نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و ششم، شماره دوم، ۱۳۹۸
۵۹-۶۹
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2019.14550.2306

مطالعه اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی و تشکیل سیرچه در کلون‌های بومی سیر (*Allium sativum* L.) استان همدان از طریق کشت مریستم

مرضیه قربانی[۱]، *محمدرضا عبداللهی[۲] و محمدحسن جعفری صیادی[۳]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی، بخش تحقیقات علوم زراعی- باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران، [۲]دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، [۳]استادیار گروه کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه پیام‌نور، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۰۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: سیر بعد از پیاز دومین و پرمصرف‌ترین گیاه از جنس آلیوم‌ها می‌باشد که از اهمیت غذایی و دارویی بالایی برخوردار است. سیر یک محصول رویشی بوده و توسط بسیاری از عوامل بیماری‌زا و به‌ویژه ویروس‌ها آلوده می‌گردد. یکی از راه‌های حذف عوامل بیماری‌زای ویروسی استفاده از کشت مریستم و تولید سیرچه در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر عبارت است از ارزیابی اثر استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی و تشکیل سیرچه در کلون‌های بومی سیر استان همدان از طریق کشت مریستم.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل، عامل اول شامل کلون با ده سطح و عامل دوم تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی با چهار سطح (شاهد بدون هورمون، MS+1µM BA و MS+1µM BA+1µM NAA و MS+10µM BA+5µM NAA) انجام گرفت. پس از مرحله اول و تولید گیاهچه، به‌منظور سیرچه‌زایی در گیاهچه‌های حاصله، از یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ کلون و ٤ سطح عامل هورمونی ذکرشده در محیط کشت MS حاوی ٦ درصد ساکارز با سه تکرار استفاده شد. نمونه‌های کشت شده به‌مدت چهار ماه در یخچال و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس به فیتوترون با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. یک ماه بعد یادداشت‌برداری از نمونه‌ها انجام گرفت. به‌منظور نرمال‌سازی داده‌ها از تبدیل لگاریتمی و آزمون یکنواختی واریانس‌ها استفاده گردید و سپس داده‌های تبدیل‌شده با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه آماری قرار گرفته و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شدند.

یافته‌ها: در مرحله اول آزمایش، کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت باعث ایجاد تغییرات قابل‌توجهی در خصوصیات رشدی گیاهچه‌های تولیدی شد. محیط کشت MS+1µM BA بیش‌ترین مقدار وزن گیاهچه و طول برگ را ایجاد کرد. کلون‌های مختلف سیر اختلاف معنی‌داری از نظر صفات تعداد برگ، طول برگ و وزن گیاهچه نشان دادند. کلون شورین بیش‌ترین تعداد برگ، بزرگ‌ترین طول برگ و بالاترین وزن گیاهچه را تولید کرد. اثر متقابل تیمار هورمونی در کلون برای هیچ‌کدام از صفات مورد مطالعه معنی‌دار نگردید. در مرحله دوم آزمایش، اثر متقابل کلون در تیمار هورمونی برای تمامی صفات

* مسئول مکاتبه: m.abdollahi@basu.ac.ir

(وزن نهایی گیاهچه، تعداد و وزن سیرچه، وزن ریشه و وزن برگ) در سطح احتمال درصد معنی‌دار گردید. کلون شورین در محیط کشت MS+10µM BA+5µM NAA در همه صفات مورد بررسی بالاترین مقدار را به خود اختصاص داد.

نتیجه‌گیری: با استفاده از نتایج این پژوهش، می‌توان کلون‌های برتر سیر را شناسایی و با استفاده از هورمون‌های گیاهی و کشت مریستم در شرایط آزمایشگاهی، نسبت به سالم‌سازی و ریزازدیادی گیاه سیر و تولید سیرچه، اقدام نمود.

