تأثير توليفة جديدة من مكونات الوسط الغذائي MS في نشوء البراعم الأولية و الوزن الطري لنخلة التمر Phoenix dactylifera L. خارج الجسم الحي in vitro

أ.م. سميرة مؤيد يا سين
جامعة بغداد / كلية التربية للعلوم الصرفة إبن الهيثم
قسم علوم الحياة

الخلاصة

أجريت الدراسة على فسائل نخلة التمر (صنف الزهدي) (*Phoenix dactylifera* L.) و قد تمت دراسة نشوء البراعم الأولية و زيادة الوزن الطري لنماذج مزروعة بقطر 3 ملم من قلب فسائل بعمر 3 سنوات على الوسط الزرعي Murashige & skoog medium (MS) بإستخدام التراكيز 25% ، 50% ، 100% ، 125% من قوة الأملاح الكبرى و الصغرى و الحديد لوسط MS. كان أفضل تركيز للأملاح الكبرى على زيادة الوزن الطري للنماذج المزروعة 50% و للأملاح الصغرى 50% و للحديد المخلبي 100%. و كان هدف الدراسة هو إيجاد توليفة جديدة من مكونات وسط MS للزيادة في إنتاجية عدد البراعم و الوزن الطري.

تأثير توليفة جديدة من مكونات الوسط الغذائي MS في نشوء البراعم الأولية و الوزن الطري لنخلة التمر Phoenix dactylifera L. خارج الجسم الحي in vitro

أ.م.سميرة مؤيد ياسين

The effect of new blend of (MS) medium on the initiation of primary buds and the fresh weight for date palm *Phoenix dactylifera* L. *in vitro*

Assist. Prof. Samira Muayad Yaseen
Baghdad University / College of education for pure science
(Ibn Al Haitham) / Department of biology

Summary

This study was carried out on the offshoots of Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) , the variety Zuhdi. The initiation of primary auxillary buds and the fresh weight increasing was studied for samples having 3 mm diameter which taken from the heart of three-years old offshoot grown in MS culture medium by using the following concentrations: 25%, 50%, 75%, 100% and 125% from the strength of the macronutrient elements, micronutrient elements and iron chelate of MS medium. Samples which grown at 50% of macronutrient showed best results when the concentrations of micronutrients and iron chelate are 50% and 100% respectively. The aim of the present study is finding new blend of (MS) medium to increase the number of primary buds and the fresh weight.

تأثير توليفة جديدة من مكونات الوسط الغذائي MS في نشوء البراعم الأولية و الوزن الطري لنخلة التمر Phoenix dactylifera L. خارج الجسم الحي in vitro

أ.م.سميرة مؤيد ياسين

المقدمة

تعد نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. أحد أهم الأشجار التي تتمتع بأهمية غذائية و إقتصادية . [1] و هي من الأشجار ذوات الفلقة الواحدة Monocotyledonous . [2] فضلا عن كونها من أشجار الفاكهة مستديمة الخضرة أحادية الجنس ثنائية المسكن [1] و تنتشر زراعتها في مناطق واسعة من الشرق الأوسط و شمال أفريقيا. [2] و حديثا تم إنتشار زراعة نخيل التمر في إستراليا و جنوب أفريقيا و أميركا. [3] يعد العراق بشكل خاص من أقدم مواطن النخيل حيث يشغل فيه النخيل مساحة تقدر ب 101.500 ألف هكتار. [4] ويعود تاريخ زراعة نخيل التمر في وادي الرافدين إلى أكثر من 4000 سنة قبل الميلاد. [1] تعد زراعة الأنسجة Tissue culture من التقنيات المهمة التي إستعملت حديثا لإكثار النخيل . [5] حيث تم إعتبارها الطريقة الرئيسية لأغراض تجارية. [1] على الرغم من أن طريقة إكثار النخيل بالفسائل هي الطريقة المثلى ، ألا أن الأعداد التي يمكن الحصول عليها تكون قليلة فبذلك فإنها لا تلبي الحاجة للحصول على أعداد كبيرة من الفسائل و إنشاء بساتين النخيل و بشكل خاص للأصناف المرغوبة و النادرة ، فلذلك إتجه الباحثون إلى إستعمال تقنية زراعة الأنسجة النباتية في الإكثار الخضري لنباتات عديدة و منها نخيل التمر. [4] إن تقنية زراعة الأنسجة يعتمد نجاحها على توليفة الوسط الغذائي [1] فضلا عن ذلك أكدت الدراسة [2] على أن الوسط الغذائي هو من أهم العوامل المؤثرة في في زراعة أنسجة نخيل التمر خلال العقود الثلاث الأخيرة . [6] و من أكثر هذه الأوساط شيوعا هو وسط Murashige and Shoog medium (MS) .[7] لكون هذا الوسط يتميز بإحتوائه كل من المغذيات الكبرى Macronutrients كأملاح المغنسيوم و البوتاسيوم والكالسيوم ، حيث تضاف هذه الأملاح بتراكيز عالية) و

