Edited with the trial version of
Foxit Advanced PDF Editor
To remove this notice, visit:
www.foxitsoftware.com/shopping

مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۱، شماره ۲، ۱۳۸۹ (۳۵۲-۳۴۵)

عاری‌سازی دو توده تجاری سیر (*Allium sativum* L.) بومی ایران از پوتی ویروس‌ها با استفاده از گرمادرمانی و کشت مریستم

بهمن زاهدی[۱]*، غلامحسین مصاحبی[۲]، ذبیح‌اله زمانی[۳] و عبدالکریم کاشی[۴]
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی سابق دکتری، دانشیاران و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۳۱ – تاریخ تصویب: ۸۹/۷/۷)

چکیده

به منظور عاری‌سازی گیاه سیر از پوتی ویروس‌ها، دو توده تجاری سیر بومی ایران به نام‌های همدان و آذرشهر انتخاب و با استفاده از تکنیک گرمادرمانی و کشت مریستم انتهایی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند. ابتدا سوخ‌های آلوده توده‌های مورد نظر به مدت ۱ هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۴ هفته در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد تحت تیمار گرمادرمانی قرار گرفتند و متعاقباً مریستم انتهایی آنها در دو اندازه ۰/۶-۰/۴ و ۰/۸-۰/۶ میلی‌متر جدا و در محیط کشت موراشیج و اسکوگ (MS) که با تنظیم‌کننده‌های رشد نفتالین استیک اسید با غلظت‌های صفر، ۰/۱ و ۰/۵ بنزیل آدنین با غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تکمیل شده بودند کشت گردیدند. به منظور ارزیابی کارایی گرمادرمانی و کشت مریستم در حذف ویروس و مقایسه آنها با تیمار شاهد، گیاهک‌ها پس از رشد با استفاده از آزمون الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون الایزا میزان عاری از ویروس‌سازی با ریز نمونه به اندازه ۰/۶- ۰/۴ میلی‌متر ۱۰۰٪ بود در حالی که با ریز نمونه ۰/۸-۰/۶ میلی‌متر میزان عاری‌سازی ۹۱٪ گردید. تیمار شاهد (بدون تیمار گرمادرمانی) ۲۱٪ عاری‌سازی نشان داد. همچنین گرمادرمانی به تنهایی، موجب ۷۳٪ عاری‌سازی برای توده همدان و ۶۱٪ برای توده آذرشهر گردید این در حالی بود که گیاهان شاهد بیش از ۸۰٪ آلودگی نشان دادند. در تمامی تیمارها تنظیم‌کننده رشد نفتالین استیک اسید با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری را در سطح ۱٪ روی پرآوری، طول گیاهک و تعداد برگ در هر ریز نمونه نشان داد. بنزیل آدنین با تیمار ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بیشترین اثر را روی پرآوری و تعداد برگ در هر گیاهک داشته است و در ارتباط با طول گیاهک بیشترین اثر مربوط به تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر است. همچنین اثر متقابل رقم و اندازه مریستم تنها برای طول گیاهک در سطح ۱٪ معنی‌دار گردید. تیمار S_2C_1 بیشترین طول گیاهک را داشت.

واژه‌های کلیدی: آزمون الایزا، پوتی ویروس، سیر، کشت مریستم، گرمادرمانی.

