

دراسة تشريحية مقارنة للثمار المصابة بالضرر الفسلجي

ابوخشيم قبل و بعد الضرر لصنف الحلاوي

ساجدة ياسين سويد منى عبد المطلب يحيى وسن فوزي فاضل

مركز ابحاث النخيل – جامعة البصرة

الخلاصة

اجريت هذه التجربة في الموسم ٢٠١١ في مختبرات مركز ابحاث النخيل على ثمار صنف الحلاوي المصابة بالضرر الفسلجي "ابو خشيم" وعلى مرحلتين مرحلة الرطب قبل الضرر ومرحلة التمر بعد الضرر للاشجار نفسها بهدف معرفة تأثير الاصابة بالضرر الفسلجي ابو خشيم على التركيب التشريحي للثمار وقد اوضحت الدراسة ان الاصابة بالضرر الفسلجي ابو خشيم له تأثير معنوي على سمك منطقة الغلاف الوسطي الداخلي (منطقة اللب) اذ تبين معدل سمك هذه المنطقة من ٣,٣٨ ملم في الثمار السليمة قبل الضرر الى ١,٩٩ ملم في الثمار المتضررة . كذلك اوضحت التجربة تفوق ثمارصنف الحلاوي قبل الضرر معنوياً في سمك منطقة التانين وشكلها على ثمار الصنف نفسه بعد الضرر اذ انخفضت معدل سمك منطقة التانين من ٠,٦١ ملم في الثمار السليمة الى ٠,٣ ملم في الثمار المتضررة ومن الشكل المستمر الى الشكل المتقطع . ولم تظهر التجربة الحالية فروقات معنوية في بنية الصفات التشريحية المدروسة في كلا المرحلتين من الثمار كما سجلت التجربة في كل منهما وجود نوعين من الخلايا السكرانكيمياية في منطقة الغلاف الخارجي هما الخلايا الحجرية (Stone cells) والسكروريدات العظمية (Bone-shaped sclereids)

كلمات مفتاحية: نخلة التمر، تشريح الثمار، ابو خشيم ،، صنف الحلاوي.

Comparative anatomical study for fruit infection with physiological damage (Abu khshem) before and after damage in the Date Palm cv. Hillawi

Muna A. Y. Al-Mussawii Wasen F. F. Alpresam Sajida Yaseen Swaed
Date Palm Research Center, Univ. of Basrah

Abstract

An experiment was conducted in 2011 season in the laboratories of D. P. R. C. on fruit of (Al- Hillawi cultivar) that undergo from a physiological case of Abu khshem (white-end) by two stages ; Alrutab stage before case and Altmer stage after case on the same trees to know the effect of this case (abukhshem) on the anatomical structure of fruites . this study also revealed that the case of abukhshem has significant effects on a thickness of inner mesocarp area .this study shown differences in the thickness average of this area from (3.38) mm in the fruit before case to (1.99) in the fruit after case.also this study appeared that the fruit of Alhelawii cultivar have a significant superiority before case in the thickness of tannins area and its shape than the fruit of

the same cultivar after case caused allowing of the thickness average of tannins area from (0.61) mm in the non cased fruit to(0.3)mm in the cased fruit and from continuous shape to discontinuos shape .

Key ward: *Phoenix dactylifera* L., anatomical fruits, white end, Hillawi cultivar.

المقدمة

يوجد في العراق العديد من الاصناف الزراعية لنخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. تصاب باضرار فسلجيه ويعتبر صنف الحلاوي من اكثر الاصناف عرضاً للإصابة بالضرر الفسلجي المعروف ابوخشيم (الذنب الابيض white end) وهو من الاضرار التي تؤدي الى تقليل نوعية وجودة الثمار وهذا الضرر عبارة عن حدوث تصلب في جزء الثمرة القريب من القمع بحيث يكون الجزء المتصلب على شكل حلقة ذات لون فاتح ويحدث عندما تتحول الثمار من مرحلة الرطب الى مرحلة التمر (جاسم و ابراهيم ١٩٩١، الجبوري وزايد ٢٠٠٧)

