دراسة كيميائية حيوية على الأحماض الأمينية المكونة لبروتينات البذور الحجرية أثناء الإنبات و كسر طور السكون الموجود في البذور

محمد علي قاسم*

DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v12i1.542

الملخـــــص

فى هذه الدراسة تمت معاملة البذور بالنقع فى حمض الجبر يليك (ppm1000) والسيكوسيل (50 ppm) والثيويوريا (0.1% w/w) ويوديد البوتاسيوم (0.1%w/w) وكذلك النقع فى الماء العادى كمعاملة قياسية (control) وذلك لمدة 24 ساعة ثم الإنبات . كما تم إجراء الكمر البارد فى رمل مندى لمدة أربعة أسابيع على درجة حرارة 5 م وأجريت هذه المعاملات للتخلص من السكون الذى تعانى منه البذور ثم أجريت تحليلات كيميائية لهذه البذور قبل وبعد المعاملة وأثناء الإنبات ، وأهم هذه التحليلات هو تحليل الأحماض الأمينية الذائبة (الحرة) وتقدير المركبات الفينولية الكلية التى يعتقد أن لها علاقة بالسكون وكذلك تم تقدير نشاط إنزيم الأرجينيز كأحد الإنزيمات المسئولة عن بعض التحولات الكيميائية الهامة أثناء الإنبات .

و تم تقدير الأحماض الأمينية المكونة لبروتينات بذور المشمش كأحد البذور ذات النواة الحجرية أثناء الإنبات والتغيرات التى تحدث لها وكذلك دراسة ظاهرة السكون فى هذه البـــذور ومحاولـــة كســـر السكون باستخدام المعاملات السابقة ، و تم تقدير البروتين المخزن فى الاندوســـبرم ، كمـــا تم متابعـــة التحولات الكيميائية التى تحدث له أثناء الإنبات ، وقد وجدنا أنه أثناء الإنبات يحدث تفكـــك مكثـــف للبروتين المخزن ويحدث هذا بالتوازى مع تخليق سريع للبروتين فى الجنين وكذلك لوحظ زيادة الأحمـــاض الأمينية الذائبة (الحرة) أثناء عملية الإنبات وتوفرها للجنين الذى يستفيد منها فى العديد مـــن التحـــولات الكيميائية التى تتم فى خلايا أنسجته مما يؤدى إلى نموه وظهور البادرات .

* قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة عمر المختار ، البيضاء – ليبيا ، ص.ب. 199 .

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

المقدمـــــة

تعتبر الأحماض الأمينية هى حجر الزاوية فى بناء جميع البروتينات وينتشر عدد كبير منها فى الطبيعة إلا أنه حوالى 20 حمض أمينى فقط هى التى تكون الأساس فى تركيب معظم البروتينات ، كما أن هناك عدد من الأحماض الأمينية الحرة تلعب دورا حيويا هاما فى الأنسجة الحية .

ويحدث التحول الكيميائي للبروتين فى النبات فى عملية متصلة تنحصر بين التخليق والتفكك synthesis and breakdown ويتم ذلك بواسطة مجموعة من الإنزيمات المتخصصة (Davis and chapman. Proteolytic enzymes 1980, Gifford et al. 1982) وتجب الإشارة إلى أن آليات تخليق البروتين وتفككه لا يتوفر عنها معلومات كافية فى مثل هذه الحالات وغيرها فى النبات مما يشكل تحديا حيويا فى أهميته مطروحا أمام العلماء والباحثين وخاصة دراسة التحول الكيميائي الحادث للبروتين لما له من أهمية تطبيقية وأكاديمية (Mutu and Gal 1999, Davies 1997, Hill and Phyllip 1997 and Saalbach .et al. 1998)

من هذا المنطلق قمنا بدراسة مسار البروتين المخزن فى بذور المشمش (Prunus armeniaca L) كأحد البذورذات النواة الحجرية وأوضحنا كيف يتم التحول التمثيلى لهذه البروتينات وينتج منها أحماضا أمينية حرة ذائبة يستفيد منها الجنين فى عمليات التمثيل المختلفة .