* نویسنده مسئول: بهمن زاهدی تلفن: ۰۶۶۱-۴۲۰۰۰۱۲ E-mail: bahmanzahedi@gmail.com

مقدمه

جنس آلیوم[1] شامل تعداد زیادی از گیاهان است که به عنوان غذا و همچنین دارو مصرف می‌شوند که مهمترین آنها پیاز، سیر، تره‌فرنگی، تره ایرانی، موسیر و پیازچه می‌باشند. بعد از پیاز، سیر دومین و پرمصرف‌ترین گیاه از جنس آلیوم است (Van der Meer, 1997). سیر از جمله سبزی‌های پر مصرف در ایران است که به صورت خام و پخته در انواع غذاهای ایرانی استفاده می‌شود. همچنین از جمله گیاهان دارویی است که به دلیل داشتن ترکیبات ارگانوسولفوره در صنایع داروسازی استفاده شده و داروهای زیادی از آن تهیه می‌گردد. که در درمان بیماران مبتلا به بیماری‌های قلبی عروقی، فشارخون، چربی خون و ضد تومور مصرف می‌شود. علاوه بر مصارف ذکر شده سیر در صنایع غذایی به عنوان یکی از مواد افزودنی در فرآورده‌های گوشتی و سالادی و تهیه سس مایونز کاربرد دارد. امروزه در صنایع تبدیلی فرآورده‌های متعددی از آن به صورت ترشیجات، پودر سیر، چیپس و غیره در بازار موجود ومورد مصرف قرار می‌گیرد (Kamenetsky, 2007). اکثر ارقام تجاری سیر عقیم بوده لذا تولید بذر نمی‌کنند و تنها راه تکثیر و ازدیاد آنها از طریق غیرجنسی یعنی استفاده از سوخک‌های آن می‌باشد. روش تکثیر غیرجنسی در سیر منجر به تجمع ویروس‌ها در مواد گیاهی شده و انتشار آنها را تسهیل و در طی کشت و کار موجب کاهش محصول می‌شوند (Davis, 1995). عملکرد سیر به وسیله هر ویروس بین ۲۰ تا ۶۰ درصد و در حالت آلودگی مخلوط تا ۸۰٪ درصد کاهش می‌یابد که بستگی به نوع ویروس، نژاد آن و مرحله آلودگی دارد (Lulleno et al., 2000). متأسفانه عملکرد محصول سیر در ایران به دلایل مختلف و از جمله آلودگی‌های ویروسی پایین بوده و حدود ۸ تن در هکتار است (FAO, 2003).

ویروس‌های مهم آلوده‌کننده جنس آلیوم به پنج جنس، پوتی ویروس، کارلاویروس[2]، ریمو ویروس[3]، توبرا ویروس[4] و نپو ویروس[5] تعلق دارند که از میان آنها پوتی ویروس‌ها از لحاظ اقتصادی مهمترین می‌باشند (Van Dijk, 1994). بیماری‌های ویروسی سیر اغلب به وسیله چندین ویروس مختلف ایجاد می‌شوند که هر کدام گونه خاص می‌باشند و این وضعیت بنام ویروس‌های کمپلکس (ترکیبی) شناخته شده است (Van Dijk, 1994). از جمله ویروس‌های معروفی که سیرها را آلوده می‌کنند می‌توان به ویروس کوتولگی زرد پیاز[6]، ویروس نوار زرد تره‌فرنگی[7]، ویروس کنه زاد نهان پیاز[8]، ویروس نهان موسیر[9] و ویروس نهان معمولی سیر[10] اشاره کرد (Walkey, 1990). امروزه در سطح جهانی برای افزایش عملکرد سیر در واحد سطح، عاری‌سازی با استفاده از کشت مریستم به صورت توأم با گرمادرمانی مورد استفاه قرار می‌گیرد (Verbeek *et al*., 1995; Conci *et al*., 2003; Novak, 1990).

تکثیر گیاه سیر عاری از ویروس در سیستم سنتی کشاورزی گران و مشکل است زیرا بایستی در مناطق عاری از ویروس‌ها و ناقل‌های آنها انجام گیرد. راندمان تکثیر و ازدیاد اندام‌های این محصول در مزرعه خیلی پایین است. لذا برای غلبه بر این مشکلات و مسایل، گیاهان عاری از بیماری از طریق درون شیشه‌ای تکثیر می‌شوند تا تعداد زیادی گیاه عاری از بیماری در مدتی کوتاه و بدون خطر آلودگی مجدد آنها به دست آید (Moriconi *et al*., 1990).

Bhojwani *et al.* (1981) با استفاده از کشت شاخساره انتهایی به طول ۰/۴ تا ۰/۹ میلی‌متر در محیط کشت B5 با ۰/۵ میلی‌گرم بنزیل آدنین و سپس انتقال شاخساره‌های حاصل به همان محیط کشت با ۵ میلی‌گرم ۲- ایزوپنتیل آدنین و ۰/۱ میلیگرم نفتالین استیک اسید در شرایط فتو پریود ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی موفق به عاری‌سازی گیاهان مورد آزمون از ویروس گردیدند.