ويحصل هذا التصلب بسبب توقف نمو الخلايا في هذه المنطقة في مرحلة الرطب ويستمر حتى مرحلة التمر، ان الإصابة بهذا الضرر لا تحدث نتيجة لمسببات مرضية (فطريات ، بكتريا، فيروسات) ولا حشرية بل هي ظاهرة فسلجية سببها الظروف الجوية وبشكل خاص الحرارة والرياح الجافة (ابراهيم ٢٠٠٨) . ذكر عبد الحسين (١٩٨٥) ان هذا الضرر قد تصل نسبته الى اكثر من ٣٠ % وقد تصل هذه النسبة في بعض السنوات الى ٤٠ – ٦٠ % ان التكتيس والرش ببعض منظمات النمو وتعفير الثمار بالكيريت يقلل من نسبة الإصابة بهذا الضرر وفقاً لنتائج العديد من الباحثين منهم (ابراهيم والجابري، ٢٠٠٢ ; ابراهيم واخرون، ٢٠٠٢ ; المير، ٢٠٠٦) كما قام جاسم و ابراهيم (٢٠٠١) بدراسة تأثير الاثيفون على نسبة الإصابة بالضرر الفسلجي ابو خشيم ولاحظ وجود تأثير معنوي للمعاملة بالاثيفون في تقليل نسبة الإصابة بالضرر

ان ثمرة نخيل التمر لبية (berry) وهي عبارة عن مبيض ناضج تحتوي على نواة واحدة محاطة بغلاف غشائي رقيق هو (endocarp) اما الجزء اللحمي وهو الذي يؤكل فيتكون من النسيج الخارجي (exocarp) ويتركب من صف واحد من خلايا البشرة (epidermis) مغطاة بمادة شمعية تسمى الكيوتكل (cuticle) يليها طبقة تحت البشرة (hypodermal) اما الجزء الاخير من الغلاف الخارجي فتحمله الخلايا الصخرية (stone cells) بينما غلاف الثمرة الوسطي mesocarp يتكون من (outer mesocarp و inner mesocarp) تفصلهما صف من الخلايا التايينية (Sakr et al. , 2010)

وجد (Sakr et al ,2010) عند دراسته على عشرة أصناف من نخيل التمر إن معدل سمك طبقة epidermis و cuticle يتراوح بين ١٥ و ٦٧ مايكروميتر في صنف Zaghoul إلى ٢٠ و ٠١ مايكروميتر في صنف kuboshy ، أما معدل سمك طبقة exocarp فقد تراوح بين ١٤٦ مايكروميتر في صنف amry إلى ٢٢٤ مايكروميتر في صنف kuboshy ، أما أعلى سمك لطبقة outer Mesocarp كان في صنف kuboshy حيث سجل ١,٦٨ ملم بينما اقل سمك كان في صنف Bint –Aisha ٠,٣٧ ملم.. وفي مجال الدراسات التشريحية الخاصة بالثمار المتضررة لصنف الحلاوي ذكر (محمد ١٩٧٧) ان تركيب انسجة الجزء المصاب في الثمرة يكون مماثل لتلك الانسجة في الثمار غير الناضجة ويبدو ان هذه الدراسة هي من طلائع الدراسات التشريحية في الثمار المتضررة للصنف الحلاوي حيث لم تتوفر للباحث دراسات مماثلة في هذا المجال لذا

ارتئينا في هذا البحث القيام بدراسة تشريحية للثمار المصابة للضرر الفسلجي (ابو خشيم) وتتبع التغيرات الفسلجية المصاحبة للثمار قبل وبعد الضرر اثناء التحول من مرحلة الرطب الى مرحلة التمر .

المواد وطرق العمل

جمع العينات

اجريت التجربة على ثمار ثلاث اشجار من الصنف الحلاوي متقاربة في العمر والنمو الخضري من احد بساتين منطقة ابو الخصيب على مرحلتين مرحلة الرطب ومرحلة التمر اخذت تسعة ثمار في كل مرحلة خلال موسم النمو ٢٠١١ . وبعد جلب العينات من اماكن تواجدها الى مختبرات مركز ابحات النخيل جامعة البصرة اخذت قطع بطول ٥,٥ سم من الجزء المتصلب من الثمرة واجريت عليها الخطوات التالية تبعاً لطريقة (Willy, 1971).

