تأثير المستخلصات الكحولية الخام لبعض أجزاء نبات القرنفل *Dianthus caryophllus* في تثبيط نمو فطري *Fusarium culum & Fusarium oxysporum* ♦

خزعل علي امين — كلية التربية/ قسم علوم الحياة

فراس احميد خضير — كلية العلوم/ قسم علوم الحياة

Abstract

Callus has been derived from Carnation leaves, on (MS) medium, Containing Various Concentrations of plant growth regulators, 0.1 mg/L BA and 0.5 mg/L 2,4-D. Established callus showed a good ability for differentiation and shoot formation on MS medium supplemented with 3.0 mg/L BA and 0.1 mg/L IAA at a rate of 100%. Different rooting concentrations were used with IBA in MS medium, 100% rooting was obtained when IBA used at 1.0 mg/L. Phenols were separated from crude alcoholic extractions from leaves of seed plants, callus of leaves and leaves derived from regeneration plants. Phenols were identified by using ferric chloride reagent. Treatment of both *Fusarium oxysporum* and *Fusarium Culum* with these extractions was successful in retarding the growth of both fungi, by means of dry weight. The best crude alcoholic extract in retarding the growth of both fungi was found to be the callus of leaves extracts which caused 67.7% and 62.1 retardation in growth of both fungi *Fusarium oxysporum* and *Fusarium culum* respectively.

الخلاصة

أستحدث الكالس من أوراق نبات القرنفل على وسط MS الحاوي على تراكيز متباينة من منظمات النمو، وأبدت الأوراق قابلية جيدة في استحداث الكالس وكان الوسط MS الحاوي على 0.1 ملغم/لتر BA و 0.5 ملغم/لتر 2,4-D أفضل وسط لاستحداث الكالس. أظهر الكالس قابلية على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية في وسط MS الحاوي على 3.0 ملغم/لتر BA و 0.1 ملغم/لتر IAA وبنسبة استحداث 100%. اختبرت قابلية الأفرع الخضرية على تكوين الجذور باستخدام وسط MS الصلب المضاف اليه تراكيز مختلفة IBA وتفوق الوسط MS المضاف إليه 1.0 ملغم/لتر من الـ IBA بإعطائه نسبة تجذير 100%. تم عزل الفينولات من المستخلصات الكحولية الخام لكل من (أوراق النباتات البذرية والكالس المستحدث من الأوراق وأوراق النباتات الناتجة من الزراعة النسيجية، وشخصت الفينولات باستخدام كاشف كلوريد الحديديك . نجحت هذه الدراسة في تطبيق نمو الفطرين

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4 – 5 أيلول 2007

Fusarium Culum & Fusarum oxysporum. إذ تمكنت المستخلصات الكحولية الخام الحاوية على الفينولات من تثبيط نمو الفطرين بدلالة الوزن الجاف للفطريات. وكان المستخلص الكحولي الخام لكالس الأوراق الأشد تأثيراً من تثبيط نمو الفطرين. إذ بلغت نسبة التثبيط 67.7% للفطر *Fusarium oxysporum* و62.1% للفطر *Fusarium culum*.