كما تم دراسة ظاهرة السكون الموجودة فى مثل هذه البذورحيث أنه من المعروف أن ظاهرة السكون Dormancy ظاهرة طبيعية تحدث فى بعض أنواع البذور (مثل البذور الحجرية) وتعود اسبابها إلى أسباب داخلية تتعلق بعدم قدرة الجنين إجراء عمليات فسيولوجية وحيوية لوجود بعض المركبات الغير معروفة حتى الأن والتى يتم دراستها للتعرف عليها ، وأسباب خارجية تتعلق بظروف البيئة مثل درجات الحرارة وغير ذلك (Vegis, 1964) وتؤدى هذه الظاهرة إلى تأخر الإنبات وعدم قدرة الجنين على إجراء العمليات الفسيولوجية (Hassan 1991) وقد أقترحت بعض المعاملات لكسر طور السكون مثل إزالة الغلاف الخارجى الصلب للبذرة أو إستخدام بعض منظمات النمو (Barton 1965a,; Stokes 1965; Bidwell 1974 and Fadle et al. 1978) .

ويهدف البحث إلى دراسة الأتى :

1. إستخلاص البروتين الكلى المخزن فى البذور وتقدير الوزن الجزيئى له.
2. تحليل الأحماض الأمينية الذائبة (الحرة) فى البذور قبل وبعد المعاملات السابقة وأثناء الإنبات فى مراحل مختلفة .
3. تقدير نشاط إنزيم الأرجينيز Arginase كأحد إنزيمات التمثيل الغذائى فى البذور العادية والمنبتة والمعاملة .

4. إستخدام بعض المعـــاملات لكســـر طـــور السكون .
5. تقدير المركبات الفينولية الكلية قبـــل وبعـــد المعاملة .

المواد وطرق البحث

أولا : أنواع المعاملات

قد أجرينا بعض المعاملات لكسر طـــور السكون فى البذور وهذه المعاملات هى :

1. الكمر البارد Cold storage حيث يتم كمر البذور فى وسط رملى مندى لمـــدة أربعـــة أسابيع على درجة 5 درجة مئوية.
2. النقع فى محلول حمـــض الجبرييليـــك (GA_3) حيث تم نقـــع البـــذور فى محلـــول حمـــض الجبرييليك بتركيـــز (1000 ppm) لمـــدة 24 ساعة.
3. النقع فى محلول السكوسيل (منظم نمو) بتركيز (50 ppm) لمدة 24 ساعة .
4. النقع فى محلول الثيويوريا (0.1% w/w) لمدة 24 ساعة .
5. النقع فى محلول يوديـــد البوتاســـيوم (0.1% w/w) لمدة 24 ساعة .
6. النقع فى المـــاء العـــادى لمـــدة 24 ســـاعة (control) .

ثم أخذت البذور للإنبات وحسبت نسبة الإنبـــات ثم أخذت عينات من البذور قبل وبعد المعاملة وتم فيها تقدير الأحماض الأمينية الذائبة (الحرة) وتقدير المركبات الفينولية الكلية.

ثانياً : إستخلاص البروتين الكلى وتقدير الـــوزن الجزيئى له

تم إستخدام محلـــول مـــنظم فوســـفات الصوديوم عند درجة pH 7.5 ومحلـــول مـــنظم Lammli الذى يحتوى على 62.5 ملى مول مـــن Tris فوسفات عند درجـــة pH 6.5 وكـــذلك يحتوى على SDS 2% (w/w) بالإضافة إلى 10% (V/V) من الجليسرول حيث تم الإستخلاص أربع مرات بواسطة محلول منظم فوسفات الصوديوم ثم الإستخلاص بواسطة محلـــول مـــنظم Lammli وذلك طبقا لطريقـــة (Gifford et al. 1982) ثم تقدير البروتين الكلى بواسطة طريقة (Lowery et al. 1951) ثم تقـــدير الـــوزن الجزيئـــى لهـــذه البروتينات باستخدام SDS/PAGE طبقا لطريقـــة (Loening 1967) .

