مقاله تحقیقی

بررسی نقش برخی ترکیبات آلی (قندها و تنظیم کننده‌های رشد) در رویش هاگ و رشد گامتوفیت خزه *Tortula ruralis* L.

معصومه میرزایی، فریبا شریف‌نیا، زهرا گودرزی*

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

***مسؤول مکاتبات:** زهرا گودرزی، تهران، اول خیابان شهید برادران سلیمانی، کوی شهید ارضی، کوچه ستاره، پلاک ۱۱، تلفن: ۲۲۲۰۳۰۷۸، پست الکترونیکی: gdr_zhr@yahoo.com

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه محمودیه، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱۲ تاریخ پذیرش:۹۰/۹/۱

چکیده

در این پژوهش، خزه *Tortula ruralis* L. با نام جدید *Syntrichia ruralis* متعلق به تیره Pottiaceae در دو مرحله اسپوروفیتی و گامتوفیتی در دو فصل رویشی بهار و پاییز، جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. پس از تایید گونه با استفاده از استریومیکروسکوپ، میکروسکوپ نوری و الکترونی از بخش‌های مختلف آن برای مطالعات بعدی استفاده به عمل آمد. کشت هاگ‌های حاصل از بخش اسپوروفیتی در شرایط سترون با شش روش سترون کردن و سه روش کشت در محیط کشت پایه MS با استفاده از هورمون‌های (۱/۲mg/lit) 2.4.D، Kin (۱/۲mg/lit) و (۱mg/lit)2IP در غلظت‌های مختلفی از دو قند ساکاروز و سوربیتول صورت گرفت. تندش هاگ با تشکیل سلول‌های پروتونمایی به طور متوسط پس از ۱۰ روز در مرحله ۲ تا ۳ سلولی مشاهده گردید. سطح گامتوفیت حاصل بعد از ایجاد تعداد انگشت شماری سلول، با ایجاد انشعاباتی گسترش یافت. سلول‌های کلرونمایی ابتدایی در پروتونما هسته بزرگ داشته و محتوای کلروپلاستی با میکروسکوپ نوری قابل مشاهده بود که به تدریج، میزان کلروپلاست‌ها کاهش یافته، و به سمت سلول‌های کلونمایی بیرنگ پیش رفت. با گذشت۴۰ روز از کشت هاگ ریزویید به صورت توده‌ای نمایان شد. پس از گذشت ۴۵ روز، ساقه‌نما مشاهده گردید. قند ساکاروز نقش اساسی در تندش هاگ دارد. بهترین شرایط سترون در الکل۷۰ به مدت ۳۰ ثانیه و آب ژاول ۱۲درصد به مدت ۳ دقیقه بود. از سه روش جهت کشت هاگ استفاده شد. بهترین روش جهت کشت هاگ آن است که با استفاده از اسکالپل استریل، هاگدان‌ها روی لام خرد گردید و در کنار شعله و شرایط سترون هاگ‌ها به محیط‌های کشت انتقال داده شد. بهترین محیط‌های کشت جهت جوانه‌زنی هاگ‌ها و رشد پروتونما محیط‌های MS3 و MS7 محیط‌های حاوی ساکاروز و سوربیتولی بود که سرشار از ویتامین و هورمون 2IP بودند. ضعیف‌ترین محیط‌ها جهت تندش هاگ، محیط‌های حاوی سوربیتول معرفی می‌شوند که به نظر می‌رسد قند سوربیتول، با ایجاد تنش خشکی در محیط، باعث ایجاد تأخیر در رویش هاگ می‌شود. هورمون‌های 2.4.D، Kin و 2IP نقش مهمی در تندش هاگ و ایجاد مرحله گامتوفیتی ایفا می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: *Tortula ruralis* L.، رویش هاگ، ساکاروز، سوربیتول