المقدمة

القرنفل *Dianthus caryophyllus .L* نبات عشبي معمّر موطنه الأصلي منطقة البحر الأبيض المتوسط يعود إلى العائلة القرنفلية Caryophyllaceae ينمو القرنفل في الاماكن ذات الإضاءة العالية أثناء فترة الشتاء وذات الدرجة الحرارية المعتدلة خلال فترة الصيف (1). لا يتأثر بطول النهار أو قصره لكن أزهاره تتفتح بسرعة كلما كان النهار طويلاً(2). يعد القرنفل واحداً من أهم أزهار القطف في العالم. حيث تستعمل أزهاره على مدار السنة في كل من كاليفورنيا ودينفر وإنكلترا (3،1)، يصاب نبات القرنفل بالعديد من الأمراض المتسببة عن البكتريا والفطريات والفايروسات ويعد مرض الذبول الفيوزارمي المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* من أكثر الأمراض المؤثرة في كمية ونوعية الازهار (3 ،4). وهي تصيب العديد من انواع القرنفل وتسبب تعفن الساق وذبول النبات(5)، ولصعوبة القضاء التام على هذه المسببات المرضية باستخدام المبيدات الكيميائية فضلاً عن تأثيرها الضار على البيئة(6)، فقد استخدمت طرائق عديدة من أجل رفع كفاءة النبات لمقاومة المرض او تثبيط نمو الفطريات المسببة له ومنها استخدام المستخلصات الكحولية الخام الحاوية على بعض المركيات الفينولية، التي يكونها النبات والتي تمنحه مقاومة عالية ضد العديد من الفطريات الممرضة وخاصة أمراض الذبول الفيوزارمي(7) إذ يحوي نبات القرنفل على العديد من المركبات الفينولية إذ شخصت العديد من مشتقات الحوامض الحوامض الفينولية، والفلافونات، الفلافونويدات، وكان لهذه المركبات دوراً كبيراً في مقاومة أو تثبيط نمو الفطريات المسببة لأمراض الذبول فضلاً عن إعطائها الرائحة المميزة لنبات (8، 9). كما تمكنت إحدى الدراسات من استخلاص الحوامض الفينولية من مزارع الكالس لنبات القرنفل ومن هذه الحوامض 2, b-dimethoxy bezoic acid, Vanillic acid ، Protocateechuic acid و (2). أجريت العديد من الدراسات بهدف زيادة كمية المركبات الفينولية من خلال تقنية العزل الوراثي وذلك بحقن جذور نبات القرنفل ببكتريا *Pseudomonas fluorescence* سلالة WCS 417 جعل النبات اكثر مقاومة لمرض الذبول الذي يسببه الفطر *F. oxysporum* (11،12).

تهدف الدراسة الحالية إلى معرفة تأثيرا المستخلصات الكحولية الخام لأوراق النباتات البذرية والكالس المستحدث من الأوراق والأوراق الناتجة من تمايز الكالس في تثبيط نمو فطري الذبول *F. oxysporum F. culum* التي تصيب القرنفل.

المواد وطرائق العمل

مصدر الكالس: استخدم الكالس المستحدث من الأوراق لنبات القرنفل في وسط (MS) الصلب Skooge and Murashige (1962) المدعم بـ 0.1 ملغم/لتر BA و 0.5 ملغم/لتر 2,4-D. تم إكثار الكالس وإدامته بإعادة زراعته على الوسط ذاته. قطع الكالس إلى أجزاء بوزن (1)غم، وزعت على الوسط الجديد بواقع قطعة لكل قنينة، حضنت العينات عند درجة حرارة (25 ± 2)مْ وشدة إضاءة 2000 لوكس وبنظام تعاقبي 16 ساعة ضوء/8 ساعة ظلام.

إنتاج النباتات الكاملة من تمايز الكالس

نقلت قطع الكالس المستحدثة من الأوراق بوزن 1غم/قطعة الى وسط MS الصلب الحاوي على BA تراكيز مختلفة (0.5- 3.0) ملغم/لتر ومتداخلة مع IAA بتراكيز (0.05- 3.0) ملغم/لتر لغرض تشجيع الكالس على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية، حضنت الدوارق الزجاجية الحاوية على الكالس في ظروف التعاقب الضوئي 16 ساعة ضوء/8 ساعات ظلام ودرجة الحرارة (25±2)مْ . حفزت الأفرع الخضرية الناتجة من تمايز الكالس على التجذير. حيث رفعت وأزيل عنها بقايا الكالس ونقلت الى دوارق زجاجية حاوية على وسط MS الصلب المضاف إليه تراكيز مختلفة من IBA (0.1 ، 0.5 ، 1.0، 3) ملغم/لتر حضنت في نفس ظروف الحاضنة المذكورة سابقاً.