المغذيات الصغرى Micronutrients كأملاح النحاس و المنغنيز و الزنك و الحديد ، حيث تضاف بتراكيز أقل مقارنة مع تراكيز المغذيات الكبرى. [8]

طريقة العمل

أجريت هذه الدراسة في مختبر التقانة الأحيائية في كلية التربية – إبن الهيثم على نخلة التمر (الصنف زهدي *Phoenix dactylifera L.*) و لدراسة نشوء البراعم الأولية و زيادة الوزن الطري لنماذج مزروعة بقطر 3 ملم من قلب فسائل بعمر 3 سنوات على الوسط الزرعي MS كما موضح في جدول رقم (١) بإستخدام التراكيز 25% ، 50% ، 100% ، 125% من قوة الأملاح الكبرى و الصغرى و الحديد لوسط MS.

الكلمات المفتاحية : نخلة التمر . الوسط الغذائي MS . العناصر الكبرى . العناصر الصغرى

جدول (1): مكونات وسط أملاح MS

المواد	الصيغة الكيميائية	التركيز ($mg.L^{-1}$) أو %
العناصر الغذائية الكبرى Macronutrients elements		
نترات البوتاسيوم Potassium Nitarte	KNO_3	١٩٠٠
نتـرات الأمونيـوم Ammonium Nitrate	NH_4NO_3	١٦٥٠
كلوريد الكالسيوم المائي Calcium chloride Dihydrate	$CaCl_2.2H_2O$	٤٤٠
كبريتات المغنيسيوم المائية Magnesium sulfate Heptahydrate	$MgSO_4.7H_2O$	٣٧٠
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين Potassium phosphate dihydrate	KH_2PO_4	١٧٠
العناصر الغذائية الصغرى Micronutrient elements		
كبريتات المنغنيز المائية Manganese sulfate Tetra hydrate	$MnSO_4.4H_2O$	٢٢.٣٠
كبريتات الخارصين المائية	$ZnSO_4.7H_2O$	٨.٦

		Zinc sulfate Heptahydrate
٦.٢	H_3BO_3	حامض البوريك Boric acid
٠.٨٨	KI	يوديد البوتاسيوم Potassium Iodide
٠.٢٥	$NaMoO_4.2H_2O$	مولبيدات الصوديوم المائية Sodium molybdate Dihydrate
٠.٠٢٥	$CuSO_4.5H_2O$	كبريتات النحاس المائية Cupric sulfate Pentahydarte
٠.٠٢٥	$CoCl_2.6H_2O$	كلوريد الكوبلت المائي Cobalt chloride Hexahydrate
الحديد		
٢٧.٨	$FeSO_4.7H_2O$	كبريتات الحديدوز المائية Ferrous sulfate Heptahydrate
٣٧.٣	$Na_2EDTA.2H_2O$	أثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك ثنائي الصوديوم المائي (Ethylene dinitrilo) tetra acetic acid Disodium dihydrate
المركبات العضوية Organic Compounds		
٠.١	$C_{12}H_{17}ClN_4OSHCl$	ثايمين Thiamine-HCl B1
٠.٥	$C_8H_{11}NO_3.HCl$	باردوكسين Pyridoxine-HCl B6
٠.٥	$C_6H_5NO_2$	حامض النيكوتين Nicotic acid B3
١٠٠	$C_6H_6(OH)_6$	مايو-اينوسيتول Myo-Inositol
٢	NH_2CH_2COOH	كلايسين Glysine
%٣	$C_{12}H_{22}O_{11}$	سكروز Sucrose

و حضرت المحاليل القياسية (standard solutions) فحضر محلول الأملاح الكبرى تم فيه مضاعفة تراكيز الأملاح الكبرى 10 مرات لوسط MS و إذابتها في لتر ماء مقطر أما تحضير محلول الأملاح الصغرى فتم مضاعفة تراكيز الأملاح الصغرى لوسط MS 100 مرة و إذابتها في لتر من الماء المقطر. أما تحضير

الحديد المخلبي تم مضاعفة تراكيز الحديد المائية FeSO4.7H2O لوسط MS 50 مرة و إذابته في 500 مل من الماء المقطر على صفيحة ساخنة مازجة أيضا ثم سكب الحديد في الإناء الذي يحتوي على Na2EDTA بهدوء لتحضير لتر واحد من الحديد المخلبي . بعد ذلك تم تحضير وسط السيطرة الزرعي Control و تم تحضير 1 لتر منه و الجدول رقم (٢) يوضح وسط معاملة السيطرة Control.