مقدمه

بریوفیت‌ها (Bryon= خزه) با وجود ساختمان ساده و تشابه آشکاری که با برخی جلبک‌های ساده دارند، مقدمه علم جدیدی به اسم کورموفیت‌ها (Cormophytes) (در زبان فارسی به معنی ساقه-دار یا تنه‌دار) و یا آرکگنیات Archegoniates را تشکیل می‌دهند که به تدریج با محیط خشکی، سازگار شده‌اند (۱). این گروه از گیاهان، در عصر دونین، در حدود ۴۰۰ میلیون سال پیش، ظاهر شده و در کربونیفر اول، در حدود ۳۴۵ میلیون سال قبل،کاملاً گسترش یافتند (۲). بریوفیت‌ها (شامل خزه‌ها، جگرواش‌ها و شاخ واش‌ها) بخشی از عالم گیاهی و به عنوان ابتدایی‌ترین تولیدکنندگان از گیاهان خشکی‌زی محسوب می‌شوند (۴). بریوفیت‌ها که از لحاظ جایگاه تاکسونومیکی، بین جلبک‌ها و نهان‌زادان آوندی قرار گرفته‌اند، حدود ۲۴۰۰۰ گونه در سراسر جهان دارند (۵) که از این حیث، دومین گروه بزرگ از گیاهان خشکی‌زی بعد از گیاهان دانه-دار به حساب می‌آیند (۶) آنها به عنوان اولین گیاهان خشکی، مورد توجه قرار گرفته و به کمک آن می-توان از تغییر نشان ویژگی‌ها طی مراحل اولیه تکامل گیاهان خشکی، اطلاعاتی به دست آورد (۷). دستگاه رویشی و زایشی تا حدودی تفکیک یافته است، ولی دارای ساختار بافتی مشخصی نیستند. شواهدی مبنی بر این وجود دارد که گیاهان خشکی‌زی ابتدایی، مشتق از اجداد جلبک مانند خود هستند که احتمالاً سبز بوده‌اند (۸). این گروه گیاهی، فاقد گل، برگ، ساقه و ریشه حقیقی است. چرخه زندگی خزه-ها دارای دو مرحله گامتوفیت (هاپلوییید) و اسپوروفیت (دیپلوییید) است. در خزه‌ها مرحله گامتوفیت یا نسل هاپلوییید غالب است.

خزه *Tortula ruralis* L.، گیاهی آکروکارپ، متعلق به سلسله Plantae ، شاخه Bryophyta، راسته Pottiales، تیره Pottiaceae و گونه *ruralis* است (تصویر ۱). با توجه به این که بریوفیت‌ها نقطه آغازین توالی در جوامع گیاهی هستند، در صدد مطالعات پایه‌ای و بررسی‌های کاربردی آنان برآمدیم. بررسی‌های مرجع‌شناسی و جستجوهای رایانه‌ای در مورد بریوفیت‌ها نشان می-دهد، تولید و تکثیر رویشی این دسته از گیاهان از طریق کشت بافت نسبت به گیاهان آوندی، کمتر مورد توجه قرار گرفته است. لذا از شاخه خزه‌ها، خزه *Tortula ruralis* L. انتخاب شد و بر آن شدیم که کشت هاگ‌های حاصل از بخش اسپوروفیتی را در شرایط سترون در محیط کشت پایه MS با استفاده از هورمون‌های Kin، 2.4.D و 2IP در غلظت‌های مختلفی از دو قند ساکاروز و سوربیتول، مورد آزمایش و بررسی قرار دهیم.

تصویر ۱- خزه *Tortula ruralis* در طبیعت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و مطالعات صحرایی

خـزه.*Tortula ruralis* L جهت کشت هاگ، از منطقه فیروزکوه در دو فصل رویشی بهار و پاییز در دو مرحله اسپوروفیتی و گامتوفیتی، جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت (تصویر ۱).

مرحله مطالعات هاگ‌شناسی

از هاگ و زواید پریستومی، در دانشگاه تربیت مدرس، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM (Scanning Electron Microscope) ساخت شرکت فیلیپس (Philips) از کشور هلند و مدل XL30، عکس الکترونی تهیه گردید. در این روش، هاگ‌ها را با لایه نازکی از طلا پوشش دادیم.

مرحله کشت هاگ

جهت کشت هاگ از محیط‌های پایه MS با نسبت-های مختلفی از قندها و هورمون‌ها استفاده گردید.