تحضير المستخلصات الكحولية من المادة النباتية

تم تحضير المستخلصات الكحولية وفق طريقة (14) إذ أخذ 100 غم لكل من (الأوراق، الكالس، أوراق النباتات الناتجة من الزراعة النسيجية) كلاً على حدى وسحقت مع 250 مل كحول أثيلي تركيز 96% بوساطة هاون خزفي. حرك المحلول بوساطة المحرك الكهربائي Magnetic Stirrer لمدة 24 ساعة ثم رشح المزيج من خلال ورق الترشيح وركز الراشح بجهاز التبخير الدوار تحت الضغط المخلخل بوساطة (Rotary Vacum Evaporator) عند درجة حرارة 40°م. أخذ 5 مل من المستخلص المركز الناتج وخفف في 100 مل بالماء المقطر. ثم نقل المحلول الى قمع الفصل وأضيف له

50 مل من خلات الأثيل Ethyel acetate وبعد الرّج ترك لينفصل إلى طبقتين. طبقة خلات الاثيل الحاوية على الفينولات والطبقة المائية. أهملت الطبقة المائية وركّزت طبقة خلات الاثيل إلى ان تم الحصول على سائل كثيف القوام يمثّل المستخلص الكحولي الخام الحاوي على الفينولات.

الكشف عن الفينولات في المستخلصات الكحولية

اعتمدت طريقة (15) التي تعتمد على كاشف كلوريد الحديديك لمعرفة وجود الفينولات في المستخلصات الكحولية، حيث أخذ 2- 3 قطرة من المستخلص الكحولي للعينات كل على انفراد ووضعت في أنبوبة اختبار وأضيف إليها 3 قطرات من المحلول المائي لكلوريد الحديديك تركيز 2.5% والذي يعطي دلالة لونية في حالة وجود المركبات الفينولية في المستخلص الذي تم اختباره.

اختبار الفاعلية التثبيطية للمستخلصات الكحولية الخام في نمو الفطريات

اختبر التأثير الحيوي للمستخلصات الكحولية الخام في نمو فطريات المسبب لمرض الذبول في نبات القرنفل إذ تم الحصول على المزارع النقية لهذه الفطريات من د. نديم أحمد رمضان/ كلية العلوم/ قسم علوم الحياة/ جامعة الموصل

تحضير وسط الزرع وتعقيمه:

حضر وسط سكروز البطاطا السائل (Potato- Sucrose Broth) (PSB) المستخدم لتنمية الفطريات، ضبط الأس الهيدروجيني pH للوسط عند 5.6 باستخدام جهاز pH meter. وزع الوسط في دوارق زجاجية حجم 100مل بمعدل 50 مل/دورق. عقم الوسط بجهاز المؤصدة Autoclave عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.04 كغم/سم2 ولمدة 20 دقيقة. أضيفت المستخلصات الكحولية الخام للاجزاء (الاوراق، كالس الأوراق، الأوراق الناتجة من الكالس) والحاوية على الفينولات إلى وسط PSB بتراكيز (0.0 ، 1.0، 5.0، 10.0)%. لقح الوسط الغذائي بأحد الفطرين *F. oxysporum* و *F. culum* بمعدل قرص واحد لكل فطر 5 مل/قنينة أخذ من مستعمرة فطرية حديثة بعمر 7 أيام نامية على وسط اكار سكروز البطاطا (PSA) وبواقع ثلاث مكررات/معاملة مع وجود عينة قياس (Control) ملقحة بالفطريات وخالية من المستخلص الكحولي. حضنت العينات عند درجة حرارة (25±2°)م بظروف الظلام لمدة 7 أيام بعدها رشحت محتويات الأوراق من خلال ورق الترشيح نوع Whatman No-3. وباستخدام جهاز الضغط المخلخل (Vacum) جففت

أوراق الترشيح الحاوية على الفطريات بالفرن الكهربائي عند درجة حرارة 60°م لمدة 24 ساعة ثم أحتساب الوزن الجاف للفطر وفق المعادلة الآتية:

وزن الفطر = وزن الورقة والفطر – وزن الورقة لوحدها (16)

وتم حساب نسبة التثبيط حسب المعادلة الآتية

$$\text{نسبة التثبيط} = \frac{\text{وزن الفطر الجاف} - \text{وزن الفطر في العينة القياسية}}{\text{وزن الفطر الجاف}} \quad (17)$$

النتائج

تكوين الأفرع الخضرية من تمايز كالس أوراق نبات القرنفل

تشير النتائج في الجدول (1) إلى أن وسط MS الصلب الحاوي على (3.0 BA ملغم/لتر + 0.1 IAA ملغم/لتر) كان له تأثير في تمايز كالس الأوراق إذ بلغت نسبة الأفرع الخضرية المتكونة 100% وبمدة زمنية تراوحت بين 7– 8 أيام.

جدول (1) تكوين الأفرع الخضرية من تمايز كالس الأوراق لنبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز مختلفة من BA و IAA

أوساط التمايز	العدد الكلي للأفرع الخضرية	إنتاج الأفرع الخضرية %	المدة الزمنية للتمايز يوم
0.0 + 0.0 +MS	--	--	--
0.1 BA+MS ملغم/لتر 0.05 ملغم/لتر IAA	15	75	5- 8
1.0 BA+MS ملغم/لتر 0.06 ملغم/لتر IAA	--	--	--
2.0 BA+MS ملغم/لتر 0.05 ملغم/لتر IAA	--	--	--
3.0 BA+MS ملغم/لتر 0.1 ملغم/لتر IAA	20	100	6- 8 ايام

* معدل أربعة قطع /معاملة / لكل جزء نباتي

تجذير الأفرع الخضرية

أشارت نتائج جدول (2) إلى حصول نسبة تجذير 100% عند استخدام وسط MS الحاوي على IBA بتركيز 1.0 ملغم/لتر، كما لوحظ زيادة في معدل عدد الجذور حيث بلغت 6.6 جذر وبمعدل طول الجذور إذ بلغت 4.8 سم وخلال مدة زمنية (9) أيام من بدأ زراعة

الأفرع الخضرية، في حين تباينت نسبة التجذير في بقية الأوساط، حيث انخفضت نسبة التجذير في الأوساط الحاوية على تراكيز (0.05، 0.1) من IBA.

كما يلاحظ من الجدول ان لتركيز IBA في الوسط دور في الفترة الزمنية اللازمة لعملية التجذير.

جدول (2) تجذير الأفرع الخضرية الناتجة من كالس أوراق نبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* في وسط MS الصلب المضاف إليه تراكيز متباينة من IBA بعد 4 أسابيع من زراعة الأفرع الخضرية

تركيز IBA (ملغم/لتر)	التجذير (%)	معدل عدد الجذور	معدل طول الجذر (سم)	المدة الزمنية اللازمة للتجذير (يوم)
0.05	33.3	0.3	1.1	17
0.1	33.3	0.6	0.9	20
0.5	50.0	2.6	1.2	11
1.0	100	6.6	4.8	9
3.0	66.6	1.6	1.1	18

* ستة مكررات / معاملة

1. الكشف عن المركبات الفينولية من المستخلصات الكحولية للأوراق، كالس الأوراق والأوراق الناتجة من الزراعة النسيجية.

أظهرت النتائج تغير لون المستخلص الكحولي من اللون الاخضر الى اللون الاصفر وذلك عند اضافة كلوريد الحديديك دلالة على وجود المركبات الفينولية في المستخلص الكحولي للأجزاء النباتية المستخدمة للاستخلاص ولوحظ أيضاً تكوين بلورات سوداء صغيرة في أسفل الأنبوب دلالة على وجود مركب Callic acid (15).