١. ثبتت الاجزاء المقطوعة من الثمار في المثبت (F .A. A) المحضر من ٥ مل فورمالين و ٥ مل حامض الخليك الثلجي و ٩٠ مل من الكحول الايثيلي تركيز ٧٠ % لمدة ٢٤ ساعة ثم غسلت المقاطع بكحول ايثيلي تركيز ٧٠ % لإزالة اثار المثبت
٢. مررت الاجزاء المقطوعة في سلسلة تصاعدية من الكحول الايثيلي (٧٠، ٨٠، ٩٥ %) لمدة ساعة في كل تركيز ثم الى كحول مطلق ١٠٠ % لمدة ليلة كاملة مع استبدال الكحول بعد ست ساعات
٣. وضعت النماذج في قناني تحتوي على خليط كحول مطلق : زايلين بنسبة (1:3 , 1:1 , 3:1) لمدة ٣٠ دقيقة في كل مزيج ثم تركت في الزايلين النقي لمدة ٣٠ دقيقة بعدها وضعت في خليط من الزايلين وشمع البرافين في فرن بدرجة حرارة (٦٠ - ٦٥) م لمدة اربع ساعات ثم نقلت الى شمع البرافين وتركت لمدة ليلة كاملة في الدرجة الحرارية نفسها .
٤. حضر برافين بدرجة الحرارة السابقة وصب في مكعبات بلاستيكية خاصة ثم وضعت النماذج داخل هذه المكعبات بعد ان علمت ثم تركت لتبرد تحت الماء البارد لمدة ليلة كاملة وبذلك اصبحت جاهزة للتقطيع .

٥. قطعت النماذج بوساطة المشراح الدوار وروقت بوضعها في الزايلين لمدة ليلة كاملة ثم مررت بسلسلة متنازلة من الكحول الايثيلي ١٠٠%، ٩٠%، ٨٠%، ٧٠%، ٥٠% ثم الى الماء المقطر لمدة خمس دقائق في كل منها بعدها وضعت بصبغة السفرائين (المحضرة بإذابة ١ غم في ١٠٠ مل من الماء المقطر) لمدة من ٣٠ - ٦٠ دقيقة . غسلت بالماء المقطر لإزالة الصبغة الزائدة . مررت بعد ذلك بسلسلة متصاعدة من الكحول الايثيلي ١٠٠، ٩٠، ٨٠، ٧٠% ثم وضعت بعد ذلك في صبغة الاخضر السريع المحضرة بإذابة ٥,٥ غم من الصبغة في ١٠٠ مل من الكحول الايثيلي المطلق لمدة ١٥-٣٠ ثانية . غسلت بعد ذلك بكحول مطلق لازالة الصبغة الزائدة ثم مررت بالزايين ثلاث مرات متتالية لمدة ٥ دقائق في كل مرة وحملت بعد ذلك بإضافة قطرات (DPX) ووضع عليها غطاء الشريحة ثم نقلت الى صفيحة ساخنة بدرجة حرارة ٦٠ م لمدة ساعتين .

وبعد ان اصبحت جاهزة للفحص درست الصفات التشريحية الموضحة في الجدول (١) بوساطة المجهر الضوئي

النتائج والمناقشة

تشير نتائج الدراسة الحالية والموضحة في الجدول (١) ان ثمار صنف الحلاوي قبل الضرر تتفوق معنوياً على ثمار نفس الصنف بعد الضرر في معدل سمك الغلاف الوسطي الداخلي (اللب) اذ بلغ ٣,٣٨ ملم في مرحلة الرطب بينما لم يتجاوز سمك هذه الطبقة في الثمار المصابة في مرحلة التمر ١,٩٩ ملم. وهذا يعود الى انكماش