محیط‌های حاوی ساکاروز

MS1: ساکاروز- آگار
MS2: ½ساکاروز- آگار
MS3: ساکاروز- هورمون 2IP- آگار
MS4: بدون ساکاروز- آگار

محیط‌های حاوی سوربیتول

MS5 : سوربیتول- آگار
MS6: ½سوربیتول - آگار
MS7: سوربیتول- 2IP- آگار
MS8: بدون سوربیتول- آگار

محیط‌های ساکاروز حاوی هورمون

MS9 : ساکاروز- آگار- 2.4.D
MS10: ساکاروز- آگار- 2.4.Dو KIN
MS11 : ½ساکاروز- آگار- 2.4.D
MS12: ½ساکاروز- آگار- 2.4.D و KIN
MS13 : ساکاروز- 2IP- آگار- 2.4.D
MS14 : ساکاروز- 2IP- آگار- (1mg/lit) 2.4.D و (2mg/lit)KIN
MS15 : بدون ساکاروز- آگار- 2.4.D
MS16: بدون ساکاروز- آگار- 2.4.D و KIN

محیط‌های سوربیتول حاوی هورمون

MS17 : سوربیتول- آگار- 2.4.D
MS18 : سوربیتول- آگار- 2.4.D و KIN
MS19 : ½سوربیتول – آگار- 2.4.D
MS20 : ½سوربیتول – آگار- 2.4.D و KIN
MS21 : سوربیتول- 2IP- آگار- 2.4.D
MS22 : سوربیتول- 2IP- آگار- 2.4.D و KIN
MS23 : بدون سوربیتول- آگار- 2.4.D
MS24 : بدون سوربیتول- آگار- 2.4.D و KIN

محیط‌های کشت داخل ارلن در۷/۵ - ۵/۵=pH، در دستگاه اتوکلاو در فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی-متر مربع و دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۳۰ دقیقه سترون شدند. پس از سرد شدن محیط تا حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد آن را زیر دستگاه هود لامینار که قبلاً با الکل ۷۰ضد عفونی شده بود و به مدت ۳۰ دقیقه لامپ UV (Ultra Violet) آن روشن بود در شرایط سترون و در کنار شعله، به پلیت‌های سترون منتقل کردیم. برای سترون‌سازی وسایل مورد نیاز کشت از قبیل پنس، اسکالپل و

وسایل شیشه‌ای مانند پلیت، بشر، لام و نیز پنبه، کاغذ صافی و آب مقطر، از دستگاه اتوکلاو استفاده شد.

سترون‌سازی هاگ‌ها در زیر هود و به روش‌های زیر صورت گرفت:

روش۱: الکل۷۰ به مدت ۳۰ ثانیه و آب ژاول با رقت ۱۰،۱۲،۱۵و ۲۵ درصد به مدت ۳ دقیقه و ۲ بار شستشو با آب مقطر سترون.

روش۲: آب ژاول ۱۵ و ۲۰ درصد به مدت ۳ دقیقه و ۲ بار شستشو با آب مقطر سترون.

جهت کشت هاگ نیز از سه روش استفاده شد:

روش ۱: هاگدان‌های مورد نظر را با استفاده از تیغ، از تار جدا کرده (با توجه به این که در حین این عمل نباید درپوش از هاگدان جدا شود) و داخل توری صافی قرار داده و صافی را داخل شیشه ساعت به مدت۱۰ دقیقه که در آن آب مقطر ریخته بودیم قرار دادیم. سپس کپسول‌ها را به روی کاغذ صافی منتقل کرده تا آب اضافی آن خارج شود. سپس کپسول‌ها را به زیر دستگاه هود برده و سترون‌کردن هاگدان‌ها را در زیر دستگاه هود انجام دادیم. پس از سترون‌کردن، هاگدان‌ها را روی کاغذ صافی قرار دادیم تا آب اضافی خارج شود. سپس با استفاده از پنس،کپسول‌ها را روی لام در کنار شعله قرار داده و با کمک اسکالپل، هاگدان‌ها را خرد کردیم تا هاگ‌ها روی لام قرار بگیرند. خرده‌های هاگدان‌ها را کنار زده و با کمک پنس، چند قطره آب مقطر سترون روی لام ریخته و سطح و زیر لام را با استفاده از پنبه سترون و الکل۷۰، چند مرتبه سترون کرده و در کنار شعله درب پلیت را برداشته و به سرعت از گوشه لام، هاگ‌ها را به محیط کشت انتقال دادیم. درب پلیت را با پارافیلم، بسته‌بندی کردیم. پلیت‌ها را به زیر نور مهتابی در اتاق کشت با درجه حرارت ۲۵ درجه و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل کردیم.

