فصل البروتو بلاست وزراعتها :

تعد الخلايا الحيه العاريه (بدون الجدار الخلوي) هي بروتوبلاست الخلايا النباتيه التي ازيل عنها الجدار اما بطرق ميكانيكيه او بواسطه فعل الانزيمات الهاضمه للجدار الخلوي .

ونتيجه لازاله الجدار فأن الحاجز بين البروتوبلازم (الماده الحيه) والبيئه الخارجيه المحيطه (External environment) هو غشاء البلازما (Plasma membrane) الذي يتم عبره انتقال المواد الذائبه من الخليه النباتيه واليها . ويجب وضع البروتوبلاست المعزوله في وسط غذائي ذي ازموزيه متعادله (isotonic) للحفاظ عليها من التلف .

وفصل البروتوبلاست ليس حدثا جديدا وانما عزلت في اوائل القرن العشرين بالطرق الميكانيكيه لدراسه الجريان البروتوبلازمي ولاحقا استعملت في مجالات عديده .

الاستخدامات التطبيقيه لزراعه البروتوبلاست

1. يمكن حث البروتوبلاست المعزول للاندماج من اجل الحصول على نباتات هجينه (hyprid plants) وعلى الرغم من ان هذه الضاهره طبقت لعده انواع من النباتات الا ان الاندماج قد لايحدث في قسم من انواع النباتات وتستعمل هذه الطريقه في الانواع التي يصعب الحصول منها على انواع هجينه .
2. البروتوبلاست المعزول له القابليه على تضمين المواد الغريبه عنه وادخالها في السايتوبلازم كما هو الحال في تضمين الانويه والبلازميدات plasmids وغيرها .
3. البروتوبلاست النامي على اوساط غذائيه معينه له القابليه على بنلء الجدر الخلويه ويعد ذلك نظاما جيدا لمعرفه العمليات الاساسيه المهمه في تكوين الجدر الخلويه .
4. البروتوبلاست المعزوله يمكن دراستها على انها نظام خلوي احادي كما هو الحال بالنسبه للكائنات المجهريه وحيده الخليه ويمكن انتقاء خلايا مفرده منها له صفات معينه لانتاج مجموعه من النباتات ذات مواصفات خاصه .

مصادر الخلايا النباتيه

- لقد تم فصل البروتوبلاست من النباتات الكامله ومن المزارع الخلويه لانواع نباتيه عديده , وتعتبر الاوراق مصادر ملائمه للخلايا التي يمكن فصل البروتوبلاست منها . تستعمل عاده خلايا النسيج المتوسط Mesophyll للاوراق وذلك لرقه جدرانها وتحطمها بسهوله ومع ذلك قد يكون من الضروري ازاله البشره بسب الصعوبه التي قد تواجهها الانزيمات في اختراق طبقه الكيوتكل ويتم ذلك اما بقشط هذه الطبقه او المعامله الاوليه للاوراق بأنزيم α-glucuronidase او pectin gluco sidase .
- كما يمكن استعمال الخلايا الموجوده في الاجزاء النباتيه الاخرى مثل اطراف الجذور , الاجنه لهذا الغرض الا ان جدران خلاياها لاتتحطم انزيميا بسهوله .
- وتعتبر مزارع الخلايا السريعه النمو من اكثر المصادر ملائمه , وينصح بتجنب الخلايا الكبيره العمر وذلك لان جدرانها تكون ذات مقاومه عاليه للتحطم بالانزيمات .
- ان استعمال نباتات خاليه من الملوثات ونامیه في اوساط غذائيه خاصه توفر مصدر جيدا لفصل البروتوبلاست من الاوراق والسيقان وذلك للاسباب التاليه :

أ. ان الاوراق والسيقان المستعمله لاتحتاج الى تعقيم قبل وضعها في المحاليل الانزيميه الهاضمه للجدار الخلوي .

ب. يمكن السيطره على الظروف البيئيه بسهوله ووضعها تحت ظروف فسلجيه مثاليه .

ج. في هذه الحاله تكون الاوراق او السيقان ذات طبقه رقيقه من الكيوتكل مما يسهل دخول الانزيمات الى الخلايا لتحطيم الجدر الخلويه واطلاق البروتوبلاست الى الوسط المستعمل في فصلها . ولقد استعملت هذه الطريقه في العديد من النباتات مثل البطاطا والطماطه والبنجر السكري والخس .