خلايا النسيج البرنكي لمناطق اللب لوحه (a, b) نتيجة فقدان هذه الخلايا لقسم من المحتوى المائي اثناء الاصابة بهذا الضرر (Benjamin 1975, Mohamad and Shabana 1978, El-Hamady et al (1982)

كذلك يتضح من النتائج في الجدول (١) تفوق ثمار صنف الحلاوي قبل الضرر على الثمار المتضررة في معدل سمك طبقة التانين اذ كانت على التوالي ٠,٣,٠,٦١ ملم وهذا الفرق في سمك منطقة التانين يعطي الثمار المتضررة في مرحلة التمر مذاقاً اكثر حلاوة من ثمار المرحلة التي قبلها فانخفاض منطقة التانين من خمسة صفوف شبه مستمرة في الثمار السليمة الى الصف الواحد غير المستمر في الثمار المصابة كما موضح في الوحه (a 1, b) يجعل كلا النوعين من الثمار المصابة والسليمة متفاوتة في مذاقها وهذا يتفق ما توصل اليه (Melegy, 2003; Al-Khrusi et al, 2009) بوجود اختلافات معنوية في محتوى اصناف نخيل التمر من مادة التانين.

لم تظهر النتائج في الجدول (١) فروقات معنوية في بقية الصفات المدروسة بين المرحلتين من الثمار اذا كان الغلاف الخارجي (exocarp) للثمار السليمة مماثل في سمكه وتركيبه للغلاف الخارجي في الثمار المتضررة وهذا يتفق جزئياً مع ما ذكره محمد (١٩٧٢) في دراسة سابقة على الظاهرة نفسها .

قد يعزى جزء من تصلب الثمار في مرحلة التمر الى هذا التماثل في تركيب الغلاف الخارجي للثمار المدروسة في المرحلتين اذ تبقى طبقة الخلايا السكريدية (Sclereids cells) التي تشكل الجزء الاكبر من الغلاف الخارجي محافظة على هيئتها بعد التحول الى مرحلة التمر وهي احد انواع النسيج السكرنكي الداعم ومن الخطاء تسمية هذه الطبقة بطبقة الخلايا الحجرية (Stone cells) في المصادر الاخرى لأنها تتكون من نوعين من السكريدات اتفاقاً مع المصدر (العاني وصالح ، ١٩٧٩) هما الخلايا الحجرية وهي تشبه الى حد كبير الخلايا البرنكية غير انها تختلف عنها بجدرانها الثانوية السمكية الملكنة وتتميز بكونها تميل الى الشكل متساوي الابعاد (Isodiametric sclerieds) . اما النوع الثاني فهي السكريدات الكبيرة macro sclerides وهي تكون عظمية او اسطوانية شبيهة بالخلايا العمادية لوحه (d,c1) لم تظهر التجربة الحالية فروقات معنوية في قطر الحزمة الوعائية (bundle sheath) في المرحلتين من الثمار وهي تتكون من عناصر الخشب واللحاء محاطة بطبقة من الخلايا البرنكية (لوحه 1,e,f) يقوم فيها نسيج الخشب الى جانب وظيفته في النقل بوظيفة ميكانيكية حيث يكسب الثمار دعامة وقوة نظراً لوجود عناصر ميكانيكية ضمن هذا النسيج (الألياف) والطبيعة القاسية لجدران العناصر الناقلة (القصبيات والوعية)، كما يتضح من لوحه (e,1) ظهور التثخن الحلقي لوعية الخشب الثانوية في المقطع الطولي للحزمة الوعائية.