2. تأثير المستخلصات الكحولية الخام في نمو الفطرين بدلالة الوزن الجاف

بينت نتائج الجدول (3) إلى ان هناك تأثير تثبيطي واضح للمستخلصات الكحولية الخام الحاوية على الفينولات في درجة نمو الفطرين على حد سواء، إذ لوحظ انخفاض الوزن الجاف للفطرين في الأوساط الحاوية على الفينولات قياساً بعينة المقارنة ، كما لوحظ ان تراكيز الفينولات لها دور مهم في خفض قابلية الفطرين على النمو. إذ انخفض الوزن الجاف مع زيادة تراكيز الفينولات المضافة إلى الوسط الغذائي، كما بين الجدول ان المستخلصات الفينولية الخام من كالس الورقة لها تأثير سلبي أكثر مقارنة مع

المستخلصات الفينولية الخام الناتجة من الأوراق النامية من البذور وكذلك الناتجة من الكالس حيث حصل على أقل وزن جاف للفطر وأعلى نسبة تثبيط وبالذات عند التراكيز الفينولية 10% إذ بلغت 0.153 و 0.114 غم لكل من الفطرين *F. culum , F. oxysporum* على التوالي قياساً بعينة المقارنة التي بلغت الوزن الجاف 0.474 ، 0.301 غم لكل من الفطرين على التوالي. كما بين الجدول كذلك ان المستخلصات الفينولية عند نفس التركيز 10% كانت مثبطة للفطر *F. oxysporum* بنسبة 67.7% وهي اكبر من نسبة تثبيط الفطر *F. culum* والبالغة 62.1 %.

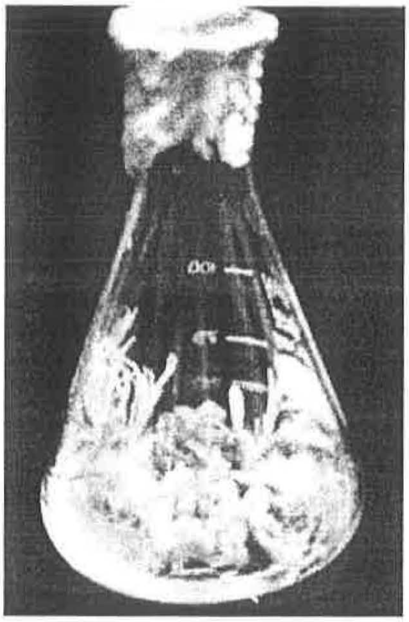
كما يبين الجدول كذلك ان المستخلصات الفينولية عند نفس التركيز 10% للفطر *F. oxysporum* *نسبة 1.67.7 وهي اكبر من نسبة تثبيط الفطر* F. culum البالغة 62.1%.

جدول (3) تأثير إضافة تراكيز مختلفة من المستخلصات الكحولية الخام للأجزاء (الورقة، كالس الورقة، الورقة الناتجة من التمايز) إلى وسط نمو الفطرين *F . oxysporum* و *F. culum* بدلالة الوزن الجاف.

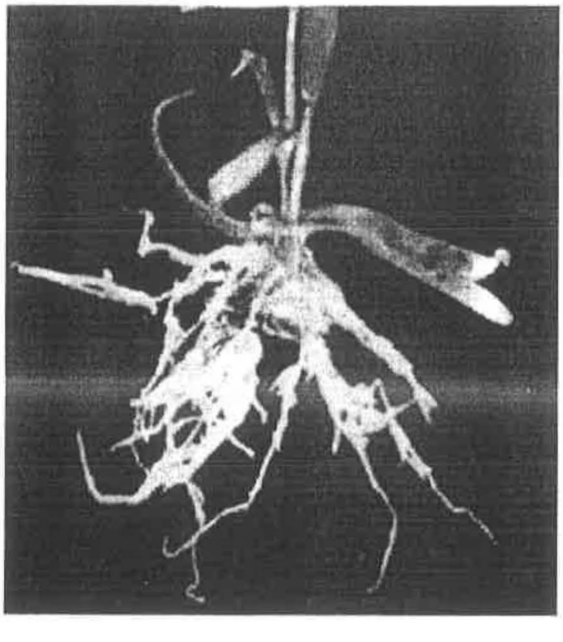
المادة النباتية	التركيز	*F . oxysporum*		*F. culum*	
		الوزن الجاف (غم)	نسبة التثبيط (%)	الوزن الجاف (غم)	نسبة التثبيط (%)
المقارنة	0.0	0.474*	0.0	0.301	0.0
الأوراق	1.0	0.290	38.8	0.276	8.30
	5.0	0.251	47.0	0.267	11.2
	10.0	0.210	55.6	0.195	35.2
كالس الأوراق	1.0	0.246	48.1	0.202	32.8
	5.0	0.209	55.9	0.147	51.1
	10.0	0.153	67.7	0.114	62.1
الأوراق الناتجة من الكالس	1.0	0.276	41.7	0.239	20.5
	5.0	0.220	53.5	0.188	37.5
	10.0	0.189	60.1	0.139	53.8