روش ۲: هاگدان‌های مورد نظر را با استفاده از تیغ، از تار جدا کرده و خردکردیم. سپس هاگدان‌های خرد شده را به وسیله آب مقطر سترون، به لوله آزمایش دستگاه سانتریفوژ منتقل کرده و به مدت ۳ دقیقه با دور ۶۰۰۰، سانتریفوژ کردیم. سپس محلول بالایی لوله را استخراج و به لوله، آب ژاول ۱۵ درصد اضافه کردیم و ۱ دقیقه روی شیکر قرارداده، سپس لوله آزمایش را به مدت ۱ دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتریفوژ کردیم. سپس محلول بالایی را استخراج و نمونه را دو مرتبه با آب مقطر سترون، سانتریفوژ کردیم. در مرحله بعد، آب مقطر رویی محلول را استخراج و آب مقطر سترون را به آن اضافه و لوله را به وسیله شیکر، مخلوط کردیم. پس از آن، با استفاده از سرنگ، از هاگ‌ها برداشته و زیر دستگاه هود لامینار و شرایط سترون و در کنار شعله، از هاگ‌ها به محیط‌های کشت اضافه کرده و درب پلیت‌ها را با پارافیلم، محکم کرده و پلیت‌ها را به زیر نور مهتابی در اتاق کشت با درجه حرارت ۲۵ درجه و دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، منتقل کردیم.

روش۳: هاگدان‌های جدا شده از تار را در زیر دستگاه هود به وسیله آب ژاول ۱۵درصد سترون کرده و به وسیله پنس و در کنار شعله، درپوش کپسول را برداشته و کپسول را روی محیط کشت تکان دادیم تا هاگ‌ها روی محیط پخش شوند. سپس درب پلیت را با پارافیلم بسته و پلیت‌ها را به زیر نور مهتابی در اتاق کشت با درجه حرارت ۲۵ درجه و دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، منتقل کردیم.

نتایج و بحث

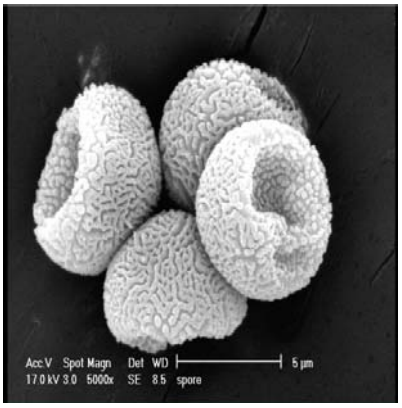
داخل کپسول در دهانه با برداشتن کلاهک، دندانه‌های پریستومی به رنگ قهوه‌ای مشاهده شدند. پریستوم، طویل و دندانه‌دار بود. دندانه‌های پریستومی طوری به‌هم بافته شده‌اند که در نگاه اول، حالت تار و پود را نشان می‌دهند (تصویر ۲).

تصویر۲- محافظت هاگ‌ها در میان دندانه‌های پریستومی، میکروسکوپ الکترونی X۱۳۷ .

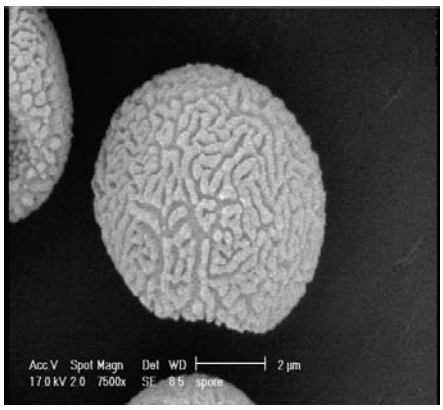
سلول‌های بعدی در یک قطب، حالت فرو رفته پیدا کردند. خزه‌های جمع‌آوری شده در دو فصل بهار و پاییز، رشد را نشان دادند، ولی هاگ فصل بهار بسیار آسان‌تر از هاگ فصل پاییز، جوانه زد. می‌توان این طور نتیجه گرفت که شرایط رویش فصلی، یکی از مهم‌ترین شرایط برای رویش خزه‌ها است. جهت سترون کردن هاگ‌ها، از درصدهای مختلفی از آب ژاول استفاده کردیم. آب ژاول در غلظت‌های بالا، سرعت رشد را کاهش داد.

بهترین شرایط سترون، در الکل ۷۰ به مدت ۳۰ ثانیه و آب ژاول ۱۲ درصد به مدت ۳ دقیقه بود که با نتایج (۹) که بهترین شرایط سترون را در غلظت ۱۲ درصد آب ژاول معرفی کرده بود، مطابقت دارد. بهترین محیط‌ها جهت جوانه‌زنی هاگ‌ها و رشد پروتونما، محیط‌های MS3 و MS7 حاوی ساکاروز و سوربیتول بود که سرشار از ویتامین و هورمون بود (تصویر ۵).