جدول (2): وسط معاملة السيطرة Control

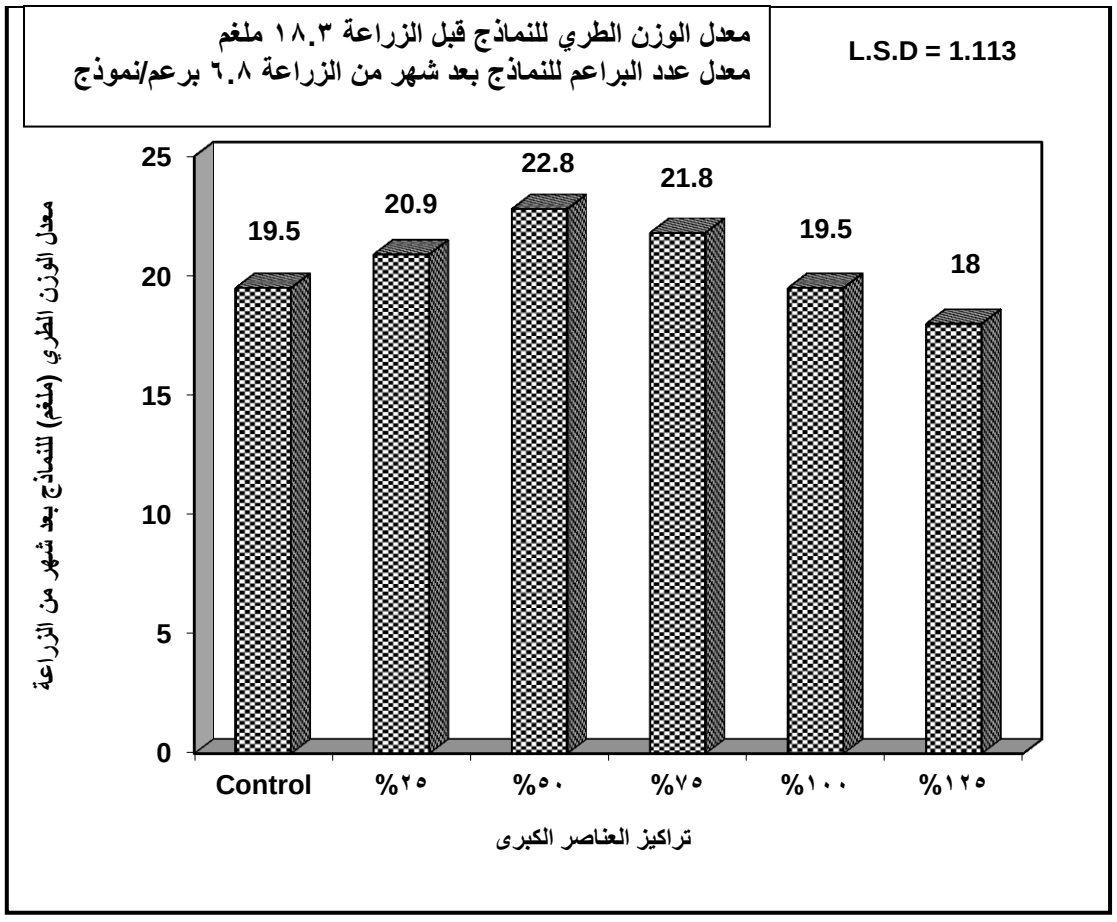
Materials	التركيز $mg . L^{-1}$
Macroelements	Full
Microelements	Full
Iron chelate	Full
Vitamins	$mg . L^{-1}$
Thiamine HCl B1	Full
Pyridoxine HCl B6	Full
Nicotinic acid B3	Full
Myo-Inositol	100
Amino acid	$mg . L^{-1}$
Glycine	2
Organic nitrogen sources	$mg . L^{-1}$
Glutamine	200
Adenine sulfate	40
Growth regulators	$mg . L^{-1}$
Auxines Hormones	$mg . L^{-1}$
NOA Hormones	5
NAA Hormones	1
1AA Hormones	1
Cytokines Hormones	$mg . L^{-1}$
2,ip	3
Others	$g. L^{-1}$
Sucrose	30 g
Agar	8 g
Activated charcoal	3 g
P.V.P	2 g

و فيما يخص تحضير الأجزاء النباتية (تحضير قلب الفسيلة) فقلعت فسائل تمر الزهدي من الأمهات المزروعة في الحديقة النباتية لكلية التربية إبن الهيثم بعمر ٣ سنوات و حدد عمر الفسيلة من خلال حساب عدد الأوراق و الكرب (قاعدة الأوراق المزالة أو الميتة) . تم التعقيم بوضع قلب الفسيلة في قمع بخنر Bughner flask حجم 1000 مل و الحاوي على هايبوكلورايد الصوديوم ٦%. عقمت الأوساط الغذائية الموزعة في أنابيب الإختبار بمقدار ٢٥ مل لكل أنبوبة أو حاوية زجاجية من النوع المتحمل للتعقيم البخاري autoclavable . حللت النتائج و قورنت إحصائيا بموجب التصحيح العشوائي الكامل Completely Randomized Design (C.R.D) بواقع (3) مكررات لكل معاملة لإيجاد أقل فرق معنوي .L.S.D و عند مستوى إحتمالية 5%. [9]