معدل ثلاثة مكررات/ معاملة/ مستخلص.

كالس الأوراق على وسط MS المزود بـــ BA 0.1 ملغم/لتر + 2,4-D 0.5 ملغم/لتر



نشوء الافرع الخضرية من كالس الاوراق فـــي وســـط MS المزود BA 3.0 ملغم/لتر و 0.1 ملغم/لتر IAA



تجذير الافرع الخضرية على وسط MS الحاوي على IBA 1.0 ملغم/لتر

المناقشة

إن القابلية الجيدة لكالس أوراق نبات القرنفل وتكوين الأفرع الخضرية في الوسط MS الصلب الحاوي على تراكيز مختلفة من BA وIAA قد يعزى إلى نوع الجزء النباتي المستخدم مقترناً بمحتواه الداخلي من منظمات النمو على المستويات المضافة منها إلى الوسط الغذائي وعلى محتواها من الخلايا الحية القابلة للتمايز. توصلت العديد من الدراسات على نبات القرنفل إلى نتائج مقاربة لما لوحظ (18، 19). هذه الدراسة أبدت اهتماماً كبيراً في الكشف عن الفينولات وفصلها لما لها دوراً كبيراً في العديد من المجالات الطبية والزراعية (20). ولكون هذه المركبات موجودة في أوراق نباتات القرنفل (8) ولكن وجودها في الكالس المستحدث من الأوراق ابدته النتائج عند (ظهور اللون الأصفر في المستخلص الكحولي الخام لكالس أوراق نبات القرنفل (15). إن التأثير الذي أظهرته المستخلصات الكحولية الخام للعينات النباتية الحاوية على المركبات الفينولية في تثبيط نمو نوعين من الفطريات *F. oxyporum* و*F. culum* بدلالة انخفاض الوزن الجاف للفطر قياساً بعينة المقارنة قد يعزى الى أن هذه المركبات الفينولية قد قيدت النشاط الانزيمي للفطريات وبالتالي أثرت على بناء البروتينات والأنزيمات لهذه الكائنات(21، 22) أو قد تسبب هذه المركبات الفينولية تأثيراً على النشاط الأيضي للفطر من خلال تأثيرها في الضغط الأزموزي لخلايا الفطر مما يؤدي الى انكماش وتجمع السايتوبلازم للخلايا وبالتالي موت الخلايا(23). فقد أشارت العديد من الدراسات الى تأثير هذه الحوامض الفينولية في تثبيط نمو فطريات الذبول التي تصيب نبات الحمص (7) والصنوبر (24). إن التأثير الواضح للمستخلص الكحولي الخام لكالس القرنفل مقارنة بتأثير مستخلص أوراق نباتات القرنفل البذرية وأوراق النباتات الناتجة من تمايز الكالس ربما يعزى إلى أن المدة الزمنية التي يمر بها الكالس من خلال زراعة النسيج في أوساط غذائية تحتوي على منظمات نمو مختلفة قد تزيد من كمية المواد الفعالة في الكالس (25) فضلاً عن ان هذه المنظمات قد تؤثر على الفعالية الأنزيمية المسؤولة عن بناء نواتج الايض الثانوي(26). وهذا ما أكده الباحث (27) مشيراً إلى دور منظمات النمو في زيادة بناء المركبات الفينولية في كالس نبات الورد.