Verbeek *et al.* (1995) کارایی کشت نوک مریستم در حذف چهار ویروس نهان معمولی سیر، سویه سیر

1. *Allium*
2. Carlavirus
3. Rymovirus
4. Tobravirus
5. Nepovirus
6. Onion yellow dwarf virus (OYDV)
7. Leek yellow stripe virus (LYSV)
8. Onion mite – borne latent virus (OMbLV)
9. Shallot latent virus (SLV)
10. Garlic latent common virus (GLCV)

ویروس‌های نوار زرد تره‌فرنگی (LYSV-G)، کوتولگی زرد پیاز (OYDV-G)، و کنه زاد نهان پیاز (OMbLV-G) را روی سوخک‌ها و سوخیزه‌های سیر مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد این تکنیک به میزان ۱۰۰٪ برای حذف (LYSV-G)، ۹۲٪ برای حذف (OYDV-G)، ۶۲٪ برای حذف (GCLV) و ۵۴٪ برای حذف (OMbLV-G) مؤثر بوده است (Ucman *et al*., 1998). با استفاده از تکنیک گرمادرمانی و کشت مریستم سیر در محیط کشت MS اولیه (حاوی ۱ میکرومولار ایندول استیک اسید و بنزیل آدنین) و سپس انتقال به محیط کشت حاوی ۵ میکرومولار جاسمونیک اسید و ۵ میکرومولار ۲-ایزوپنتیل - آدنین موفق گردیدند حجم زیادی از مواد عاری از ویروس به دست آورند که حذف ویروس کوتولگی زرد پیاز با آزمون الایزا اثبات گردید. (Ayabe & Sumi, 1998) با استفاده از کشت بافت، تحت عنوان روش جدید کشت دیسک ساقه سیر، به عنوان ریزنمونه برای ریز ازدیادی سیر، توانستند در مدت کوتاهی سیرهای عاری از ویروس را تولید نمایند. نتایج به دست آمده از این بررسی نشان داد که کشت دیسک ساقه روش مفید و مناسبی برای تولید سیرهای عاری از ویروس محسوب می‌شود. در این تکنیک روند دست یابی به اندامهای ازدیاد تسریع می‌گردد و مدت به دست آوردن سیرهای عاری از ویروس کاهش می‌یابد. Ramirez- Malagon *et al*. (2006) طی یک بررسی مشخص نمودند که اندامهای سیر به یک میزان به ویروس‌ها آلوده نمی‌شوند و ممکن است بعضی از اندام‌ها از جمله تعدادی از سوخک‌های یک سیر و یا تعدادی از برگ‌ها به پوتی ویروس‌ها آلوده شوند در حالی که تعدادی از آنها مصون بمانند. در این بررسی از چندین روش عاری‌سازی ویروس، از جمله گرمادرمانی، شیمی درمانی و کشت مریستم سوخک‌ها استفاده گردید و مشخص شد گرمادرمانی توأم با کشت مریستم نتایج بهتری در مقایسه با شیمی درمانی و کشت مریستم داده است.

در ایران نیز پژوهش‌هایی در ارتباط با شناسایی ویروس‌های سیر صورت گرفته ولی در ارتباط با کشت مریستم انتهایی برای عاری از ویروس کردن سیر گزارشی وجود ندارد. در ارتباط با شناسایی ویروس‌های جنس آلیوم علائم موزائیک روی برگ‌های تره ایرانی و همچنین پیکره‌های رشته ای شبیه پوتی ویروس‌ها در پیازچه، سیر و پیاز مشاهده و گزارش گردیده است (Izadpanah, 1982).

Shahraeen *et al*. (1998) نمونه‌های پیاز و سیر مشکوک به آلودگی ویروسی را به کشور آلمان ارسال کردند که بر پایه نتایج به دست آمده از آزمون‌های الایزا با تکنیک ساندویچ دو طرفه[1] و ایمونو الکترون میکروسکوپی[2]، آلودگی پیاز و سیر به ویروس کوتولگی زرد پیاز خوراکی سویه سیر و ویروس نوار زرد تره‌فرنگی و نیز آلودگی به یک ویروس رشته‌ای کنه زاد ناشناخته (MBFV-Unclassified) گزارش شد. هر سه ویروس قابلیت انتقال مکانیکی داشته و باعث ایجاد لکه‌های موضعی زرد رنگ در برگ‌های مایه‌زنی شده گیاه (*Chenopodium quinoa* Wild) گردیده‌اند (نقل از Dizaji, 1998). Dizaji (1998) نیز خصوصیات ویروس مولد موزائیک تره ایرانی را در استان فارس شناسایی ومورد ارزیابی قرار داد.

در ارتباط با کشت درون شیشه‌ای سیر، Etemadi (1990) طی پژوهشی ریز نمونه‌هایی از سیر سفید کولتیوار شمال را در محیط کشت MS کشت نمود و حداکثر درصد شاخه زایی را با یک میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید و ۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین به دست آورد و ضرورت استفاده از ایندول استیک اسید و کینتین را برای شاخه‌زایی تأیید نمود.