النتائج و المناقشة

تأثير العناصر الكبرى Macroelements

أظهرت نتائج الوزن الطري أن النماذج المزروعة في معاملة الوسط الحاوي على تركيز (نصف قوة الأملاح الكبرى) مع ثبوت العوامل الأخرى والتي هي الأملاح الصغرى، الحديد والأحماض الأمينية والفيتامينات والهرمونات والخالي من الفحم المنشط P.V.P. وكما في وسط السيطرة قد تفوقت معنوياً عند مستوى إحتمالية ٥% كما في شكل رقم (١).



شكل (١): علاقة تراكيز مختلفة من العناصر الكبرى لأملاح MS من دون فحم منشط و P.V.P. مع ثبوت العناصر الصغرى والحديد وتراكيز منظمات النمو كما في السيطرة بالوزن الطري.

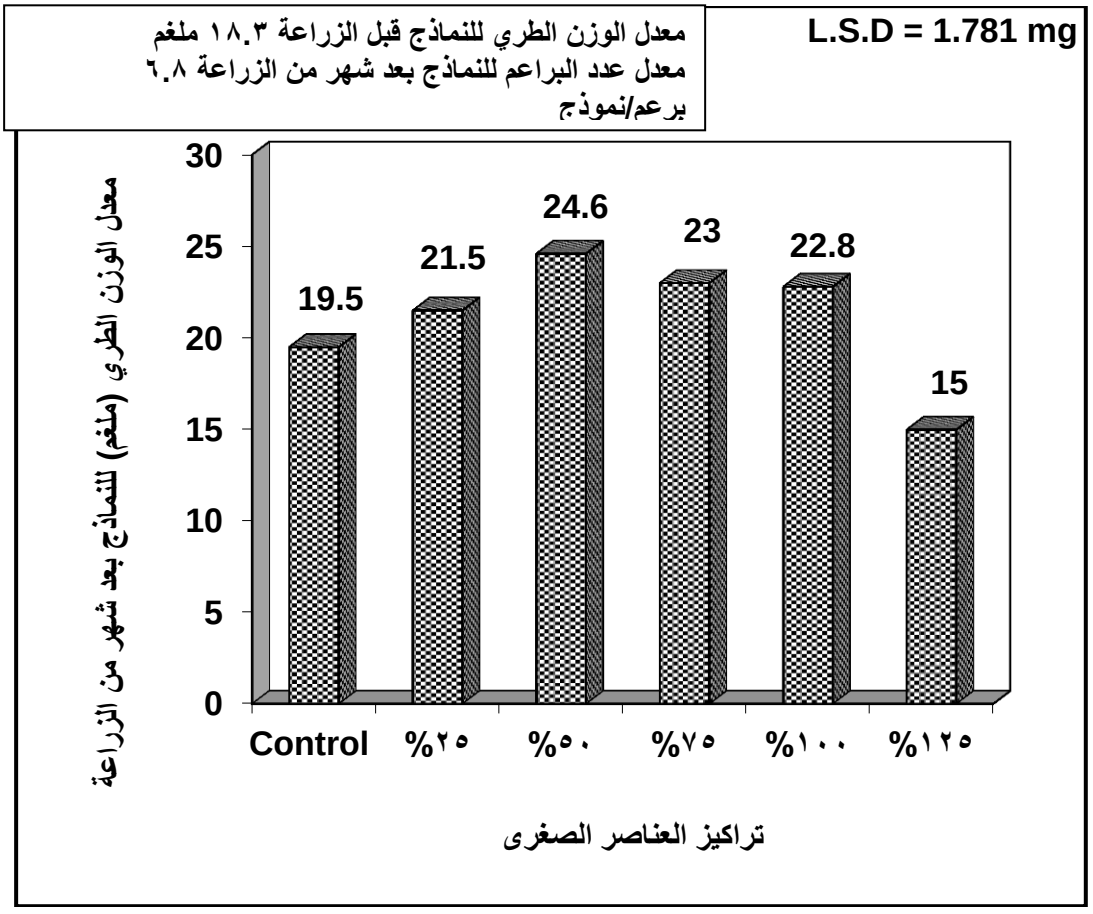
يعد وسط MS (1962) احد أكثر الأوساط شيوعاً في زراعة الخلايا والأنسجة النباتية وأثبتت كفاءة في نمو العديد من خلايا النباتات الاحادية والثنائية الفلقة [10] وتعتمد معظم أوساط زراعة الانسجة على مكونات أملاحه [11] ويعد وسطاً عالي الأملاح [12]. لقد أظهرت النتائج وكما موضح في الشكل رقم (١) أن معاملة نصف قوة تراكيز العناصر الكبرى قد تفوقت معنوياً على معاملات التراكيز