ثالثاً : تحليل الأحماض الأمينية

أجرى تحليل مائى لبروتينات صنفين من البذور Protein hydrolysis حيث أخذ 0.1 جم من الراسب البروتينى المستخلص وأضيف إليها 10 مل من حامض HCl 6 عيارى فى أنابيب محكمة خاصة لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 110 ْم وبعد التحليل المائى تم التخلص من حمض HCl الزائد بالتبخير تحت تفريغ والمتبقى تم إذابته فى محلول منظم سترات الصوديوم عند درجة pH 2.2

وتم التخلص من أى مواد غير ذائبة بالترشيح ، والمحلول الرائق أخذ منه 30 ميكروليتر وتم وضعها فى جهاز تحليل الأحماض الأمينية Amino acid analyzer وتم التقدير ، وبنفس الطريقة عند تحليل الأحماض الأمينية فى مراحل الإنبات المختلفة و بعد الكمر البارد ، وتم تقدير التربتوفان بعد التحليل المائى القلوى Alkaline hydrolysis طبقا لطريقة (Blauth et al. 1963) .

رابعاً : تقدير نشاط إنزيم الأرجينيز

تم استخلاص الإنزيم وتقديره بطريقة (Micallef and Shelp, 1989) تم تنشيط المستخلصات بالتحضين على درجة 30 ْم ، وتم تحضير 100 ميكرولتر من المستخلص المنشط وأضيف إليه 0.9 مل من الأرجنين 0.3 مولار عند درجة pH 9.5 مع 1 ملى من $MnSO_4$ ثم 1 ملى من Maleate ثم تحضن لمدة 30 دقيقة على درجة 30 ْم ثم يتم التقدير باستخدام الطريقة السابقة.

خامسا : تقدير المركبات الفينولية الكلية

تم إستخلاص الفينولات الكلية طبقا لطريقة (Price et al. 1978) حيث تم أخذ نصف جرام من العينة متروعة الزيت وتم إضافة 10 مل من كحول الميثانول وإضافة حمض الهيدروكلوريك 1% (V/V) ثم التقليب المستمر لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة الغرفة ثم الترشيح وأخذ الراسب وأجرى إستخلاص مرة أخرى بنفس الطريقة ثم تجميع الراشح فى المرتين ويتم تقدير المركبات الفينولية فيه باستخدام الطريقة اللونية التى أوضحها (Price and Bulter 1977) ثم القياس اللونى عند طول موجى 720 نانومتر باستخدام جهاز Spectrophotometer وتم قياس تركيز المركبات الفينولية بعد الإنبات بنفس الطريقة.

النتائج والمناقشة

إتضح من نتائج هذه الدراسة أنه أثناء الإنبات يحدث تفكك مكثف للبروتين المخزن ويحدث هذا بالتوازى مع تخليق سريع للبروتين فى الجنين وكذلك لوحظ زيادة الأحماض الأمينية الذائبة (الحرة) أثناء عملية الإنبات وتوفرها للجنين الذى يستفيد منها فى العديد من التحولات الكيميائية التى تتم فى خلايا أنسجته مما يؤدى إلى نموه وظهور البادرات.

كذلك إتضح من النتائج زيادة نشاط إنزيم الأرجينيز Arginase فى البادرات نتيجة زيادة العمليات التمثيلية للجنين و لم تحدث زيادة فى نشاط الإنزيم فى البذور العادية ، أما بعد معاملة الكمر البارد كانت هناك زيادة ضئيلة فى النشاط مما يفسر أهمية عملية الكمر البارد فى كسر طور السكون فى البذرة.

كما أتضح أن أنسب المعاملات لكسر طور السكون هى الكمر البارد والمعاملة بحمض الجبريليك وقد توافقت هذه النتائج إلى حد قريب

مع ما عرضه كل من Jacobsen et al 1995; Frisby and Scluyler, 1993 and Dahshan et. al., 1987) .

يوضح الشكل رقم (1)الحركة النسبية لبعض البروتينات القياسية فى المجال الكهربى عند إجراء عملية التفريد الكهربى للبروتينات وعلاقتها بالوزن الجزيئى ويستخدم هذا المنحنى لإستخراج قيم الأوزان الجزيئية للبروتينات ، حيث تقارن قيم الحركة النسبية Rm فى المجال الكهربى بالقيم الموجودة فى المنحنى ثم يستخرج الوزن الجزيئي المقابل لهذه القيم فى المنحنى ، وقد أتضح أن نسبة البروتين الكلى المخزن فى البذور تقدر بحوالي 27% من الوزن الجاف للبذرة ، وتراوحت الأوزان الجزيئية لها من 5 حتى 85 كيلودالتون وهى كالاتي : (5–14) ، (14–25) ، (25–35) ، (35–47) ، (47–66) ، (66–85) .