- فصلت البروتوبلاست من حبوب اللقاح للعديد من النباتات وتوفر هذه الطريقه محاسن عديده منها :

أ. ان حبوب اللقاح متوفره بشكل كبير جدا

ب. انها تكون متجانسه وراثيا

ج. توفر فرصه جيده لدراسه الطفرات والتغيرات الخلويه المختلفه

د. ان اندماج البروتوبلاست المعزول من حبوب اللقاح يؤدي الى تكوين هجين طبيعي ذي عدد مضاعف من الكروموسوم

هـ . امكانيه انتاج نباتات احاديه المجموعه الكروموسوميه

وتعتمد عمليه فصل البروتوبلاست وسهولتها على مراحل تكوين حبوب اللقاح ومن المفضل استعمال حبه اللقاح بمرحله الخليه الاميه لحبه اللقاح pollen mother cell او في مرحله تكوين الرباعيات pollen tetrad .

طرق فصل البروتوبلاست Methods Of Protoplast Isolation

هناك طريقتين رئيسيتين لفصل البروتوبلاست هي :

1. الطريقه الميكانيكيه Mechanical isolation

تعتمد هذه الطريقه على انكماش البروتوبلاست ممايؤدي الى تقليص حجمه وابتعاده عن الجدار الخلوي بعد ذلك يتم عمل مقاطع عرضيه في المناطق السميكه من النسيج وعند تخفيف حده انكماش البروتويلاست بدرجه قليله يؤدي ذلك الى خروج البروتوبلاست من مناطق متعدده في النسيج النباتي , يقتصر استعمال هذه الطريقه على الانسجه النباتيه التي تحتوي خلاياها على فجوات كبيره حيث يكون حدوث انكماش البروتوبلاست غايه من السهوله وينفصل كليا عن الجدار الخلوي , توجد هذه الخلايا عاده في الانسجه الخازنه مثل الاوراق الحرشفيه للبصل , جذور الجزر, والطبقه الوسطى لثمره الخيار وغيرها .

ومن مزايا هذه الطريقه انالبروتوبلاست لايتعرض الى العمل الانزيمي كما في الطريقه الثانيه التي ربما تؤثر على الغشاء البروتوبلازمي للبروتوبلاست .

ومن معوقات هذه الطريقه :

1. قله اعداد البروتوبلاست التي يمكن الحصول عليها
2. ينحصر استعمالها في الانسجه التي يكون انكماش بروتوبلازم خلاياها عاليا
3. غير ملائمه لفصل البروتوبلاست من الخلايا البالغه والمرستيميه اضافه الى حدوث اضرار للبروتوبلاست
4. الحاجه الى وقت وجهد كبيرين

2. الطريقه الانزيميه Enzymatic isolation

بدء استعمال الانزيمات لازاله الجدار الخلوي عام 1960 بعد النجاح الذي حققه Cocking في فصل البروتوبلاست من خلايا انسجه اطراف جذور الطماطه وذلك باستعمال محاليل مركزه من انزيم السليوليز Cellulase المستخلص من الفطر اما المستحضرات التجاريه للانزيمات فقد استعملت لاول مره من قبل Takeba وجماعته 1968 لفصل البروتوبلاست من خلايا النسيج المتوسط لاوراق نبات التبغ حيث استخدم الباحثون انزيم ال pictenase لفصل الخلايا وانزيم cellulase لتحطيم الجدار الخلوي . اما تركيز المحلول الانزيمي وفتره الحضن فتعتمد بدرجه كبيره على نوعيه الانسجه ونوع النبات المستخدم في عمليه فصل البروتوبلاست وعلى سبيل المثال فان 2% من انزيم السليوليز و 3% من انزيم البكتينيز وفتره حضن تتراوح بين 40-50 دقيقه تعد كافيه لفصل البروتوبلاست من الانسجه المرستيميه للعديد من النباتات في حين ان ذلك لايعد مثاليا للانسجه الخازنه ومنذ عام 1960 وللوقت الحاضر فقد استعملت الانزيمات لفصل البروتوبلاست من معظم الانسجه النباتيه تقريبا , كالاوراق , الجذور, , العقد الجذريه , خلايا الكالس والخلايا الموجوده في الخلايا المعلقه , وفي كل الاحوال فان افضل مصدر للبروتوبلاست هو الخلايا الفتيه السليمه في الانسجه السريعه النمو الخاليه من أي مصدر للتلوث تتضمن الطريقه الانزيميه الخطوات التاليه :