الأخرى في نمو البراعم الأولية تحت آباط بادئات الأوراق لأنسجة نخلة التمر المزروعة خارج الجسم الحي (in vitro) وهذه دالة على أن كامل قوة العناصر الكبرى لأملاح MS كان لها تأثيراً سلبياً في نمو وتكشف أنسجة نخلة التمر وقد يعزى ذلك إلى الإخلال بالجهد الأوزموزي Osmotic potential والتوازن الأيوني Ionic balance.فقد أشار [13] إلى أن زيادة الأملاح تؤثر في النبات بطريقة مباشرة حيث تعمل على الاخلال بالجهد الاوزموزي والتوازن الأيوني وظهور السمية الأيونية Ionic toxicity، كذلك أن النباتات المتأثرة بالملوحة تتعرض إلى إضطراب في التوازن الغذائي من خلال التغيير في الجهد الأوزموزي في خلايا النباتات مما يؤدي إلى إنخفاض إمتصاص العناصر الغذائية وقد أشار [14] إلى أن النباتات تختلف في قابليتها على تجميع كمية كبيرة من ايون معين أو أكثر من الأيونات الأخرى الموجودة في وسط النمو حيث قد يكون هذا التراكم ضرر كبير على النبات يصل إلى درجة السمية.وأشار [15] أن زيادة ايونات الكالسيوم المغنسيوم (المحفزة لنشاط أنزيم ATPase) يمكن أن تخفض نشاط الأنزيم بسبب حدوث تغيرات في شكل الأنزيم أو في موقعه الفعال مما يقلل أو يعيق من ارتباط الايونات بالأنزيم.وأشار [16] إلى أن زيادة التراكيز الملحية في وسط النمو يؤدي إلى زيادة معدل هدم البروتين فيما أشار كل من [17] إلى أن زيادة تركيز الأملاح في وسط النمو يؤدي إلى إنخفاض إمتصاص البوتاسيوم الذي يلعب دوراً مهماً في تعزيز إمتصاص النتروجين وتمثيله إلى بروتين.لقد إتفقت نتائجنا مع ماتوصل إليه [18]على نباتي الجربرا Gerbera والسيمبيديوم Cymbidium حيث أثبتت تحاليلهم للوسط الغذائي المستخدم في زراعة هذين النباتين خارج الجسم الحي على عدم إستنفاذ كامل الأملاح المستخدمة في الوسط الغذائي، كذلك فقد اتفقت نتائجنا مع ماتوصل إليه [19]على نبات الجوز Walnut Juglans regia من ان

إستخدام نصف قوة العناصر الكبرى (X ٠.٥) لأملاح MS قد حسنت النمو والتكشف بفارق معنوي كبير عن الجرعات الأخرى المستخدمة بالبحث وهي (١.٥ X، 1X، 1/3 X) واعتبر ان كامل قوة تركيز العناصر الكبرى لأملاح MS محدد للنمو والتكشف لنبات الجوز Walnut خارج الجسم الحي (in vitro).

تأثير العناصر الصغرى Microelements

أظهرت نتائج الوزن الطري أن النماذج المزروعة في معاملة الوسط الحاوي على جرعة (نصف قوة الأملاح الصغرى) وأفضل جرعة من الاملاح الكبرى (٥٠%) وثبات الحديد عند ١٠٠% والخالي من الفحم المنشط و P.V.P وثبات العوامل الأخرى كما في معاملة السيطرة قد تفوقت معنوياً عند مستوى إحتمالية ٥%.