يعرض الجدول رقم (1) نسب الأحماض الأمينية الموجودة فى البروتينات الغير ذائبة فى البذور ونلاحظ أن أكبر نسبة كانت للحمض الأميني الجلوتاميك والجلوتامين (Glx) ثم الحمض الأميني الأرجنين ، وقد توافقت النتائج السابقة مع ما عرضه كل من (Friedman 1996, Femenia et. al., 1995) .

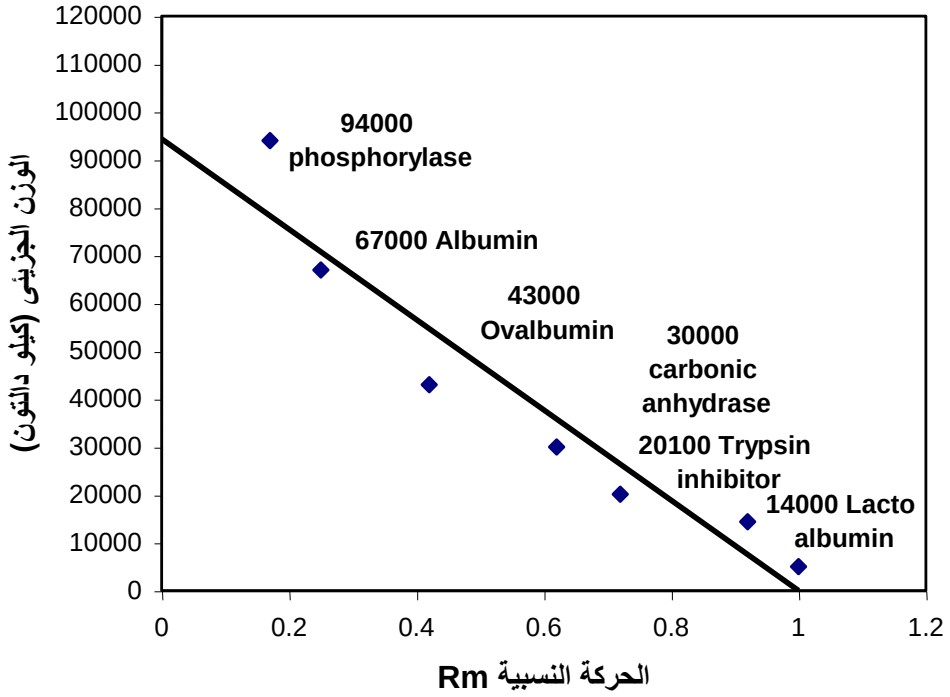
ويتضح من الشكل رقم (2) انخفاض نسبة البروتين المخزن فى البذور مع بداية عملية الإنبات وذلك بسبب تحللها إلى أحماض أمينية حرة يستخدمها الجنين ، وكانت البروتينات ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة أسرع فى التحلل من البروتينات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة ، وتلاحظ أيضا وجود نسبة تحلل بسيطة فى البروتينات بعد عملية الكمر البارد وقد يفسر ذلك أهمية هذه العملية فى كسر السكون .

أما الشكل رقم (3) فيوضح إرتفاع نسبة الأحماض الأمينية الحرة فى البادرات وزيادتها أيضا ولكن بدرجة قليلة وضئيلة بعد عملية الكمر البارد. ويعرض شكل رقم (4) زيادة نشاط إنزيم Arginase فى البادرات نتيجة عملية هدم حمض الأرجنين حيث ينتج نتيجة تحلله اليوريا وهى مركب نتروجينى هام لنمو البادرات ، وكانت زيادة النشاط لهذا الإنزيم ضئيلة بعد عملية الكمر البارد ولكن أكثر مما هو عليه فى البذور العادية الغير معاملة .

ويوضح الجدول رقم (2) نسب الأحماض الأمينية الذائبة (الحرة) فى البادرات بعد مراحل مختلفة من بداية الإنبات ومنه نلاحظ زيادة نسبة هذه الأحماض بتقدم عملية الإنبات دليلا على تحلل البروتين المخزن حيث يستخدم الجنين هذه الأحماض الأمينية فى عمليات التمثيل الغذائى المختلفة .