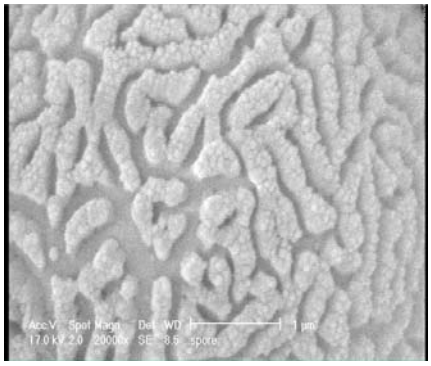
سلول اولیه هاگ‌ها کروی شکل و از خارج به داخل، شامل کلروپلاست و اگزوسپور بود. تزیینات پاپیلوزی هاگ توسط میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده بود (تصاویر۴، ۳).



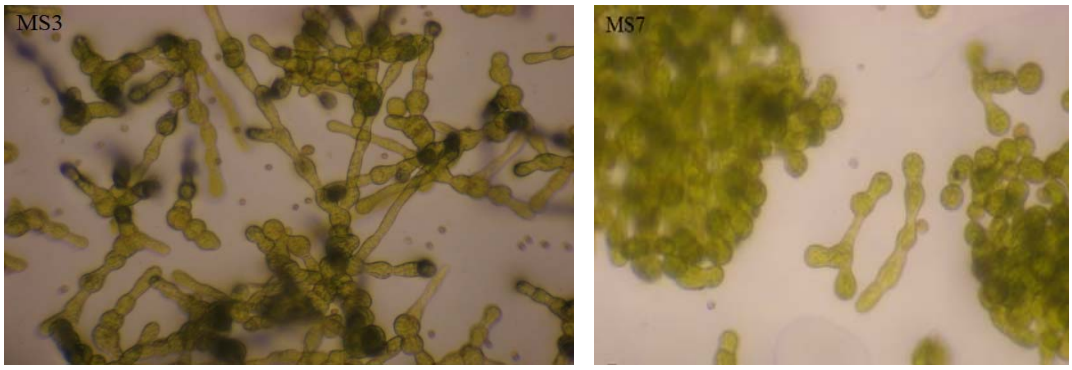
تصویر۳- هاگ کروی میکروسکوپ الکترونی X۵۰۰۰.



تصویر ۴- هاگ‌های کروی، میکروسکوپ الکترونی ۷۵۰۰ X.

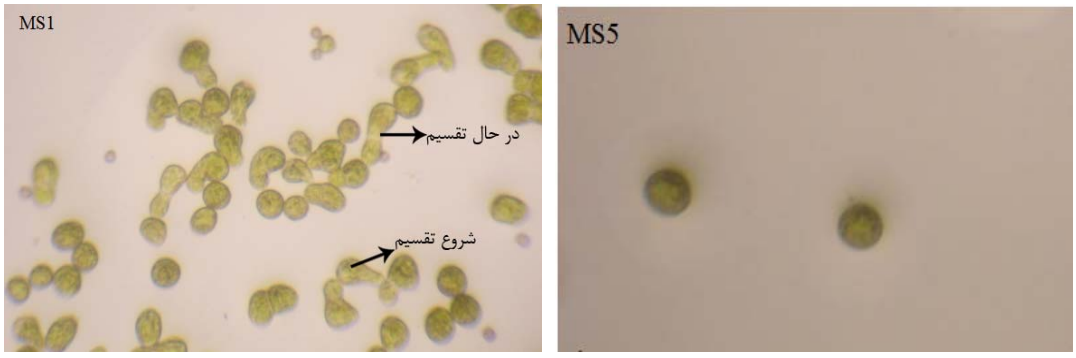


تصویر ۵- آراستای پاپیلوزی هاگ خزه، میکروسکوپ الکترونی X۲۰۰۰۰.