با توجه به این که سیر در کشور ما در سطح وسیع مورد کشت قرار می‌گیرد، لذا اهداف تحقیق حاضر، در مرحله اول تعیین آلودگی‌های مهم ویروسی سیرهای مورد نظر از طریق آزمون الایزا و در مرحله دوم عاری از ویروس کردن آنها با استفاده از تکنیک‌های کشت مریستم و گرمادرمانی بوده است.

مواد و روش‌ها

گیاهان مزرعه کلکسیون سیر گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران که از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری و

1. DAS - ELISA
2. Imminu electeron microscopy

مورد کشت و کار قرار گرفته بودند مورد بازدید قرار گرفته و از برگ‌های دارای علائم شبه ویروسی نمونه‌برداری و در آزمایشگاه ویروس‌شناسی گروه گیاهپزشکی برای آلودگی به پوتی ویروس‌ها مورد آزمون الایزا به روش مستقیم قرار گرفتند که تعدادی از نمونه‌ها نسبت به آلودگی پوتی ویروس‌ها مثبت بودند. بر اساس نتایج این آزمون، پیازهای دو ژنوتیپ از نمونه‌های آلوده پس از برداشت محصول برای چهار هفته در سردخانه نگهداری و سپس به منظور گرمادرمانی، به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و متعاقباً به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. همچنین تعدادی از سوخ‌های این توده‌ها بدون هیچگونه تیماری به عنوان شاهد برای ارزیابی در سرد خانه نگهداری شدند. در ادامه، عاری‌سازی این نمونه‌ها از آلودگی طی دو مرحله مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله اول کاشت مریستم و به دست آوردن گیاهک‌های حاصل از کاشت مریستم و در بخش دوم انجام آزمون الایزا به منظور ارزیابی حضور و یا عدم حضور پوتی ویروس‌ها بود.

بخش اول: کاشت مریستم و به دست آوردن گیاهک‌های حاصل از آن

محیط کشت مورد استفاده محیط MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی آگار (۸ گرم در لیتر) و مقادیر مختلف هورمون‌های نفتالین استیک اسید(NAA) با غلظت صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم و بنزیل آدنین (BA)، با غلظت صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بود کهpH آن در محدوده ۵/۷ تنظیم شد. ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت درون شیشه‌های مربایی توزیع و سپس درون اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه سترون شد.

برای آماده سازی نمونه‌های گیاهی، پس از برداشتن پوسته‌های خارجی، ابتدا سوخک‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در آب حاوی چند قطره مایع ظرفشویی شسته شده و سپس در زیر جریان آب قرار گرفتند و در نهایت با آب مقطر چند بار آبکشی گردیدند. پس از شستشوی اولیه، سوخک‌ها در داخل اتاقک با جریان هوای تصفیه شده[1] به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ غوطه‌ور شدند و در مرحله بعد به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱٪ غوطه ور و در پایان سه بار، هر بار به مدت پنج دقیقه با آب مقطر استریل شستشو و آبکشی گردیدند. پس از ضد عفونی سوخک‌ها، با استفاده از وسایل استریل مانند اسکالپل، پنس و سرنگ، سوخک‌ها شکافته و مریستم گنبدی شکل که در قاعده سوخک و بر ساقه صفحه[2] مانند قرار داشت در زیر بینوکولر جدا و تعداد دو مریستم در هر ظرف روی محیط کشت قرار داده شدند. نظر به این که در این آزمایش از دو اندازه مریستم استفاده شد، لذا یکبار مریستم گنبدی شکل همراه با تعداد ۴-۳ پریموردیای برگی به طول تقریبی ۰/۸-۰/۶ میلی‌متر برداشته می شد و در تیمار بعدی با حذف تعدادی از پریموردیای برگی، مریستم گنبدی شکل با ۲-۱ پریموردیای برگی به طول ۰/۸-۰/۶ برداشته و در محیط کشت مستقر می‌گردید. پس از استقرار مریستم در محیط کشت، شیشه‌ها در اتاقک رشد قرار می‌گرفتند. اتاقک رشد دارای میانگین دمای روزانه ۲۸ درجه سانتی‌گراد و میانگین دمای شبانه ۲۴ درجه سانتی‌گراد بود. فتوپریود در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تنظیم شده بود و منبع نور مورد استفاده لامپ‌های فلوئورسنت با نور سفید بود که شدت نور ۲۰۰۰ لوکس را تأمین می‌نمودند.