ويعرض الشكل رقم (5) انخفاض نسبة المركبات الفينولية الكلية خلال فترات الكمر البارد ويعلل ذلك أيضا أهمية الكمر البارد والمعاملة

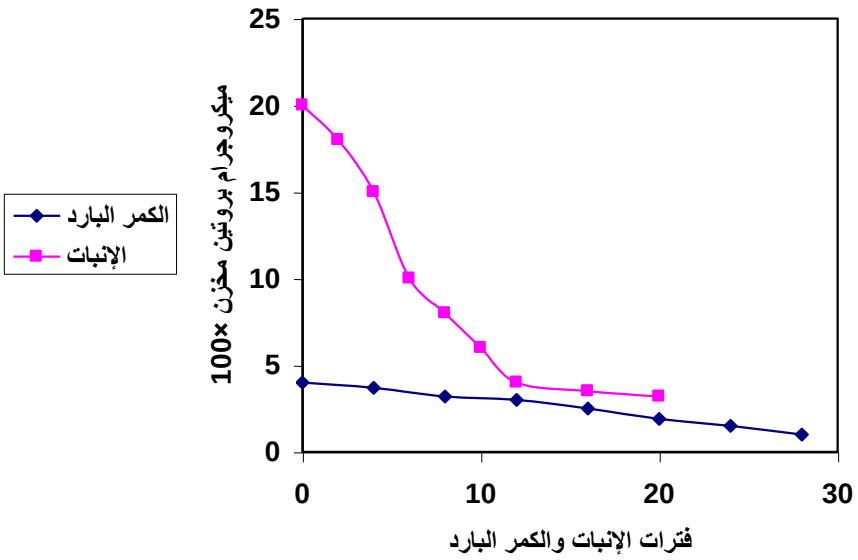
بحمض (GA_3) فى كسر طور السكون فى البذور ، ويوضح شكل رقم (6) تأثير المعاملات المختلفة على كسر طور السكون ويتضح أن أهم تأثير كان للمعاملة بحمض الجبريليك و السيكوسيل حيث أدت هذه المعاملات إلى انخفاض نسبة المركبات الفينولية التى يعتقد بأن لها علاقة كبيرة بالسكون ، ويعرض جدول رقم (3) تأثير المعاملات المختلفة على نسبة الإنبات ويتضح أن أكبر نسبة إنبات تحققت باستعمال حمض الجبريليك والسيكوسيل والكمر البارد على التوالى .



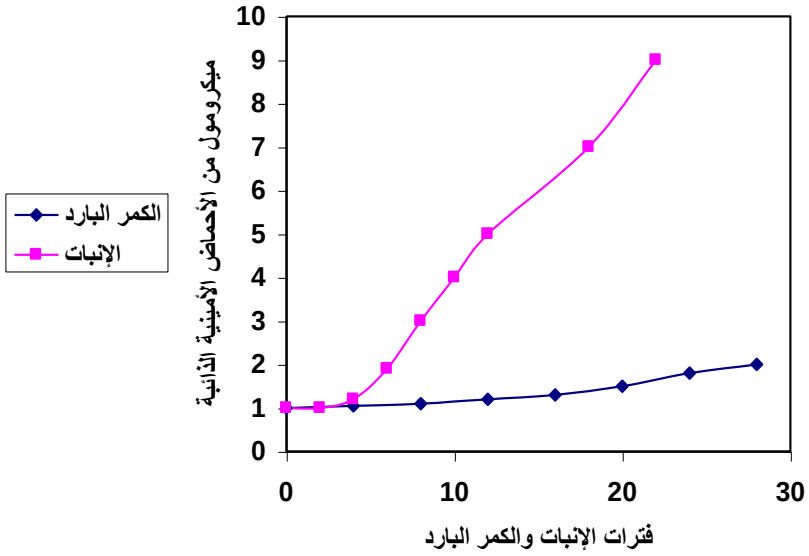
شكل 1 الحركة النسبية لبعض البروتينات القياسية فى المجال الكهربى (SDS/PAGE)

جدول 1 الأحماض الأمينية الموجودة فى البروتينات الغير ذائبة المخزنة فى صنفين من بذور المشمش (معبرا عنـــها بالجرام / 16 جم نيتروجين)