اما الغلاف الداخلي Endocarp فهو لم يلحظ في التجربة الحالية لانفصاله اثناء عملية التحضير وهو يتكون من صف واحد من الخلايا الصغيرة التي يمكن ملاحظتها في المراحل الاولى من تطور الثمرة (Soliman 2006)

ان تماسك خلايا الغلاف الخارجي والغلاف الداخلي الوسطي بالإضافة الى تركيبية الحزم الوعائية لثمار صنف الحلاوي في مرحلة الرطب قد يعكس حاله الضرر الفسلجي الذي تتعرض له الثمار اثناء التحول الى مرحلة التمر فمن المفروض في هذه المرحلة والمرحلة التي قبلها حدوث انحلال في جدران الخلايا . ان اهم التغيرات الفسيولوجية التي تطرا على الثمار في مرحلة الرطب هي تكوين المساحات اللينة بسبب سلسلة من التغيرات التي تطرا على المواد البكتينية الداخلة في تركيب الجدار الابتدائي والثانوي للخلية النباتية حيث يزداد ذوبان البكتين كلما تقدمت الثمار في النضج فتصبح الخلايا اقل ارتباطا وتماسكا مع بعضها وبذلك تقل صلابة الثمار (جراح والعاني ، ١٩٨١ ; شبانة واخرون ، ٢٠٠٦)

تتفق نتائج التجربة التشريحية الحالية بشكل عام مع (Sakri ,2010) ; الابريس ، (٢٠١١) ; عبد الواحد ، (٢٠١١) الذين قاموا بدراسة للاصناف نفسها واخرى لاصناف من النخيل اخرى

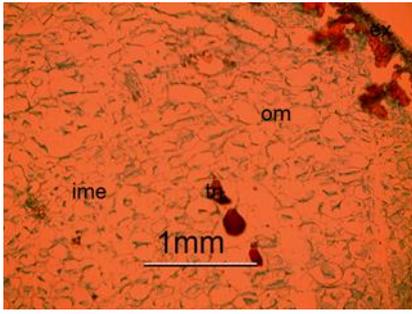
نستنتج من التجربة الحالية ان الثمار المصابة بالضرر الفسلجي ابو خشيم في مرحلة التمرلا تختلف في تركيبها التشريحي عن الثمار السليمة في مرحلة الرطب اي عن مراحل النضج الاولى سوى الاختلاف في سمك الغلاف الوسطي وعدد صفوف الطبقة التائينية

جدول (١) بعض الصفات التشريحية المدروسة في ثمار صنف الحلاوي قبل وبعد الضرر

| R.L.S.D P≤0,05 | بعدالضرر | قبل الضرر | الصفات المدروسة |
|-------------------|-----------------|---------------------|--|
| ٥٣,٠٨ | ٤٧,٣ | ٢١,٣ | سمك الغلاف الخارجي (μ) |
| ٢,٤ | ٠,٣ | ٠,٥٢ | سمك الغلاف الوسطي الخارجي (mm) |
| ١,١٢ | ١,٩٩ | ٣,٣٨ | سمك الغلاف الوسطي الداخلي (اللب) (mm) |
| ٠,١٧ | ٠,٣ | ٠,٦١ | سمك طبقة التائين بين الغلاف الوسطي الداخلي والغلاف الوسطي الخارجي (mm) |
| | ١ - ٢ متقطعة | ٣ - ٥ شبه مستمرة | عدد صفوف طبقة التائين وشكلها |
| ٤٢,٨٨ | ٧٧,١ | ٧٢,٨ | سمك منطقة الخلايا السكرنكيميية (μ) |
| ٤٤,١١ | ٤٥,٤ | ٨١,٤ | قطر الحزمة الوعائية (μ) |