ارزیابی شاخص های رشد درون شیشه‌ای

پس از گذشت حدود سه هفته، ریز نمونه‌ها در محیط کشت تازه واکشت[3] گردیدند و با گذشت پنج هفته رشد در این شیشه‌ها شاخص‌های رشد شامل صفاتی چون: تعداد مریستم رشد کرده، طول گیاهک، تعداد برگ، تعداد مریستم با رشد کم، متوسط، خوب و یا عالی و تعداد نمونه آلوده یادداشت‌برداری شدند. متعاقباً نمونه‌های برگی از مریستم‌های رشد یافته به میزان ۰/۱ گرم برای تست الایزا جدا شده و گیاهک‌های باقی مانده به محیط کشت ریشه‌زایی با سطوح مختلف هورمونی ایندول بوتیریک اسید (IBA) در سطح صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر منتقل و پس از چهار هفته با

1. Laminar Air Flow Hood

2. Stem disc

3. Subculture

ظهور ریشه‌ها صفات مربوط به ریشه از جمله طول و تعداد آنها یادداشت‌برداری و ارزیابی گردید. پس از ریشه‌زایی گیاهک‌هایی که از وضعیت رشد مطلوب برخوردار بودند به محیط کشت گلدانی با ترکیب پیت و پرلیت استریل منتقل و برای هفته اول در شرایط رطوبت بالا در حد اشباع با نصب لیوان‌های شفاف یکبار مصرف بر گلدان‌ها به صورت وارونه و همچنین تامین رطوبت روزانه با استفاده از آب استریل صورت گرفت. پس از استقرار گیاهک‌ها در محیط رشد جدید به تدریج با کج گذاشتن لیوان‌ها و کاهش دفعات آبیاری میزان رطوبت کاهش و به‌منظور تأمین عناصر غذایی گیاهک‌ها از محلول غذایی کوئیک همراه با آب آبیاری استفاده گردید. پس از چهار هفته رشد در این شرایط، با کاهش تدریجی رطوبت، گیاهک‌های ریشه دار شده به محیط کشت گلدانی جدید با ترکیب پرلیت و خاک گلدانی ضدعفونی شده با قارچ‌کش بنومیل منتقل و در شرایط محیطی گلخانه سرد برای سازگاری با شرایط بیرون از اتاقک رشد قرار گرفتند.

طرح آزمایشی مورد استفاده

به منظور ارزیابی تأثیر فاکتورهای سطوح هورمونی، اندازه‌های مریستم و همچنین ژنوتیپ‌های مورد استفاده، از طرح آزمایشی بلوک‌های کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل استفاده گردید. در این طرح تیمارهای هورمونی BA در سه سطح صفر (B_0)، ۰/۵ (B_1) و ۱ (B_2) میلی‌گرم در لیتر، NAA در سه سطح صفر (N_0)، ۰/۱ (N_1) و۰/۵ (N_2) میلی‌گرم در لیتر و (IBA)، برای ریشه‌زایی، در سه سطح (صفر، ۰/۵و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، اندازه مریستم در دو اندازه ۰/۶-۰/۴ (S_1) و ۰/۸-۰/۶ (S_2) میلی‌متر و از دو ژنوتیپ آذرشهر و همدان استفاده گردید. نهایتاً تجزیه آماری داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و SAS صورت گرفت.