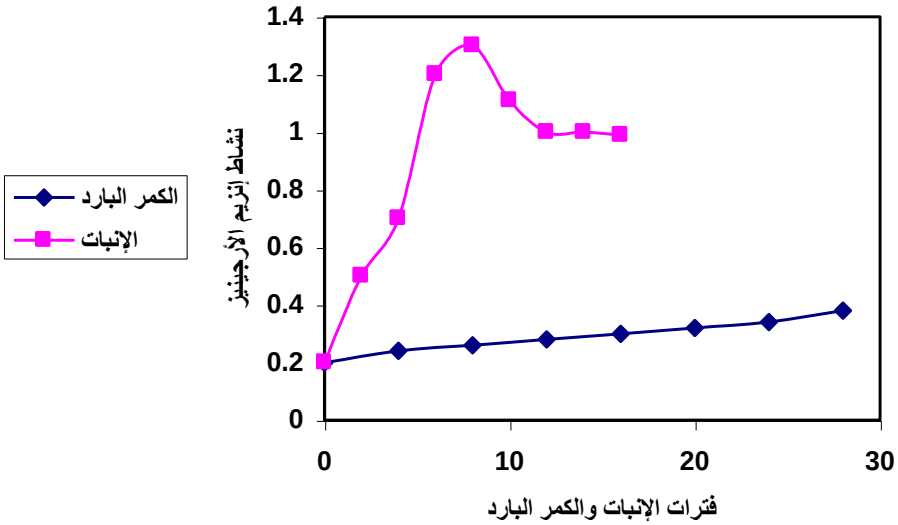
النسبة		الأحماض الأمينية الأساسية :
Canino	El-amar	
8.17	8.50	Isoleucine
4.32	4.51	Leucine
2.54	2.65	Lysine
0.09	0.09	Methionine
2.63	2.74	Histidine
3.38	3.53	Phenylalanine
4.70	4.90	Valine
2.82	2.94	Threonine
1.79	1.86	Tryptophan
32.53	33.92	إجمالى الأحماض الأمينية الأساسية TEAA
		الأحماض الأمينية غير الأساسية :
4.70	4.90	Alanine
9.49	9.90	Arginine
7.52	7.84	Aspartic acid
21.71	22.64	Glutamic acid
6.58	6.86	Glycine
0.094	0.098	Cystine
1.79	1.86	Proline
3.10	3.23	Serine
1.88	1.96	Tyrosine
54.984	57.328	إجمالى الأحماض الأمينية غير الأساسية
87.514	91.248	الأحماض الأمينية الكلية TAA
37.17%	37.17%	نسبة الأحماض الأساسية إلى الكلية



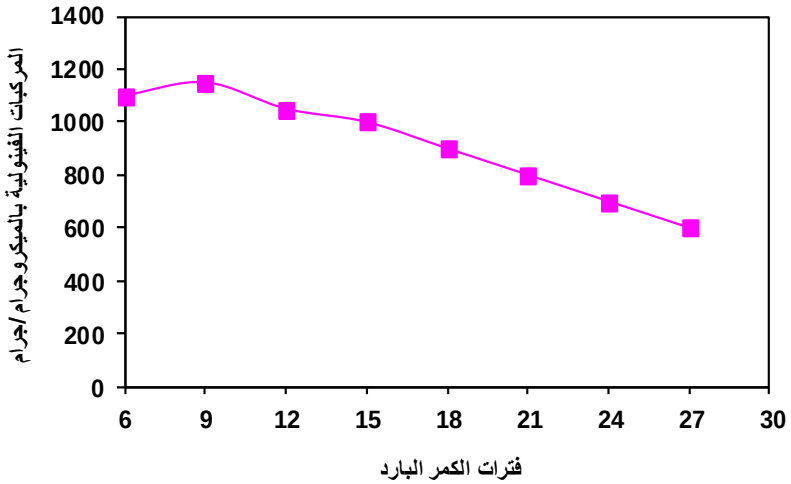
شكل 2 تحلل البروتينات الغير ذائبة المخزنة الموجودة فى البذور وأوزانها الجزيئية والتغيرات التى تحدث لها أثنـــاء عملية الكمر البارد والإنبات