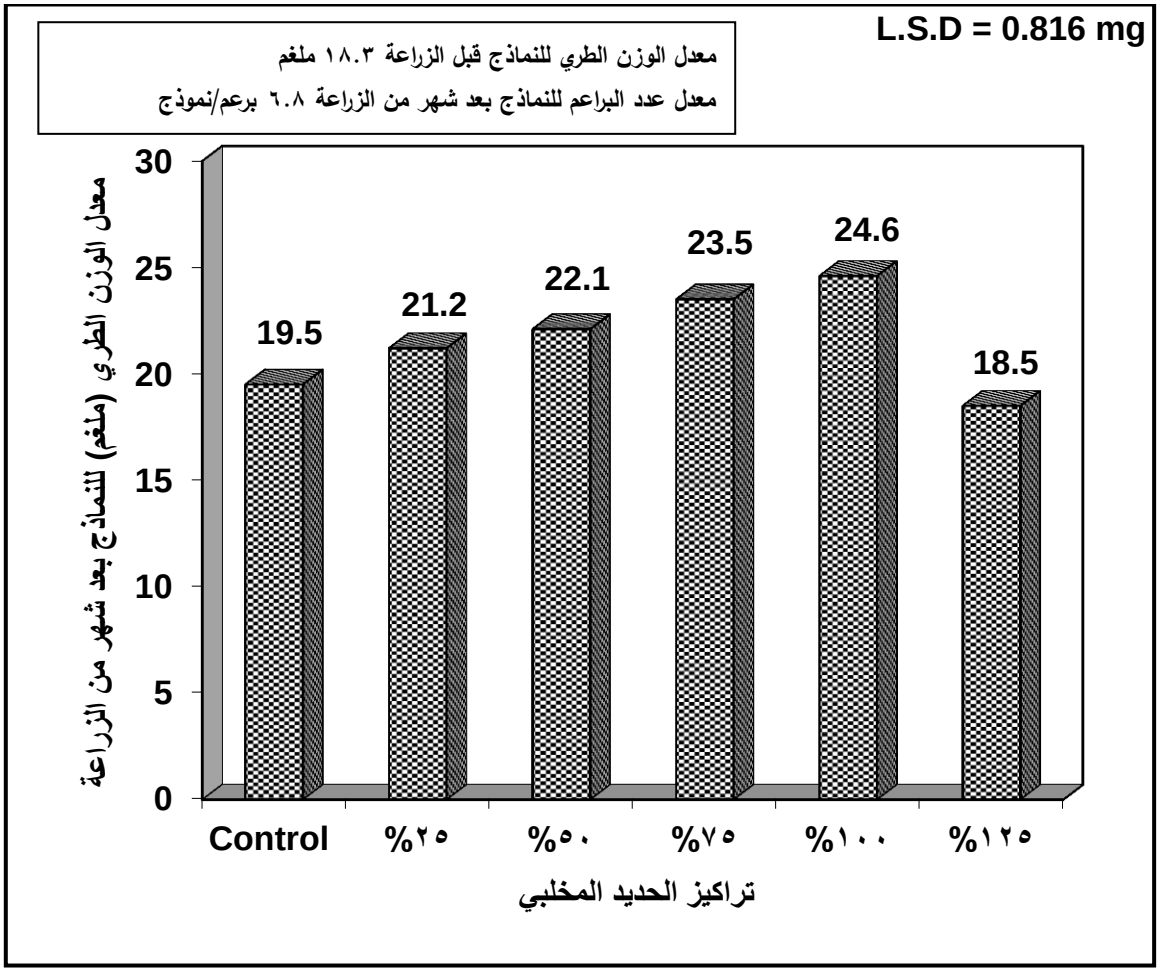
شكل (٢): علاقة تراكيز مختلفة من العناصر الصغرى لأملاح MS بدون فحم منشط و P.V.P مع ثبوت العناصر الكبرى عند قوة ٥٠% وثبات الحديد عند ١٠٠% وتراكيز منظمات النمو كما في السيطرة بالوزن الطري.

أظهرت النتائج كما موضح في الشكل رقم (٢) ان معاملة نصف قوة تراكيز العناصر الصغرى مع نصف قوة تراكيز العناصر الكبرى مع ثبوت العوامل الأخرى في معاملة السيطرة قد تفوقت على المعاملات الأخرى. كما أظهرت النتائج إنخفاضاً في معدل الوزن الطري من ٢٢.٨ ملغم/لتر عند مستوى كامل القوة ١٠٠% إلى ١٥ ملغم/نموذج عند مستوى قوة ١٢٥% ومقارنة مع الأملاح الكبرى التي إنخفض فيها معدل الوزن الطري من ١٩.٥ ملغم/نموذج عند مستوى كامل القوة ١٠٠% الى ١٨ ملغم/نموذج عند مستوى ١٢٥% يظهر بوضوح حساسية النبات للأملاح الصغرى بدرجة أكبر من حساسيته الى الأملاح الكبرى. وهذا تطابق مع ماأوضحاه [20] من أن للعناصر الصغرى أهمية خاصة في وظيفة انزيمات مختلفة فضلاً عن أهميتها في عمليات عديدة تقوم بها الخلية الحية ولكن منحنى تركيز العناصر الصغرى يكون شديد الإنحدار عند نقطة معينة ملائمة ولذلك تكون أساسية بكميات صغيرة جداً. أن خاصية هذا المنحنى مثلها مثل خاصية منحنى تأثير الهرمونات على النبات في حين أن منحنى تركيز العناصر الكبرى يكون أكثر تسامحاً وكما أشار [21] أن العناصر الصغرى موجودة بمستويات قليلة في المادة الجافة لذلك تكون إحتياجات النبات لها بمستويات قليلة مشابهة أيضاً.