1. الانسجه او الخلايا في خليط ملائم من الانزيمات التي تحطم الجدار الخلوي
2. تحرير البروتوبلاست من جدران الخلايا التي تم تحطيمها
3. فصل البروتوبلاست من الخليط الانزيمي وتنقيته

فوائد فصل البروتوبلاست انزيميا :

1. سهوله فصل اعداد كبيره من البروتوبلاست
2. قله الانكماش السايتوبلازمي
3. تكون الخلايا سليمه وغير متضرره كما هو الحال في الطريقه الميكانيكيه

ويستعمل عاده نباتات ناميه في ظروف معقمه او في ظروف طبيعيه لذلك فان عمليه الفصل في هذين النباتين تختلف نوعا ما . وفي كلتا الحالتين يجب الحصول على بروتوبلاست غير متضرر وخال من الملوثات

أ. فصل البروتوبلاست من النباتات الناميه في ظروف معقمه

تستخدم في هذه الطريقه نباتات ناميه في ظروف معقمه وبعمر معين ويفضل استخدام الانسجه الفتيه منها . تفصل الاوراق عن السيقان في جو خالي من الملوثات داخل كابينه الزراعه ثم تقطع الى قطع صغيره وتوضع في المحلول الانزيمي الذي يحوي على انزيمي السليلوليز والبك معا او تعامل بالتعاقب لفتره زمنيه معينه تعتمد على نوع النبات والمده الزمنيه اللازمه تتروح بين 30-50 دقيقه وبعدها نفصل البروتوبلاست المتحرر بعمليه الطرد المركزي لمده دقيقه او دقيقتين وبسرعه تتراوح بين 400-500 دوره بالدقيقه وبذلك يكون البروتويلاست معده لعمليه التنقيه .

ب. فصل البروتويلاست من النباتات الناميه تحت الظروف الطبيعيه

يعد التعقيم السطحي من الخطوات الاساس في عمليه فصل البروتوبلاست من النباتات الناميه تحت ظروف غير معقمه ويمكن اجراء عمليه التعقيم السطحي للاوراق باستخدام المطهرات مثل الكحول الاثيلي بتركيز 70% او هايبوكلورات الصوديوم او الكالسيوم بتركيز 10% ثم تغسل بالماء المقطر المعقم لعده مرات لازاله ما تبقى من المطهرات العالقه يعقبها بعد ذلك المعامله بالانزيمات لتحرير البروتوبلاست .

الانزيمات المستخدمه في فصل البروتوبلاست Enzymes

تتكون الجدر الخلويه للخلايا النباتيه الحيه من مركبات معينه مثل السليلوز Cellulose واشباه السليلوز Hemi cellulose والبكتين Pectin ومن اجل ازاله الجدران فان الانزيمات المستعمله لها القدره على تحليل السليلوز واشباه السليلوز البكتين . ويستعمل عاده انزيم السليلوز Cellulose الذي يعمل على هضم جدار الخليه السليلوزي وانزيم البكتيينز Pectinase الذي يعمل على تحليل الصفيحه الوسطى بدرجه رئيسيه وتعتمد فعاليه الانزيمات على عوامل عديده منه تركيز الانزيم وفتره المعامله والاس الهيدروجيني PH ودرجه الحراره وهذه العوامل تحدد بالتجارب الاوليه اثناء عمليه فصل البروتوبلاست .

المحاليل الحافظه Osmotica

بعد المعامله الانزيميه فان البروتوبلاست الموضوعه في المحلول سوف تكون تحت شد أزموزي Osmotic stress فان لم يحتوي المحلول المستعمل لعمليه الفصل على مواد حافظه للازموزيه فان البروتوبلاست سوف تاخذ الماء بعمليه الازموزيه Osmotic وتنفجر وذلك لعدم احتوائها على الجدار الخلوي لذلك تستعمل مواد حافظه للازموزيه للحفاظ على توازن ازموزي بين الوسط والبروتوبلاست المفصول وهذه المواد هي السكريات الكحوليه Suger alcohol والسوربيتول Sorbitol و Manitol بنسه تتراوح بين 15-13% ويمكن استخدام السكروز Sucrose ايضا الا ان السكروز في بعض الاحيان يستخدم مصدرا كاربونيا من قبل البروتوبلاست المعزول لذلك فان تركيز السكروز سوف ينخفض في الوسط مما يؤدي تغير في ازموزيه الوسط لذلك لايفضل استخدام السكروز في المحاليل الحافظه للبروتوبلاست .