شكل 3 التغيرات التي تحدث للأحماض الأمينية الذائبة في البادرات وفي أثناء الإنبات



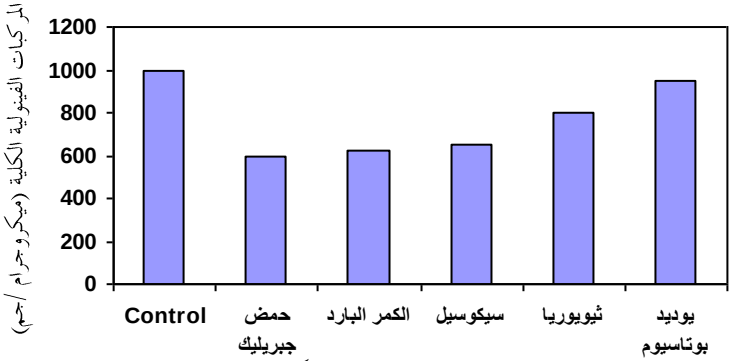
شكل 4 نشاط إنزيم الأرجينيز في البادرات وفي الكمر البارد



شكل 5 تأثير معاملة الكمر البارد (عند 5 م) على تركيز المركبات الفينولية الكلية

جدول 2 الأحماض الأمينية الذائبة (الحرة) فى البادرات بعد فترات مختلفة من بداية الإنبات وفى نهاية فترة الكمـــر البارد وفى البذور العادية غير المعاملة (معبرا عنها بالنانومول)

Amino acid	فى البذور الناضجة	فى الكمر البارد	الإنبات			
			بعد 3 يوم	6 يوم	9 يوم	12 يوم
Ile	0.16	0.46	0.46	13.9	32.4	63.4
Leu	0.11	0.45	0.57	14.9	26.5	35.5
Lys	0.10	0.10	0.28	2.27	3.19	12.7
Met	0.08	0.07	0.25	1.68	2.52	4.85
Phe	0.21	0.53	0.40	6.92	15.4	17.0
Val	0.39	0.95	1.50	39.7	140	254
Thr	0.22	0.57	0.78	5.82	17.3	45.5
Trp	0.16	0.17	0.19	3.18	17.2	45.9
Ala	1.25	0.63	5.47	39.2	76.1	174
Arg	4.29	7.09	15.2	141	755	2326
Asp	4.29	7.09	15.2	141	755	2326
Glu	5.67	10.06	28.5	50.5	138	248
Gly	0.25	0.19	0.75	1.15	4.70	14.7
His	0.21	0.27	0.97	12.3	61.4	195
Pro	3.12	4.77	6.95	13.3	32.2	38.7
Ser	0.74	0.77	2.0	13.7	53.2	152
Asn	2.88	3.05	6.12	742	4388	12924
Tyr	0.47	0.92	1.39	14.2	7.68	19.0
Gln	1.07	0.68	10.1	92.1	905	1699
Total	23.9	38.5	91.1	1215	6699	18330



شكل 6 تأثير المعاملات على نسبة المركبات الفينولية الكلية

جدول 3 نسبة الإنبات الناتجة بعد معاملة صنفين من بذور المشمش بعدة معاملات مختلفة لكسر طور الســـكون الموجود فيها

المعاملة	نسبة الإنبات %							
	El-amar				Canino			
	3 يوم	6	9	متوسط	3	6	9	متوسط
حمض الجبريلك	65	85	97	82.3	65	85	98	82.6
سيكوسييل	62	80	94	78.6	65	80	95	80
ثيويوريا	60	82	90	74	60	70	90	73.3
يوديد البوتاسيوم	60	70	90	73.3	60	70	90	73.3
الماء	45	55	70	56.6	45	55	72	57.3

جدول 4 نسبة الإنبات الناتجة بعد معاملة صنفين من بذور المشمش بالكمر البارد لكسر طور السكون

الكمر البارد عند 5 م لمدة 27 يوم	9يوم	18	27	متوسط	9	18	27	متوسط
	60	70	95	75	60	75	98	77

Biochemical study on the amino acid content of storage proteins of stone seed (prunus armeniaca L) during break the dormancy and germination

Mohammed Ali Kassem*

Abstract

In this study the amino acid content of storage proteins of stone seeds (prunus armeniaca L) and protein mobilization during germination and break the dormancy of seeds were investigated.