تاثير الحديد المخلبي Iron Chelate

أظهرت نتائج الوزن الطري أن النماذج المزروعة في معاملة الوسط الحاوي على جرعة كامل قوة الحديد ١٠٠% مع أفضل نتائج الأملاح الكبرى ٥٠% وأفضل نتائج الأملاح الصغرى ٥٠% والخالي من الفحم المنشط وP.V.P. مع ثبوت

العوامل الأخرى كما في معاملة السيطرة قد تفوقت معنوياً عند مستوى إحتمالية ٥% وكما في شكل رقم (٣).



شكل (٣): علاقة تراكيز مختلفة من حديد أملاح MS بدون فحم منشط و P.V.P. وأفضل نتائج العناصر الكبرى ٥٠% وأفضل نتائج العناصر الصغرى ٥٠% مع ثبوت تراكيز منظمات النمو كما في السيطرة بالوزن الطري.

وبهذا فان الجرعات المقترحة لتراكيز أملاح MS وحسب النائج هي:

الأملاح الكبرى	نصف القوة	٥٠%
الأملاح الصغرى	نصف القوة	٥٠%
الحديد	كامل القوة	١٠٠%

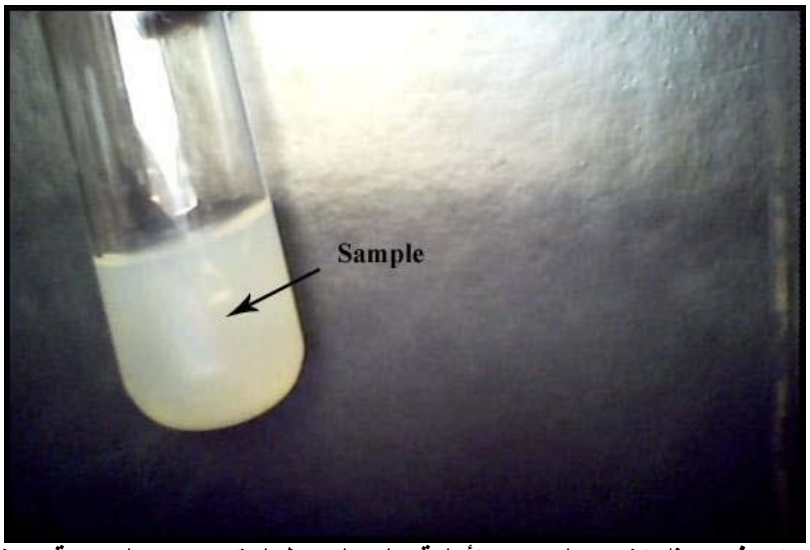
أوضحت النتائج وكما موضح في الشكل رقم (٣) أن معاملة كامل قوة تركيز الحديد مع نصف قوة تراكيز العناصر الصغرى والكبرى قد تفوقت معنوياً على المعاملات الأخرى. وهذا يتفق مع ماهو معروف ومنشور سابقاً فمنذ عام ١٩٥٦ أشار كل من [22] و [23] أن إمتصاص الحديد يقل جزئياً عند قيم الـ pH العالية والتركيز العالي لكل من الفسفور والكالسيوم في المحيط الغذائي. إن إنخفاض تراكيز الفسفور والكالسيوم إلى النصف من خلال إستخدام نصف قوة تراكيز العناصر الكبرى سمح لنماذج نخلة التمر خارج الجسم الحي (in vitro) أن تستخدم تركيز كامل القوة إستخداماً مثالياً في فعاليتها الأيضية.

وبهذا فيكون الوسط المقترح لنشوء البراعم الأولية تحت آباط بادئات الأوراق لنخلة التمر وكما مبين في جدول رقم (٣). والصورة (أ) تبين النموذج بعد الزراعة مباشرة بينما الصورة (ب) تبين النموذج بعد شهر من الزراعة لهذا الوسط المقترح كنتيجة للبحث.

جدول (٣): الوسط المقترح لنشوء البراعم الأولية تحت آباط بادئات الاوراق لنخلة التمر كنتيجة للبحث.

أملاح MS	$mg.L^{-1}$ أو %
Macro elements	50% نصف القوة
Micro elements	50% نصف القوة
Iron chelate	100% كامل القوة
Vitamine	$mg.L^{-1}$
Thiamine HCl	Full
Pyridoxine HCl	Full
Nicotinic acid	Full
Myo-Inositol	Full
Amino acids	$mg.L^{-1}$
Glycine	٢
Organic Nitrogen sources	$mg.L^{-1}$
Glutamine	٢٠٠
Adenine sulphate	٤٠
Growth Regulators	
Auxines	$mg.L^{-1}$
NOA	١
NAA	١

1AA	١
Cytokinines	$mg.L^{-1}$
2,ip	٠.١
Sucrose	3%
Agar	0.8%
pH	٥.٧



صورة (أ): نموذج يمثل نشوء البراعم الأولية على الوسط المقترح بعد الزراعة مباشرة.