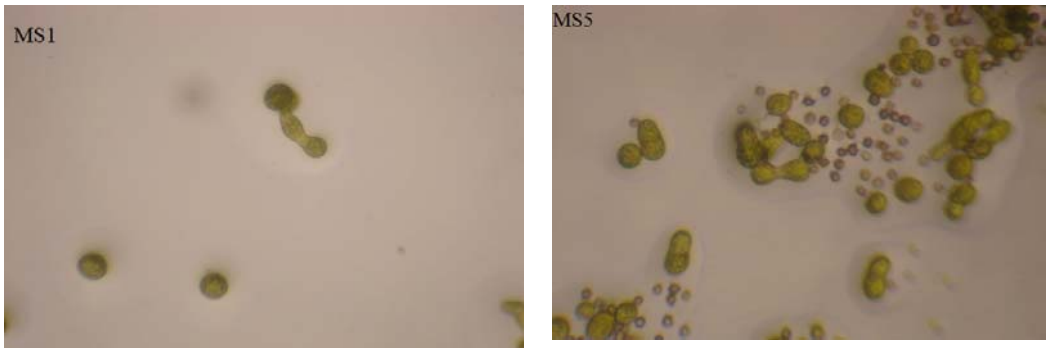
تصویر ۶- تقسیم سلول هاگ در روز دوازدهم و ایجاد انشعاب دو شاخه در پروتونما در محیط‌های کشت MS3 وMS7 بزرگنمایی X100.

بنابراین به نظر می‌رسد هورمون 2IP که یک نوع سیتوکینین است، نقش مهمی در رشد دارد و با بالا بردن سرعت رشد در کشت، هاگ‌ها را تا مرحله شبکه ریزوییدی هدایت می‌کند. این نتایج با نتایج (۱۰ ،۳) همسویی دارد. به طور کلی، اولین تقسیم هاگ در محیط‌های کشت پایه در روزهای هفتم و هشتم مشاهده شد که این نتیجه، با تحقیقات (۱۱) که اولین روز تقسیم هاگ را روز هشتم معرفی کرده بود، تطابق دارد (تصویر ۶).



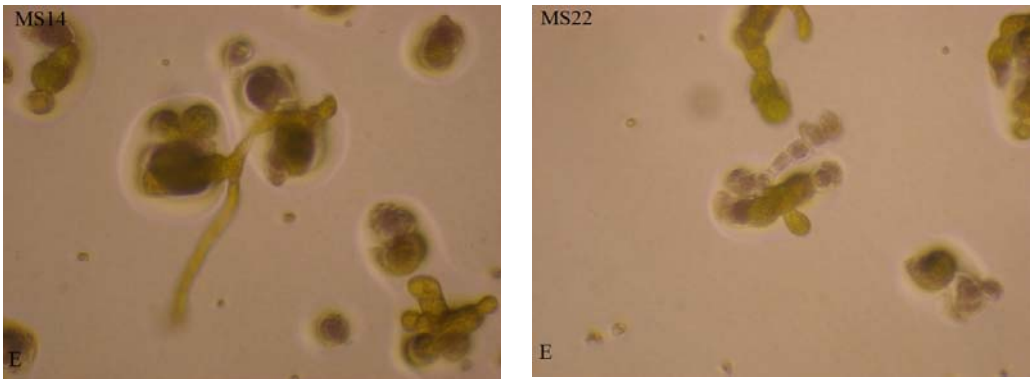
تصویر ۶- تقسیم سلول هاگ در روز هفتم در دو محیط MS1 و MS5 بزرگنمایی X100.

استفاده از سرنگ سترون، باعث تغییر شکل هاگ‌ها می‌شود. در این روش، آب زیادی وارد محیط کشت می‌شود که احتمال آلودگی را افزایش می‌دهد. بهترین روش جهت کشت هاگ، روش یک معرفی می‌شود که با نتایج (۳) مطابقت دارد. مشاهده جوانه‌زنی هاگ‌ها یک تا سه سلول در روز دهم با نتایج (۱۲) همسویی دارد (تصویر ۷).



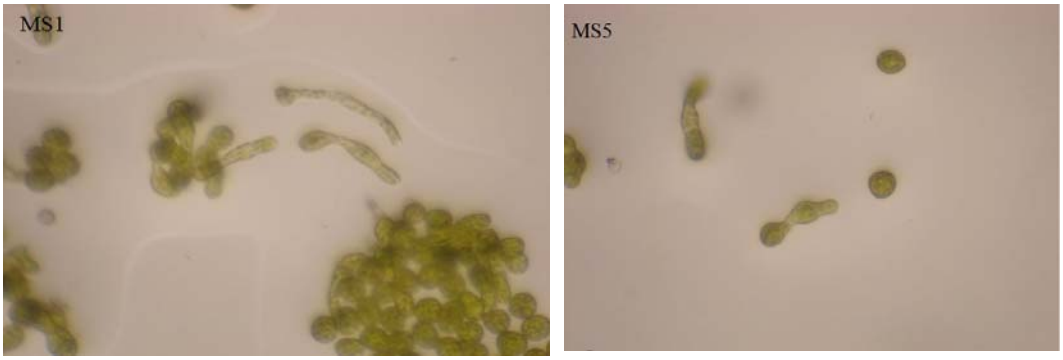
تصویر ۷- جوانه زنی هاگ‌ها یک تا سه سلول در روز نهم در محیط‌های MS1 و MS5 بزرگنمایی X100.