تنقيه البروتوبلاست Purification of isolated protoplast

يحوي المحلول الناتج من عمليه الفصل بالطريقه الانزيميه على بقايا الخلايا المختلفه وخاصه البلاستيدات الخضر والخلايا التي لم يتم هضم جدرانها وكذلك البروتوبلاست المهشمه جزئيا اضافه الى البروتوبلاست . وتتم عمليه تنقيه البروتوبلاست بعده طرق منها :

1. الترسيب والغسل Sedimentation and washing

تعتمد هذه العمليه او الطريقه على ترسيب البروتوبلاست السليمه بعد عمليه الفصل وتعليقها في محلول غسل البروتوبلاست الحاوي على مواد حافظه للجهد التنافذي كالماينتول والسكروز مع ضبط درجه تراكيز ايون الهيدروجين PH بمقدار 5,8 . يوضع معلق البروتوبلاست في انابيب خاصه ثم ترسيب البروتوبلاست في جهاز الطرد المركزي بسرعه من 50-100 ولمده 5 دقائق وتحت هذه الظروف فان البروتوبلاست السليمه تكون راسبا خفيفا في قعر الانبوب اما الراشح فيحتوي على معظم الشوائب . ويتخلص من الراشح بواسطه ماصات خاصه وبذلك تتم عمليه تنقيه اليروتوبلاست بصوره جزئيه يعلق ثانيه الراسب الحاوي على الربروتوبلاست في وسط غذائي جديد ويعاد ترسيبه في جهاز الطرد المركزي بسرعه 75 ولمده 3 دقائق تعاد هذه العمليه لعده مرات من اجل الحصول على كميه من البروتوبلاست الخاليه من الشوائب مناسبه لعمليه الزرع .

2. التطويق التقويم Folation

يمكن تنقيه البروتوبلاست بطريقه التقويم على محاليل من السكروز او السوربينول او الماينتول ذات التراكيز العاليه نسبيا ذلك لان كثافه البروتوبلاست السليمه اقل نسبيا من باقي الشوائب الخلويه ويتم ذلك بوضع المحلول الحاوي على البروتوبلاست والشوائب الخلويه على وساده من محلول السكروز في انبوب خاص يدعى بأنبوب Babcock ويدور في جهاز الطرد المركزي بسعه 100 ولمده 10 دقائق . تترسب الشوائب الخلويه في قعر الانبوب في حين ان البروتوبلاست تعوم فوق سطح وساده السكروز ثم ينقل البروتوبلاست بواسطه ماصات خاصه الى انابيب اخرى ويعامل بنفس الطريقه الاولى .

- من محاسن هذه الطريقه انها لاتؤدي الى تحطيم الربوتوبلاست بعمليه الترسيب والغسل كما في الطريقه الاولى . الا ان التراكيز العاليه من المواد الحافظه للجهد الازموزي المستخدمه ربما تؤثر بصوره مباشره على تأخير في تكوين الجدار الخلوي او قله في حيويه البرتوبلاست المفصول .

حيويه البروتوبلاست Protoplast viability

يعد من المهم جدا بعد فصل البروتوبلاست وتنقيتها معرفه نسبه البروتوبلاست غير المتضرر والحي من اجل زراعته في اوساط غذائيه خاصه للحصول على الاندماج وتكوين النباتات ولذلك اتبعت عده طرق وهي :

1. الجريان السايتوبلازمي Cytoplasmic streaming
2. استعمال صبغه ايفان الزرقاء Evans blue method
3. قياس فعاليه التنفس والبناء الضوئي Measurement of photosynthetic and respiratory activity
4. قياس التغير في الحجم Changes of protoplast size
5. طريقه التصبغ بمركب FAD

Staining with fluorecein diacetate (FAD)

