية يعد أمرا ضروريا تتأثر به أعداد الخلايا الأحادية أو المنقسمة في هذه المزارع كما حصل في ألدراسة الحالية عند استخدام الوسط الأول من MS أو B5. ويعتقد أن الظروف المشار إليها سابقا متداخلة مع بعضها أو في تأثيرها المنفرد أدت إلى ارتقاء الوسط MS عن الوسط B5 في تكوين مزارع المعلقات الخلوية بالرغم من تماثل التراكيز المضافة لذات منظمات النمو المستخدمة. ومثلما ارتقى الوسط MS السائل في إنشاء مزارع المعلقات الخلوية، فقد تفوق أيضا في تكوين بادئات الكالس عند زراعة هذه المعلقات في قطرات الاكار. والدليل الآخر في ارتقاء الوسط MS يكمن بعامل إضافي متعلق بالكثافات المختلفة من الخلايا المزروعة، مما انعكس على تطور المستعمرات الخلوية المتكونة إلى بادئات كالس وهذا يعزز تأثير نوعية الوسط المستخدم وكثافة الزراعة في نمط الانقسام الخلوي للمزرعة وناتجها من البادئات المتكونة.

INFLUENCE OF CULTURE MEDIA AND DENSITY OF SOYBEAN CELL SUSPENSION CULTURE BY MULTIPLE DROP ARRAY ON FORMING CALLUS PRIMORDIA

Mozahim K. Al-Mallah Sahla M. Zeadan
Dept. of Biology, College of Education, Univ. of Mosul

ABSTRACT

The present study established cell suspensions from the friable callus derived from the stem explant of soybean (*Glycine max* L.) seedlings. These suspensions of certain densities were cultured by embedding in agar using MS & B5 media supplemented with favorable level of Naphthalene acetic acid (NAA) and Benzyl adenine (BA) using Multiple Drop Array (MDA) technique. Culture density reached up to 7.3×10^5 cell/ml with viability between 47-81% and 4.1×10^5 cell/ml in B5 medium. Colonies were developed to form callus primordia and continued their subsequent growth so they increased in size to form small piece of callus in agar drops reached up to 85% in MS medium.

المصــادر

البياتي، فراس عباس (٢٠٠٢). أحداث التغايرات الوراثية في بذور ونباتات وكالس فول الصويا (*Glycine max* L.) (صنف إباء) باستخدام أشعة كاما وتأثيراتها على المحتوى البروتيني ونسبة الزيت. رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل.

الملاح، مزاحم قاسم وزيدان، سهلة محمد (٢٠٠٤) تقنية قطرات الاكار المتعددة في إنتاج النباتات من زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان الباقلاء. مجلة التربية والعلم ١٦: ٣٥-٤٧ .

النعمة، قتيبة شعيب (٢٠٠٥). زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا *Glycine max* صنف إباء في قطرات الاكار المتعددة. مجلة التربية والعلم ١٧: ١٢٠-١٢٩.
النعيمي، عبد الله نجم ، الملاح، مزاحم قاسم ومحمد، عبد المطلب سيد(١٩٩٦أ). تكوين نباتات جديدة من كالس الأجزاء النباتية المختلفة لنبات فول الصويا *Glycine max* L. . مجلة مؤتة للبحوث والدراسات ١١: ١٠-٣٠ .
النعيمي، عبد الله نجم ورشيد، جميلة هزاع (١٩٩٦ب). استحداث الكالس من الأجزاء النباتية المختلفة لبادرات فول الصويا *Glycine max* L. لصنفي ٨٤ William , Weber. مجلة التربية والعلم ٣٦: ٥٣-٦٠ .
Moore, P. J. and G. B. Collins (1993). Transformation in soybean (*Glycine max* L.). Biotech. Agri. & Forestry, 23: 228-236.
Jin, H.; G. L. Fartman; Y. H. Huang; C. D. Nickell and J. M. Widholm (1996). Regeneration of soybean plants from embryogenic suspension cultures treated with toxic culture filtrate of *Fusarium solani* and screening of regenerants for resistance. Phytopath., 86: 714-718.
Finer, J. J. and A. Nagasawa (1988). Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max merrill*). Plant Cell, Tiss. & Org. Cult., 15: 125-136.
Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Planta., 15: 473-497.
Gamborg, O. L.; R. A. Miller and K. Ojima (1968). Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50: 151-158.
Rôper, W. (1979). Growth and cytology of callus and cell suspension cultures of *Vicia faba* . Z. Pflanzenphysiol., 93: 245-257.
Antoni, R. S.; J. P. Andrew, and C. W. Lioyd (1980). An improved procedure for the isolation and purification of protoplasts from carrot suspension culture. Planta 147: 283-286.
Dixon, R. A. (1985). Plant Cell Culture A Practical Approach IRL. Press Oxford, U.K.
Gamborg, O. L.; B. P. Davis, and R. W. Stahlhut (1983). Somatic embryogenesis in cell cultures of *Glycine* species. Plant Cell Repts., 2: 209-212.
Hany, A. S.; M. Khalafalla, and M. Ishimoto, (2002). Reproducible transformation in two grain legumes-soybean and azuki bean-using different systems. Cell & Mol. Biol. Letters, 7: 709-719.
Giese, M.; U. D. Bauer; C. Langebartels and H. J. Sandermann (1994). Detoxification of formaldehyde by the spider plant (*Chlorophytum comosum* L.) and by soybean (*Glycine max* L.) Cell-suspension cultures. Plant Physiol., 104: 1301-1309.
Rath, I. and W. Braz (2000). The role of lipid peroxidation in aluminium toxicity in soybean cell suspension cultures. Z. Naturforsch., 55: 957-964.
Cuddihy, A. E. and P. J. Bottino (1982). Winged-bean protoplasts: Isolation and culture to callus. Plant Cell Tiss. & Org. Cult., 1:201-209 .
Oswald, T. H.; A. E. Smith, and D. V. Philips (1977). Callus and plantlet regeneration from cell cultures of ladino clover and soybean. Physiol. Plant. 39: 129-134 .