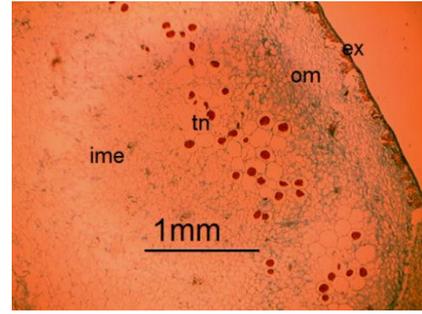
μ-مايكرون ، mm-ملم

ثمار متضررة

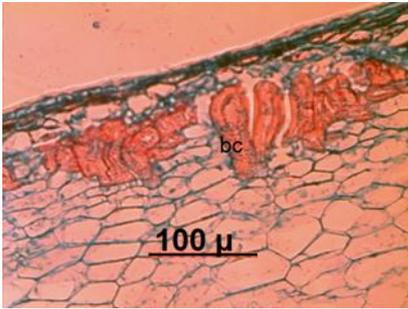


a

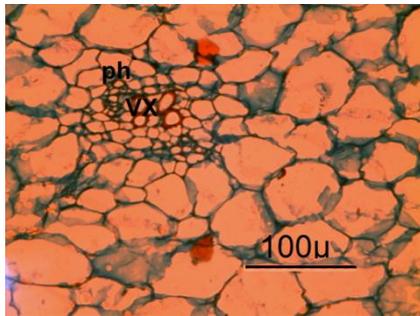
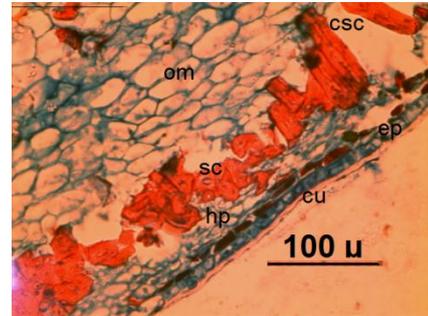
ثمار سليمة



b

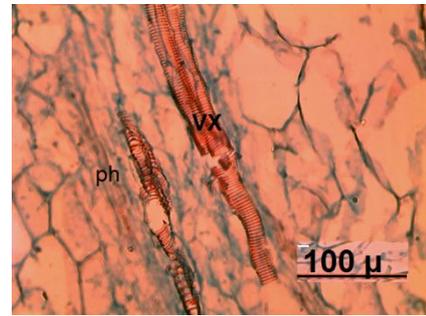


c



e

حزمة وعائية



f

لوحة (١) مقاطع مستعرضة لثمار صنف الحلاوي

Ex-exocarp om-outer mesocarp tn-tannins layer ime-inner mesocarp cu - cuticle

ep-epidermis hypodermis csc-cylindrical scleried cell bs-bone shaped cell
xv-xylem vessel ph-phloem sc-stone cell

المصادر العربية

ابراهيم ، عبد الباسط عودة . (٢٠٠٨) . نخلة التمر شجرة الحياة ، المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والاراضي القاحلة – اكساد : 390صفحة .

ابراهيم ، عبد الباسط عودة ووحيد ، احمد ماضي وحامد ، طالب العد (٢٠٠٢). تأثير التعفير نخيل التمر . مجلة البصرة لأبحاث نخلة التمر، ٢ (١) : ٦٣ – ٩٢

ابراهيم ، عبد الباسط عودة ، والجابري ،خير الله موسى عواد،(٢٠٠٢).تأثير عملية التكريس في بعض الصفات الفسلجية لثمار اربعة اصناف من نخيل التمر.مجلة البصرة لابعث نخلة التمر ،٢(١):٣١-٣٩ .

الجبوري، حميد جا سم وزايد،عبدالوهاب(٢٠٠٧).تكنولوجيا زراعة وانتاج نخيل التمر .المكتب الاقليمي لمنظمة الاغذية والزراعة التابعة للامم المتحدة : ٥٠٥صفحة .

الراوي ، خاشع محمود وعبد العزيز ، محمد خلف الله (١٩٨٠) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية . مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل . العراق

العاني ، بدري عويد احمد وصالح ، قيصر نجيب (١٩٧٩) . اساسيات علم تشريح النبات ، الطبعة الثالثة : ٢٨٤ صفحة.

المير ، اسامة نظيم جعفر (٢٠٠٦) . تأثير الرش بالجبرلين في اصابة ثمار نخيل التمر (*Phoenix dactylifera*) صنف الحلاوي بالضرر الفسلجي ابو خشيم مجلة البصرة لأبحاث نخلة التمر ، ٥ (١) ، ٢ : ١١٦ – ١٢٥ .

جاسم ، عباس مهدي و ابراهيم ، عبد الباسط عودة (١٩٩١) . العلاقة بين الضرر الفسلجي ابو خشيم ومحتوى الثمار من الرطوبة والكالسيوم والمغنيسيوم في صنف الحلاوي .مجلة البصرة للعلوم الزراعية ، ٤ (٢-١) : ٦٣ – ٦٩ .