قند ساکاروز، نقش اساسی در تندش هاگ دارد. ساکاروز، فشار اسمزی مناسبی در محیط کشت فراهم می‌کند. بهترین محیط‌ها جهت ادامه رشد، محیط‌های حاوی ساکاروز و هورمون‌های ترکیبی اکسین و سیتوکینین بودند (تصاویر ۸،۹،۱۰).



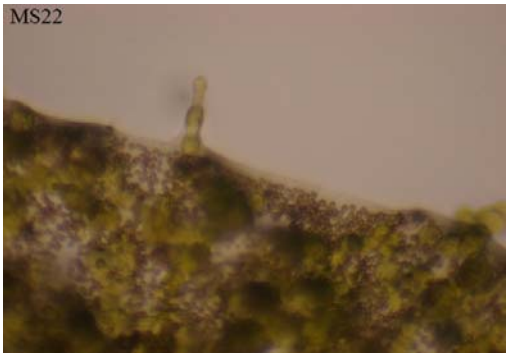
تصویر ۸- ادامه رشد در محیط های MS14 وMS22 حاوی هورمون های ترکیبی بزرگنمایی X100.

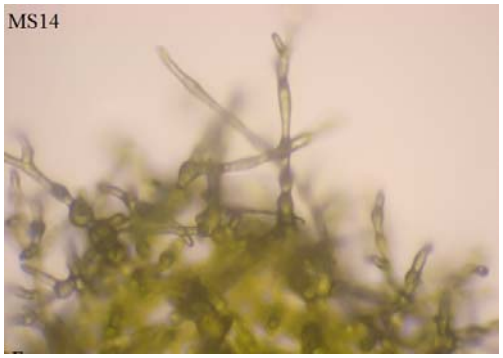
ضعیف‌ترین محیط‌ها جهت تندش هاگ، محیط-های حاوی سوربیتول معرفی می‌شوند. به نظر می-رسد سوربیتول که نوعی قند الکلی است تنش خشکی در محیط کشت ایجاد کرده و بر سرعت تندش هاگ اثر منفی می‌گذارد. سلول‌های پروتونمایی، به دو دسته کلرونما و کلونما تقسیم می-شوند. کلرونما با کلروپلاست بیشتر و کلونما با کلروپلاست کمتر، قابل تمایز است (تصویر ۹).



تصویر ۹- تقسیم سلول هاگ در روز یازدهم تا مرحله ۴ سلولی و ایجاد کلونما و کلرونما پروتونمادر محیط کشت MS1 و MS5، بزرگنمایی X100.

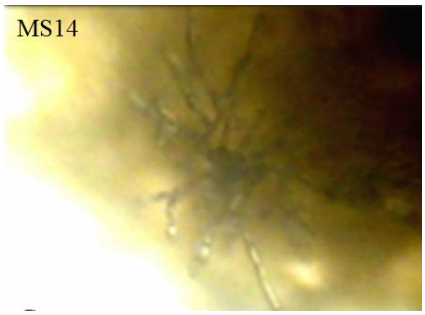
سلول‌های کلرونمایی ابتدایی در پروتونما، هسته بزرگ داشته و محتوای کلروپلاستی با میکروسکوپ نوری قابل مشاهده بود که به تدریج میزان کلروپلاست‌ها کاهش یافت و به سمت سلول‌های کلونمایی بی‌رنگ پیش رفت. این ویژگی‌ها با گزارش‌های Sabovljevic و همکاران در سال ۲۰۰۳ مورد خزه *Grimmia pulvinata* مطابقت دارد. در حقیقت، گامتوفیت خزه به وسیله سلول‌های کلونمایی شکل می‌گیرد و سلول‌های کلونمایی در جهت ایجاد گامتوفیت و ریزوییید پیش می‌رود (۳). پس از حدود ۲۰ روز، جدا کشت‌ها به محیط‌های حاوی هورمون‌های اکسین و سیتوکینین وارد شدند و در محیط‌هایی که اکسین و سیتوکینین تواماً به کار برده شد سرعت تکثیر بالاتر بود و در روز ۴۰ ریزوییید به صورت توده‌ای نمایان شد (تصویر ۱۰).