المصادر

1. Lauri, A.; Kiplinger, D.C. and Nelson, K.S. "Commercial Flower Forcing". 7th ed., McGraw-Hill, Inc., New York (1968).

2. الغيطاني، محمد يسري. الزهور ونباتات الزينة وتنسيق الحدائق. الطبعة الأولى- مطابع المعارف، مصر (1967).

3. Thakur, M.; Sharma, D.R. and sharma, S.K. Plant cell Repts., 20: 825-828 (2002).

4. Mosquera T.; Angurita, A.; Montes de Gomez, V. Acta Hortoic. 307: 257- 263 (1992).

5. Gonsalves, A. K. and Ferreira, S. R. "Fusarium Primer" University of Hawaii Press, Manoa (1994).

6. Lahden Pera, ML. Acta Horts. 216: 85-92 (1992).

7. Mandavia, M. K.; Patel, C. M.; Maravia, G. V. and Parameswaray, M. Indian J. Agric Biochem., 10: 11-3 (1997)

8. Curir, P.; Marchesini, A. ; Danieli, B. and Mariani, F. Phytochemistry. 41 (2): 447- 450. (Abst) (1996).

9. Curir, P.; Danieli, B.; Dolci, M.; Pasini, C.; Guglieri, L. and Sacco, M. Plant Pathol., 742- 747 (Abs) (2000).

10. Curir, P.; Dolci, M.; Dolci, P.; Lanzotti, V. and Decooman, L. Wiley Interscience. Italy. (2002).

11. Vanpeer, R. Phytopathology, 81: 728- 734 (1991).

12. Niemann G. J. and steijl, H. Acta Hort. 2: 123 (Abst) (1994).

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

14. Harborne, J. B. "Phytochemical Methods" chapman and Hall Ltd. London (1973).

15. شندالة، موفق ياسين، الجبور، نزار حسن صالح، روعة غياث الدين "تشخيص المركبات العضوية" دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل (1986).

16. Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. " Basic Plant Patholo Methods" CRC Press inc., Florida (1987).

17. Storti. E.; Latil, C.; Salti, S.; Bettini, P.; Bogani, P.; Pelleegrini, M. G.; Simeti, C.; Monlnar, A. and Buiatt, M. Theor. Appl. Gent., 89: 123- 128 (1992).

18. Pareek, A.; kantia, A. and Kothari, S. L. Indian J. of Biotechnology. 3: 263- 266 (2004).

19. Paker, R. A.; Tatum, J. H. and Nernec, S. Phytopathology 17: 951-954. (1992).

20. العيساواتي، فراس محمد جمعة "التقدير الطيفي لعدد من المركبات الفينولية والروائية بوساطة تفاعلات الاقتران التأكسدي العضوي" رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل (2002).

21. Bilgrami, K. S. and Dube, H. C. "Modern Plant Pathology University of Bhagalpur Press, India. (1982).
22. Dahm, H. and Redlak, K. Sylwan. CXL. IV No. 4 (Abst.) (2000).
23. Benhamou, N. and Belanger, R. R. Plant Physiology. 118: 1203-1212 (1998).
24. Shein I. V.; Polyakova, G. G. and zrazhe vshaga, G. K. Russian. J. of Plant Physiology. (2003).
25. Larkin, P. J. and Scowcroft, W. R. "Theor. Apple Genet"., 60: 197-214 (1981).
26. Bagrati shvili, D. G and Zapromentov, M. N. soviet plant physiology. 27: 318- 324 (1980).
27. Davis, M. E. Planta. 104: 50 (1972).