جاسم ، عباس مهدي ، وعبدالباسط عودة ابراهيم ،(٢٠٠١) . تأثير الاثيفون على نضج وصفات الثمار ونسبة الاصابة بالضرر الفسلجي ابو خشيم في تمور صنف النخيل الحلاوي .مجلة البصرة لابعث نخلة التمر، ١ (٢) : ١-٨ .

جراح ، آمنه ذا النون والعاني بدري . ١٩٨١ . التغيرات النسيجية في ثمرة نخيل الخضراوي في العراق . مجلة نخلة التمر ، ١ (١) : ١٧-٣٠ .

شبانة ، حسن عبد الرحمن وعبد الوهاب . زايد وعبد القادر . اسماعيل سنبل (٢٠٠٦) . ثمار النخيل ، فسلجتها ، جنيها ، تداولها والعناية بها بعد الجني . منظمة الاغذية والزراعة للامم المتحدة (FAO) روما ، ايطاليا

محمد و نوال عبد الله (١٩٧٧). بعض الثغرات الكيميائية والفيزيائية والنسيجية ونشاط بعض الانزيمات ودراسة ظاهرة ابو خشيم في تمور الحلاوي . رسالة ماجستير ، كلية العلوم جامعة بغداد العراق

مطر ، عبد الامير مهدي (١٩٩١) . زراعة وانتاج النخيل مطبعة جامعة البصرة ٤٢٠ صفحة

عبد الواحد ، عقيل هادي (٢٠١١).دراسة البصمة الوراثية لصنفين من افحل النخيل التمر.وتأثيرلقاحمها في الصفات الفيزيائية والكيميائية لثمار صنف الحلاوي ،اطروحة دكتوراة-كلية الزراعة -جامعة البصرة.

عبد الحسين ، علي ١٩٨٥ . النخيل التمور وأفاتها ، مطبعة جامعة البصرة ٥٧٦ صفحة

AL_Khrusi , L. M. ; Elmarrdi , M. O. Ali , A. ;AL_ Said, F. A. ; Abdelbasi ,KM . and AL_Rawahy, A . S .(2009). Effect of mineral and or ganicfertilizer on the chemical characteristics and quality of date fruits.J. Agric .Biul .,rol.II, No3:290_296

Benjamin D; H. R. Shabana; B. A. AL-Ani; M.A. Clor; K. S.Jawad and A.M.H Shibani(1975).Effect of some growth regulator on the depressed

Period of development and physiochemical change during different stages of ripening in date fruit of Zahdi and Sugar cultivars.Teach. Bull.No.1-7.palm and DatesRes.Cen.Baghdad.Iraq

EL-Hamady ,M.M.;A.S. Khalifa and A.M.EL-Hamady(1982) Effect of gibberllic and sprays on some physicaland chemical characters, Date palm.King faisal Mniu.Saudi Arabia.pp.72.

Melegy, S. K. (2003). Histological studies on fruits of Samani and Zaghoul Date Palm cultivars as influenced by different pollen sources. Egypt.J. Appl.Sci.,; 18(11): 254-277.

Mohamad,S. and H.R.Shabana(1978) Application of NAA during depressed period and its effect on pomological characters of fruit at different stages of maturity in Zahdi dates .Tech. Bell.No. 2178. Palm and Date Res. Cent. Baghdad.

Soliman ,S.(2006). Behaviour studied of Zaghoul Date Palm cultivar under Aswan environment .J.Ap.sci. Res., 2(3):184-191 .

Sakr ,M. M.; I.M. Abuzeid ;A . E . Hassan ; A .G. I. O. Baz, W.M .Hassan.(2010). Identification of some date palm (*phoenix dactylifera*)cutlivars by fruit characters .in dianj. Sci.and Techno.3(3):338-343

Willey, R.L. (1971). Micro technique . A Laboratory Guido Memillan Publishing CO.,I nc.N.Y. pp :99