تصویر ۱۰- ایجاد شبکه ریزوییدی در روز چهل‌ام در محیط‌های MS14 و MS22 بزرگنمایی X100.

نتایج حاضر با نتایج Bopp در سال ۲۰۰۰ که افزایش تنظیم کننده‌های رشد مانند 2.4.D، KIN ،2IP را در ایجاد گامتوفیت برگ‌دار موثر معرفی کرده بود و نیز با نتایج (۱۳) که محیط حاوی نسبت بیشتر سیتوکینین به اکسین را در ایجاد جوانه گامتوفیت در خزه *Alonia aloides* معرفی کرده بودند مطابقت دارد. در روز ۴۵، توده ریزوییدی به سمت تشکیل ساقه‌نما پیش‌روی کرد (تصویر ۱۱).



تصویر ۱۱ - تشکیل ساقه نما در روز۴۵ در محیط MS14 بزرگنمایی X100.

تقدیر و تشکر

در آغازسخن برخود واجب می‌دانم از زحمات متعهدانه و دلسوزانه سرکار خانم دکتر معصومه میرزایی و سرکار خانم دکتر فریبا شریف‌نیا استادان گرانقدر و فرزانه‌ام که مرا در جهت رفع نقایص کمک نمودند از صمیم قلب سپاسگزاری نمایم.

از جناب آقای دکتر سعید شیرزادیان عضو هیئت‌علمی گروه گیاهشناسی، مؤسسه گیاه پزشکی

اوین که با راهنمایی‌های خویش در این پژوهش مرا همراهی نمودند کمال تشکر را می‌نمایم.

از سرکار خانم دکتر فهیمه سلیم‌پور سرپرست مجتمع آزمایشگاهی محمودیه که امکانات لازم برای این پژوهش را فراهم نمودند صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

از سرکار خانم فلور مظهر مسئول محترم آزمایشگاه تحقیقاتی محمودیه و همچنین از پرسنل محترم آزمایشگاه محمودیه، که در طی یک سال کار آزمایشگاهی همواره یار و یاورم بودند و هیچ محبتی را از من دریغ نکردند تشکر می نمایم.

منابع مورد استفاده

۱. مجد، ا. ۱۹۸۹. اطلس زیست شناسی گیاهی، جلد اول.

۲. قهرمان، ا. ۱۳۷۳.کروموفیت‌های ایران، جلد سوم، مرکز نشر دانشگاهی.

۳. رشیدی، س. ۱۳۸۶. بررسی ساختار تشریحی و تکوینی خزه *Tortula muralis*در مقایسه با گامتوفیت حاصل از رویش اسپور در محیط کشت، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال، صفحه۱۱۳.

4. Cove, D. J., Knight, C. D., Lamparter, T., 1997. Mosses as model system. Trends in Plant Science 2: 99-105.
5. Yoshinori, A., 2007. Biology active compounds from bryophytes. Pur App Chem79: 557-580.
6. Halling Back, T., Hodgetts, N., 2000. Mosses, liverworts and hornworts; status survey and conservation action plan for bryophytes. IUCN/SSC Bryophyte Specialist Group Oxford.
7. Graham, L. E., 1993.The original of land plants.Wiley & Sons, New York, NY.
8. Vashishta, B. R., Sinha, A. K., Kumar, A., 2008. Botany for degree students; Bryophyta, S. Chand & Company Ltd.
9. Sabovljevic, M., Bijelovic, A., Dragicevic, I., 2003. *In vitro* culture of mosses. University of Belgard: 441- 446.
10. Bopp, M., 2000. Fifty years of the moss story. Progress in Botany: 3-34.
11. Sabovljevic, M., Bijelovic, A., Dragicevic, I., 2002. Effecive and easy way of establishing in vitro culture of mosses, *Bryum argenteum* Hedw.and *Bryum capillare* Hedw.(Bryaceae). Arch Biol Sci 54 (1-2): 7P-8P.
12. Bopp, M., Knoop, B., 1984. Culture methods for bryophytes. London: Academic Press: 96-105.
13. Bijelovic, A., Sabovljevic, M., 2003. Callus induction and plant regeneration in the moss *Aloina aloides* (SCHULTZ) Kindb (Pottiaceae,Bryoopsida). Arch. Biol Sci Belgard 55 (34): 77-80.