The seeds washed air dried, hard pits (endocarp) were removed and the seeds were subjected to the following treatments:

1. Soaking in gebberellic acid (GA_3) solution (1000 ppm) for 24 hour.
2. Soaking in cycocel (ccc) solution (50 ppm) for 24 hrs.
3. Soaking in thiourea solution (0.1%) for 24 hrs.
4. Soaking in potassium iodide (0.1%) for 24 hrs.
5. Cold storage (stratification) at 5 ºCfor four weeks in moist sand.
6. Soaking in water for 24 hrs.

The germination percentage, soluble amino acid content of seedlings (in different stages), total phenolic compounds aand Arginase activity were determined.

The storage proteins are breakdown and the soluble amino acid contents of seedlings were increased during germination so amino acid utilization in seeds during germination and early seedling growth. Also, this investigation reports an attempts that have been made to remove dormancy and induce germination of seeds.

* Department of Chemistry, Omar Al-Mukhtar University, El-Beida – Libya.

المراجـــــع

Barton, L.V. (1965a): Seed dormancy: General servey of dormancy types in seeds, and dormancy imposed by external agents. Encye. Plant Physiol., 15(2): 699-720.

Bidwell, R.G.S. (1974): Plant physiology. MacMillan Published Co., Inc., New york.

Blauth, O.J.; Charezinski, M. and Berbec, H. (1963): A new rapid method for determining tryptophan. Anal. Biochem., 6, 29.

Dahshan, I.O.; El-Shazly, A.S. and Abou Rawash, M. (1987): effect of seed coat removal, GA3 and cold stratification on germination of apricot seeds and subsequent seedling growth. Annals Agric. Sci., Fac. Agric., Ain Shams Unive., Cairo, Egypt, 32(3): 1625-1635.

Davies, J. M. (1997) : Adv, Bot. Res. 25, 339-363.

Davis, H.V; Chapman, J.M. (1980): The control of food mobilization in seeds of cucumis sativusl planta 149: 288-291.

Fadle, M.S.; Baz, A.G.I.O. and Tayel, S. (1978): The effect of low temperature on the dormancy of "Favoumi" apricot seeds and on activities of native inhibitors existing in their seed coats. Egypt. J. Hort., 5(2): 105-114.

Femenia, A.; Rossello, C.; Mulet, A. and Canellas, J. (1995): Chemical composition of bitter and sweet apricot kernels J. Agric. Food Chem., 43: 356-361.

Friedman, M. (1996): Nutritional value of proteins from different food sources. J. Agric. Food Chem., 44: 6-29.

Frisby, J.W., and Scluyler, D.S. (1993): Chilling of endodormant peach propagules : seed germination and emergence. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 118 (2):248-252.

Gifford, D. J. Greenwood, J.S., and Bewley, J. D. (1982): Deposition of matrix and crystalloid storage proteins during protein body development in the endosperm of Ricinus communisl plant physiology 69: 1471-1478.

Hassan, M.Sh (1991): Evaluation of apricot kernel as a new protein source. Minia J. Agric. Res. Dev., 13: 1472-1483.

Hill, J. And Phyllip, L. H. (1997) : FEBS Lett. 409, 357-360.

Jacobsen, J.V., Gubler, F., and chandler, P. M. (1995): Gibberellin action in germinated cereal grains. Kluwer Achademic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 246-271.

Loening, U.E. (1967): Fractionation of high molecular weight ribonucleic acid by poly acrylamide gel electrophoresis. Biochem. J., 102: 251-257.

Lowry, O.J.; Rosenbrough, N.V.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275.

Micallef, B.J., Shelp, B.J. (1989a): Arginine metabolism in developimg

soybean cotyledons. Plant Physiology 90:631-634.

Mutu, A. And Gal, S. (1999) : Physiol. Plant. 105, 569-576.

Price, M.L. and Bulter, L.G. (1977): Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain J. Agric. Food Chem. 25: 1268-1273.

Price, M.L.; Van Scayoc, S. and Bulter, L.G. (1978): A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. J. Agric. Food Chem., 26: 1214-1218.

Saalbach, L., Muntz, K. And Nietsen, N. C. (1998) : Plant Cell, 10, 343-357.

Stokes, P. (1965): Temperature and seed dormancy. Encyc. Plant Physiol., 15:746-803.

Vegis, A. (1964b) : Dormancy in higher plants Ann. Rev. plant physiol., 15: 185-224.