يستخدم مركب FAD لتقدير حيويه البروتوبلاست المفصول . ويتجمع هذا المركب عبر الغشاء البلازمي للبروتوبلاست وان جميع البروتوبلاست الحيه تبدو ذات وميض اخضر الى الاخضر الفاتح بمعاملتها بالصبغه ويجب ملاحظه الوميض خلال 5-15 دقيقه فقط لان جزيئه المركب (FAD) تنشطر بوجود انزيم esterase في الخلايا او البروتوبلاست الحيه ويؤدي هذا الانشطار الى تجمع الفلورسين Flourescein في البروتوبلاست ذات الجدار السليم ويتم تحديد حيويه البروتوبلاست بتقدير كميه الوميض الناتج من ماده الفلورسين باستخدام المجهر التألقي Flourescein microscope والنسبه المئويه لحيويه البروتوبلاست يمكن تحديدها باستخدام المعادله الاتيه

$$\text{النسبه المئويه للبروتوبلاست الحيه} = \frac{\text{عدد البروتوبلاست المتألقه}}{\text{العدد الكلي البروتوبلاست}}\ 100\ x$$

وتعد هذا الطريقه من اكثر الطرق استخداما في تقدير حيويه البروتوبلاست .

طرق زراعه البروتوبلاست Methods of protoplast culture

هناك عده طرق لزراعه البروتوبلاست وهي :-

1. الزراعه على الاكر Agar embedding culture
2. الزراعه على القطره المعلقه hanging drop culture
3. طريقه

الوسط الغذائي Culture Medium

يعد الوسط الغذائي من العوامل المهمه في نجاح زراعه البروتوبلاست وان اضافه مواد خاصه الى الوسط الغذائي الامثل ادت الى زياده في تكوين الجدران الخلويه وكذلك زياده في انقسام البروتوبلاست المعزول . ويعتمد بدرجه كبيره نوع الوسط المستخدم في زراعه البروتوبلاست وتوالد النباتات على نوع النبات وكذلك على الاجزاء النباتيه المستخدمه في فصل البروتوبلاست وتشابه المكونات الاساسيه التي تدخل في تركيب الاوساط الغذائيه المستخدمه في نشوء الكالس او زراعه الخلايا المستخدمه في زراعه البروتوبلاست مع بعض التحويرات وغالبا ما يستخدم وسط MS ووسط B5 او اوساط اخرى محوره منها .

تحتاج المراحل الاولى من زراعه البروتوبلاست مواد معينه والتي تساعد على تثبيت الاغشيه البروتوبلازميه ويستعمل عاده ايونات ثنائيه موجبة الشحنه حيث ان اضافة كلوريد الكاليسيوم Cacl2 مع كبريتات المغنيسيوم Mgso4 الى الوسط الغذائي اعطت نتائج جيده عند زراعه البروتوبلاست . وكذلك ادت زياده تركيز مجموعه الفوسفات (Po4) بوجود تراكيز من الكاليسيوم ادا الى زيادة انقسام الخلايا الناتجه من زراعه البروتوبلاست لنبات الباقلاء وكذلك وجد ان اضافه مجموعه من الاحماض الامينيه (Casein Hydrolysate) الى الوسط الغذائي الخاص بزراعه البروتوبلاست من خلايا النسيج المتوسط لاوراق نبات البازاليا ادت الى زياده في معدل الانقسامات الخلويه .

اما مصدر الطاقه فيستخدم عاده السكروز بتراكيز مختلفه اعتمادا على نوعيه النبات المستعمل وفي بعض الاحيان من المفيد اضافه انواع معينه من السكريات مثل

الكلوكوز والازايلوز الرايبوز من اجل الحصول على انقسام خلوي وتكوين جدران خلويه بصوره افضل .

اما منظمات النمو النباتيه فيعد وجودها عاملا مهما في الوسط الغذائي المستعمل لزراعه البروتوبلاست المفصول من الاجزاء النباتيه للعديد من النباتات

ويعد الـ 2,4 – D او الـ IAA في بعض الاحيان وتركيز الاوكسينات في الوسط الغذائي يتراوح بين 0.1 – 5.0 ملغم / لتر معتمده على نوعيه البروتوبلاست المستخدمه او السايتوكاينات المستخدمه فهي او BA او 2 ip وبتراكيز مختلفه ومن العوامل المحدده لنجاح عملية زراعة البروتوبلاست وجود تراكيز مثاليه من المواد المستخدمه في الحفاظ على الجهد التنافذي Osmotic Potential لها ومنها المانيتول والسوربيتول وفي بعض الاحيان يستخدم خليط من هذه المواد .