صورة (ب): نموذج يمثل نشوء البراعم الأولية كنتيجة للبحث بعد شهر من الزراعة.

الإستنتاج :

كانت أفضل التراكيز لأملاح وسط MS لإعطاء أفضل معدل للوزن الطري هي نصف القوة ٥٠% للعناصر الكبرى macroelements و نصف القوة ٥٠% للعناصر الصغرى micronutrients و كامل القوة ١٠٠% للحديد Iron chelate .

المصادر

1) محسن ، خيون علي . ، جميل ، نائل سامي .، عبد الرزاق ، حليمة جبار . (2016) . إكثار نخيل التمر *Phoenix dactylifer L.* صنف الحلاوي خارج الجسم الحي. مجلة البصرة لأبحاث نخلة التمر ، ١٥(١-٢)

2) Jazinizadeh , E. ; Zarghami , R. ; Majid , A. ;Iranbakhsh , A. and Tajaddod , G. (2015). In vitro production of date palm (*Phoenix dactylifer L.*) cv. "Barhee" plantlets through direct organogenesis . Biological Forum – An International Journal , 7(2): 566-572.

3) Al-Khayri , J. and Naik , P. (2017). Date palm micropropagation : Advances and applications. Cen da e Agrotecnologia , 41(4): 347-358.

4) المياحي ، أحمد ماضي وحيد . (2014) . إكثار نخيل التمر Phoenix dactylifera L. صنف الخضراوي بطريقة التحفيز المباشر للبراعم مختبريا . المجلة الأردنية في العلوم الزراعية ، المجلد ١٠ العدد ١.

5) Kurup , S. ; Aly , M. ; Lekshmi , G. and Tawfik , N. (2014). Rapid in vitro regeneration of date palm(Phoenix dactylifer L.) cv. Kheneizi using tender leaf explant . Journal of food agriculture , 26(6):539-544.

6) Saad , A. and Elshahed , A. (2012). Plant Tissue Culture Media . open access chapter distributed under the term of the creative commons attribution liceusee in Tech.

7) Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum, 15: 473-497

8) George , E. (2008). Plant propagation by tissue culture , chapter : The components of plant tissue cultre media I : Macro and Micro nutrients. 3rd Edition , 65-113.

9) الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبد العزيز، محمد. (١٩٨٠). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. جامعة الموصل، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . العراق.

10) Smith, R. (2000). Plant tissue culture teachinques and experiment. Academic Press, Inc., San diego.

11) Bouman, H.; Morris, B. & Tiekstra, A. (2002). Development of new tissue culture media, using the relation between mineral composition of plant and medium. (Abstract). Book series: Development in Plant and Soil Sciences, 92: 450-451.

12) Dixon, R. (1985). Plant Tisue Culture. IRL Press Limited. Oxford, England

13) Kuiper, P. (1984). Functioning of plant cell membranes under saline condition. In: Membrane lipid composition and ATPase in salinity tolerance in plants strategies for crop improvement. Richarde, S. and Gary, H. (Eds.). Toenniessen, New York, 85-89.

14) Ehret, D.L.; Redmann, R.E.; Harvey, B.L. & Cipywnyk, A. (1990). Salinity- induced calcium deficiencies wheat and barley. Plant and Soil, 128: 143-151.

15) Erdei, L.; Stuiver, C.E.E. & Kuipper, P.J.C. (1980). The effect of salinity on lipid composition and on activity of Ca+2 and Mg+2 stimulated ATPase in salt tolerant plantago species. Physiol. Plant, 49: 315-319

16) Stewart, C. (1983). Proline accumulation, biochemistry aspects in physiology and biochemistry of drought resistance in palnts. Poleg. L.G. and Aspinall, K. (edt.). Acd. Press, Aust.

17) Helal, H.. & Mengel, K. (1979). Nitrogen metabolism of young barley plants as affected by NaCl-salinity and potassium. Plant and Soil, 51: 457-462.
18) Bouman, H. & Tiekstra, A. (2002). Mineral nutrition in tissue culture. In: Influence on propagation and quality of the plantlets. Book series: Development in Plant and Soil Sciences, 92: 316-317.
19) Amiri, M.. (2004). Effect of mineral concentration on tissue-cultured walnut (Juglans regia var. Zeibadi) growth. Book series: Development in Plant and Soil Sciences, 81: 212-213
20) Bob & Wellenstein, L. (2000). Mineral nutrition for slipper orchid growers. http://ladyslipper.com
21) Martin, J. ; Bromine, P. & Chapman, H. (1966). Diagnostic criteria for plants and soils. Univ. of California, Div. of Agric. Sciences.
22) Zimmerman, R. (1980). Proceeding of the Conference on Nursery Production of Fruit Plants through Tissue Culture: Applications and Feasibility. (April 21-22, 1980, Beltsville).
23) Dodds, J. & Roberts, L. (1982). Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press.