بخش دوم: تعیین آلودگی گیاهک‌های حاصل از کشت مریستم به پوتی ویروس‌ها

به منظور ارزیابی آلودگی گیاهک‌های حاصل از کشت مریستم به پوتی ویروس‌ها و نهایتاً حضور و یا عدم حضور ویروس، از آزمون الایزا استفاده شد. این آزمون بر اساس دستورالعمل Clark & Adams (1977) و به روش مستقیم یا ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی[1] که به (DAS-ELISA) معروف است اجرا گردید. پس از رشد گیاهک‌های درون‌شیشه‌ای نمونه‌های برگی آنها به میزان ۰/۱ گرم جدا و در آزمایشگاه ویروس شناسی گروه گیاهپزشکی با استفاده از آزمون ELISA-DAS و آنتی‌بادی پوتی ویروس‌ها، تهیه شده از مؤسسه تحقیقاتی DSMZ با کد AS-0573/1 بود برای بررسی میزان عاری‌سازی با استفاده از دستورالعمل آزمون الایزا و مؤسسه مذکور به نسبت۱:۱۰۰۰رقیق شده و مورد استفاده قرار گرفت. بعد از افزودن محلول سوبسترا به چاهک‌ها، در فاصله ۱۵ تا ۶۰ دقیقه میزان عددی جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر در دستگاه (ELISA-Reader) تعیین و با اعداد مربوط به چاهک‌های شاهد (گیاهان آلوده، سالم و بافر) مقایسه شد. بعد از مشاهده تغییر رنگ برای پایان دادن به واکنش آنزیم آلکالین فسفاتاز به هر چاهک مقدار۵۰ تا ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول سود NaOH سه مولار اضافه گردید. چاهک‌هایی که عدد جذب آنها از سه برابر میانگین جذب گیاه منفی و بافر بیشتر بود از نظر آلودگی ویروسی مثبت تلقی شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس، اختلاف معنی‌داری را بین اثر تیمارهای مختلف هورمون نفتالین استیک اسید در محیط کشت بر صفات پرآوری، طول گیاهک و تعداد برگ در هر ریزنمونه نشان داد به طوریکه سطح N_1 از NAA (غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین تأثیر را روی این صفات نشان داد. در ارزیابی اثر سطوح تنظیم‌کننده رشد بنزیل آدنین بر پرآوری، طول گیاهک و تعداد برگ، تیمارهای B1 و B2 (غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) به ترتیب بیشترین اثر را بر پرآوری و تعداد برگ در هر گیاهک داشته است و در ارتباط با طول گیاهک‌ها بیشترین اثر مربوط به تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بوده است.

اثر اندازه ریز نمونه بر پرآوری، طول گیاهک و تعداد برگ تأثیر معنی‌داری را در سطح ۱٪ نشان داد. سطح

1. Double Antibody Sandwich - ELISA

دوم اندازه ریز (۰/۸-۰/۶ میلیمتر) بیشترین پرآوری، طول گیاهک و تعداد برگ را در گیاهک داشته است. همچنین اثر متقابل رقم و اندازه مریستم تنها برای طول گیاهک در سطح ۱٪ معنی‌دار گردید و برای پرآوری و تعداد برگ اختلاف معنی‌داری نشان نداد و سطح دوم اندازه ریزنمونه و رقم شماره یک (S_2C_1) بیشترین طول گیاهک را داشت.

بررسی ریشه‌زایی گیاهک‌های درون شیشه‌ای

تنظیم‌کننده رشد ایندول بوتیریک اسید در سطح ۱٪ تأثیر معنی‌داری بر درصد ریشه‌زایی نشان داد. در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر موجب ۹۵٪ ریشه‌زایی گیاهک‌ها گردید. با توجه به اینکه در این بررسی از دو رقم سیر همدان و آذرشهر استفاده گردیده بود اثر رقم روی درصد ریشه‌زایی در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری را داشته است و رقم همدان با متوسط ۷۵٪ ریشه‌زایی نسبت به رقم آذرشهر که ۶۸٪ ریشه‌زایی داشت برتری نشان داد (جدول۱).

به طور کلی نتایج حاصل از این بررسی نشان داد تنظیم‌کننده رشد ایندول بوتیریک اسید بر ریشه‌زایی گیاهک‌های درون شیشه‌ای سیر مؤثر می‌باشد ولی درصد ریشه‌زایی با افزایش غلظت

تنظیم‌کننده رشد ایندول بوتیریک اسید از ۰/۵ به ۱ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت. ظاهراً گیاهک‌های درون شیشه‌ای سیر مشکلی برای ریشه‌دار شدن ندارند و ریشه‌زایی معمولاً در محیط کشت فاقد سایتوکاینین[1] به راحتی و برای ۵۰٪ از گیاهک‌ها صورت می‌گیرد.

1. Cytokinin

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی دو رقم سیر در غلظت‌های متفاوت ایندول بوتیریک اسید

هورمون / رقم	IBA (mg/l) ۰	۰/۵	۱	میانگین رقم
همدان	۵۵/۵	۹۸/۳	۷۲/۸	۷۵/ ۵ a
آذرشهر	۴۸/۷	۹۱/۷	۶۴/۲	۶۸/ ۲ b
میانگین تیمار	۵۲/ ۱ c	۹۵a	۶۸/۵ b	-