تكوين الجدار الخلوي Cell wall regeneration

البروتوبلاست عباره عن خلايا حيه عديمه الجدار الخلوي , لذلك فان بناء الجدار الخلوي خطوه مهمه في نجاح زراعه البروتوبلاست وعدم تكوين ونشوء الجدار الخلوي في البرويوبلاست المفصول يحدد فشل تكوين الخلايا النباتيه .

يتم تكوين الجدار الخلوي للبروتوبلاست النامي في اوساط غذائيه معينه بعد عده ساعات من غسلها من الانزيمات ويستغرق بناءها كامله مده تتراوح بين يومين الى ثلاثه ايام ويتكون الجدار الخلوي حديث التكوين من لويفات سليلوزيه سائبه في البدايه ينتظم بعد ذلك مكونه جدار خلوي وينشأ ذلك من غشاء البلازما وربما تشترك الشبكه البلازميه الداخليه في بناء الجدار الجديد وهناك عوامل كثيره تؤثر بصوره مباشره على تكوين الجدار منها :-

1. توفير المصدر الخارجي للكاربون مثل السكروز : اذ ان بغياب السكروز لايحصل تكوين الجدار الخلوي .
2. وجود نوع معين من الاملاح بدلا من المانيتول : اذ يؤدي ذلك الى تكوين خلايا تنقسم لمرتين او ثلاثه ثم تتوقف عن الانقسام وتكون محاطه بجدران رقيقه جدا .

3. غسل البروتوبلاست بمواد الغسل الخاصه والتي ذكرت في تنقيه البروتوبلاست بشكل غير كافي لوحظ ان الغسل الغير كافي للبروتوبلاست قبل زراعتها يمكن ان يؤدي الى بروتوبلاست متعدد النوى من دون تكوين الجدار الخلوي .

انقسام البروتوبلاست Protoplast division

يعد وجود الجدار الخلوي اساسا للحصول على انقسام منتظم الا ان الخلايا المتكونه من البروتوبلاست لاتشرع جميعها بالانقسام ففي التبغ وجد ان هناك انقسامات غير متساويه للخلايا المتكونه من البروتوبلاست ولاتشرع جميعها بالانقسام وهذا ربما يؤدي الى حصول اختلافات وراثيه بين النباتات الناتجه .

ويمكن ملاحظه الانقسام الثاني بعد اسبوع من الانقسام الاول ممايؤدي الى تكوين مجموعات خلويه صغيره (cell clumps) وهذه المجموعات الخلويه تنمو بعد ذلك مكونه الكالس .

نشوء النباتات من زراعه البروتوبلاست Regeneration of plants from protoplast culture

تتضمن عمليه نشوء النباتات من زراعه البروتوبلاست على اوساط غذائيه محدده خطوات اساسيه هي :-

1. تكوين الجدار الخلوي ويعد من الخطوات المهمه في عمليه انتاج النباتات .
2. يعقب تكوين الجدار انقسام الخلايا المتكونه منتجه تجمعات خلويه صغيره تنمو بعد ذلك مكونه الكالس .
3. تكوين الاعضاء من هذا الكالس بعمليه تسمى تكوين الاعضاء Organogenesis ويمكن السيطره على هذه العمليه بوساطه منظمات النمو المضافه للوسط الغذائي .
4. تكوين الاجنه من الكالس بعمليه تسمى تكوين الاجنه Embryogenesis تعتمد بصوره رئيسيه على مكونات الوسط الغذائي المستخدم وتتضمن العمليه استحداث الاجنه من خلايا خاصه من الكالس لها القابليه على تكوين الاجنه تدعى embryonic cells وبعد اكتمال هذه الاطوار ينشأ نبات كامل من البروتوبلاست النامي على الوسط الغذائي المحدد .

المصادر

لمياء خليفة جواد. محاضرات الانسجة النباتية، جامعة بغداد –كلية الزراعة – قسم البستنة وهندسة الحدائق

زراعة الانسجة والخلايا النباتية . الدكتور فيصل رشيد الكنافي .1987. جامعة الموصل.

توفيق الرفاعي وسمير عبد. 2007. زراعة الأنسجة والاكثار الدقيق للنبات. المكتبة المصرية للطباعة والنشر . الإسكندرية.