ارزیابی حذف پوتی ویروس‌ها با استفاده از آزمون سرولوژیکی الایزا

براساس نتایج به دست آمده از آزمون DAS-ELISA و با استفاده از آنتی‌بادی عمومی پوتی‌ویروس‌ها، تیمار گرمادرمانی توأم با کشت مریستم انتهایی (به طول ۰/۶-۰/۴ میلی‌متر) به میزان ۱۰۰٪ در عاری‌سازی سیر رقم‌های همدان و آذرشهر از پوتی ویروس‌ها مؤثر بود. در حالی که با کشت ریزنمونه (مریستم) به طول ۰/۸-۰/۶ میلی‌متری، میزان عاری‌سازی ۹۲/۶٪ تعیین گردید. در همین حال میزان عدم آلودگی بوته های شاهد به پوتی ویروس‌ها ۱۹٪ به دست آمد.

همچنین در تیمار گرمادرمانی به تنهایی میزان عاری‌سازی از پوتی ویروس‌ها برای رقم همدان ۷۳٪ و برای رقم آذرشهر ۶۱٪ تعیین گردید (جدول۲).

در بسیاری از تحقیقات انجام شده با هدف عاری‌سازی سیر از ویروس با استفاده از کشت مریستم به تنهایی و یا گرمادرمانی به تنهایی، عاری‌سازی به میزان ۱۰۰٪ گزارش نشده است که با نتایج آزمایش حاضر مطابقت دارد. موفقیت در به دست آوردن گیاهان عاری از ویروس به وسیله کشت مریستم به تنهایی بستگی به اندازه اولیه ریز نمونه‌های مریستم دارد و چنانچه اندازه اولیه مریستم جدا شده تا حدی بزرگ باشد که بافت‌های تمایز یافته اطراف نیز به همراه آن

جدول ۲- میزان عاری‌سازی ارقام سبر همدان وآذرشهر پس از تیمارهای کشت مریستم و گرمادرمانی

تیمارها	ارقام: همدان			آذرشهر			میانگین درصد عاری‌سازی
	تعداد نمونه	تعداد عاری‌سازی	درصد عاری‌سازی	تعداد نمونه	تعداد عاری‌سازی	درصد عاری‌سازی	
مریستم ۰/۶-۰/۴ + گرمادرمانی	۳۴	۳۴	۱۰۰	۳۴	۳۴	۱۰۰	۱۰۰
مریستم ۰/۸-۰/۶ + گرمادرمانی	۳۴	۳۲	۹۴/۱۱	۳۴	۳۱	۹۱/۱۷	۹۲/۶۴
گرمادرمانی به تنهایی	۲۶	۱۹	۷۳/۰۷	۱۸	۱۱	۶۱/۱۱	۶۷/۰۹
شاهد*	۱۴	۳	۲۱/۴۲	۱۲	۲	۱۶/۶۶	۱۹/۰۴

* تعداد نمونه که در مزرعه و پس از آزمون الایزا مثبت بودند و هیچگونه تیماری روی آن ها صورت نگرفت و به عنوان شاهد آزمایش، نگهداری گردیدند.

جدا شده و کشت داده شوند احتمال آلوده باقی ماندن گیاهک‌های حاصله از کشت مریستم وجود دارد.

نتایج حاصل از آزمایش کشت مریستم و گرمادرمانی را می‌توان به شرح زیر خلاصه نمود:

تنظیم‌کننده‌های رشد نفتالین استیک اسید و بنزیل آدنین اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ بر رشد گیاهک‌های درون شیشه‌ای داشتند که با نتایج Ayabe & Sumi (1998)، Ucman *et al*. (1997)، Verbeek *et al*. (1995) و Nagakubo *et al*. (1997) مطابقت داشت.

اندازه ریزنمونه بزرگتر در کشت درون شیشه‌ای رشد نهایی بیشتری داشت ولی در ارتباط با میزان حذف ویروس، ریز نمونه کوچک‌تر، علی‌رغم دشواری استقرار و رشد کمتر، نتایج بهتری را در عاری‌سازی ویروس آشکار ساخت که این نتایج با نتایج، Ramires - Malagon & Perez-Moreno (2006)، Ucman *et al*. (1997)، Verbeek *et al*. (1995) و Nagakubo *et al*. (1997) هماهنگی داشت. در ارتباط با تیمار گرمادرمانی در آزمایشات مشخص گردید این تیمار توأم با کشت مریستم امکان عاری‌سازی و حذف ویروس را افزایش می‌دهد اگرچه به تنهایی نیز قادر است به میزان قابل توجهی مؤثر باشد که با نتایج دیگر محققان از جمله Walkey (1990)، Ramires-Malagon & Perez-Moreno (2006)، Verbeek *et al*. (1995) و Ucman *et al*. (1997) مطابقت نمود.

REFERENCES

1. Ayabe, M. & Sumi, S. (1998). Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc-culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Report*, 17, 773-779.
2. Bhojwani, S. S., Cohen, D. & Fry, P. R. (1981). Production of virus-free garlic and field performance of micropropagated plants. *Scientia Horticulturae*, 18, 39-43.
3. Clark, M. F., A. N. Adams, A., D. Voller and E. Bidwell, M. F. (1976). The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology*, 33, 165-167.
4. Conci, V. C., Canqvelli, A., Lunello, P., Di Rienzo, J., Nome, S. F. & Zumelzu, G. (2003). Yeild losses associated with virus – infected garlic plant during five successive years. *Plant Disease*, 87, 1411-1415.
5. Davis, R. M. (1995). Disease caused by viruses and mycoplasmalike organisms. In: H. F. Schwarts, & S. K. Mohan, (Eds.). *Compendium of Onion and Garlic Diseases*. St. Paul. APS Press. p. 54.
6. FAOSTAT data. (2003). http://apps.fao.org/default.htm.Last updated October 2003.
7. Dizaji, I. A. & Izadpanah, K. (2001). Characterization of the virus causing mosaic in Persian leek (*Allium ampeloprasum* ssp. Persicm Mousavi & Kashi). *Iranian Journal of Plant Pathology*, 37, 39–49. (In Farsi).
8. Etemadi, N. (1991). *The effect of media and explants in producing garlic plantlet in-vitro*. M. Sc. thesis of horticulture sciences, College Agriculture. Tehran University. P.109. (In Farsi).
9. Izadpanah, K. (1982). *An annotated list of virus and virus - like diseases of plant in Fars province*. Shiraz University, Shiraz, Iran. (In Farsi).
10. Kamenetsky, R. (2007). Garlic: Botany and Horticulture. In: J. Janick, (Ed.) *Horticultural Reviews*, Volume 33. (pp. 123 – 172). John Wiley & Sons. Inc.
11. Lunello, P. F., Almonacid, B., Kobayashi, K., Helguera, M., Nome, S. F., Menteaberry, A. & Conci, V. C. (2000). Distribution of garlic virus A in different garlic production regions of Argentina. *Journal of Plant pathology*, 82, 17-21.
12. Moriconi, D. N., Conci, V. C. & Nome, S. F. (1990). Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) in vitro. *Phyton*, 51, 145-151.
13. Murashige, J. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
14. Nagakubo, T., Takaichi, M. & Oeda, K. (1997). Micropropagation of *Allium Sativum* L. (Garlic). In: Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. (pp. 3-19). (39th ed.), Springer, verlag. Berlin- Heidelberg
15. Novak, F. J. (1990). Allium tissue culture. In: H. d. Rabinowitch and J. L. Brewster (eds.), *Onions and Allied crops*. P. 233-250. Vol. I CRC Press, Boca Raton. Fl.
16. Shahraeen, N., Bananej, K., Ahoonmanesh, A. & Lesemann, D. E. (1998). Identification of three elongated viruses from Allium species (onion and garlic) in Tehran province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 34(1, 2), 37 – 38. (In Farsi).
17. Ramires- Malagon, R. & Perez-Moreno, L. (2006). Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86, 103-110.

18. Ucman, R., Zel, J. & Ravnikar, M. (1998). Thermotherapy in virus elimination from garlic: Influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro. *Scientia Horticulture*, 73, 193-202.
19. Van der Meer, Q. P. (1997). Old and new crops within edible alliums. *Acta Horticulture*, 433, 17-31.
20. Van Dijk, P. (1994). Virus disease of Allium species and prospects for their control. *Acta Horticulture*, 358, 299-306.
21. Verbeek, M., Van Dijk, P. & Van Well, M. A. (1995). Efficiency of eradication of four viruses from garlic (*Allium sativum* L.) by meristem-tip culture. *European Journal of Plant Pathology*, 101, 231-239.
22. Voller, A., Bartleh, A., Bidwell, D. E., Clark, M. F. & Adams, A. N. (1976). The detection of viruses by enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology*, 33, 165-167.
23. Walkey, D. G. A. (1990). Virus diseases. In: H. D. Rabinowitch and J. L. Brewster (Eds.), *Onions and allied crops*. (pp. 191-212). Vol. II. CRC Press, Boca Raton, Fl.