واژه‌های کلیدی: تشکیل سیرچه، کشت مریستم، کلون‌های سیر همدان، مواد تنظیم‌کننده رشد

مقدمه

سیر با نام علمی *Allium sativum* L. یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی است و بعد از پیاز دومین رتبه را در بین گیاهان خانواده آلیاسه دارا می‌باشد و به‌عنوان فرآورده‌های دارویی، ماده غذایی و ادویه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸). این گیاه از زمان‌های بسیار دور در آسیا و مدیترانه مورد استفاده بوده است. بر اساس آخرین آمار منتشر شده از سوی سازمان جهاد کشاورزی استان همدان و مقایسه این آمار با آمار منتشرشده توسط فائو، استان همدان با تولید ۳٤۱۲٦ تن محصول در سال زراعی ۹۱-۱۳۹۰ (حدود ۳۸ درصد تولید کل کشور) یکی از قطب‌های اصلی تولید این محصول در کشور محسوب می‌شود و توده‌های بومی آن از لحاظ ژنتیکی و سازگاری با محیط ارزشمند می‌باشند (۳ و ٤). تمام ارقام تجاری سیر عقیم هستند، بنابراین تکثیر سیر از طریق غیرجنسی صورت می‌گیرد. سیر یک محصول رویشی بوده و توسط بسیاری از عوامل بیماری‌زای قارچی، باکتریایی و ویروسی آلوده می‌گردد (۵، ٦ و ۲۲). مهم‌ترین ویروس‌های بیماری‌زای سیر، ویروس‌های گروه Allexovirus، Carlavirus و Potyvirus می‌باشند که به‌صورت چشم‌گیری باعث کاهش عملکرد محصول به‌میزان ۷۸ درصد می‌گردند (۷). روش‌های کشت بافت پتانسیل بالایی را برای بهبود زراعت سیر فراهم می‌نماید. تکثیر سیر در مزرعه بسیار پائین است، در حالی‌که در برنامه تولید گیاهان عاری از ویروس در شرایط درون‌شیشه‌ای در مدت زمان کوتاهی تعداد زیادی گیاه سالم تولید می‌گردد (۱۳). در پژوهشی که توسط ناگاکابو و همکاران (۱۹۹۷) بر روی سیر انجام شد مریستم انتهایی گیاه جدا شده و به محیط LS حاوی یک میکرومولار ایندول استیک اسید (IAA) و یک میکرومولار بنزیل آدنین (BA) منتقل گردید. پس از چهار هفته جوانه‌های رشدیافته به محیط LS تغییریافته حاوی ٥٦/٥ میکرومولار نیترات پتاسیم، ۳/٥ میلی‌مولار کلرید آمونیوم، ٥ میکرومولار اسید نفتالین استیک (NAA) و ۱۰ میکرومولار BA انتقال یافتند. پس از یک ماه گیاهچه‌های حاصل را چندین مرتبه واکشت نموده و آن‌ها را به محیط LS حاوی ساکارز ۹ درصد منتقل نمودند و پس از دو ماه موفق به تولید سیرچه در شیشه گردیدند (۱۳). هاول و نواک (۱۹۸٥) با استفاده از کشت مریستم انتهایی گیاه پیاز (*Allium cepa* L.) در محیط کشت BDS حاوی مقادیر مختلف NAA و بنزیل آمینوپورین (BAP) و انتقال جوانه‌های حاصل به محیط ریشه‌زایی غنی‌شده با NAA و کاینتین (KI) با غلظت یک میکرومولار و انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلخانه موفق به تولید گیاه کامل سیر گردیدند (۱۰). در پژوهش دیگری که توسط شدیدالحق و همکاران (۲۰۰۳) بر روی ارقام بنگلادشی سیر انجام گرفت، مریستم جوانه و انتهای ریشه جدا شده و به محیط MS حاوی مقادیر مختلف مواد تنظیم‌کننده رشد انتقال یافتند. مریستم جوانه در تمامی محیط‌ها رشد کردند اما بیش‌ترین درصد رشد (۹۹/٥٥ درصد) در محیط بدون هورمون حاصل

گردید و تنها ٤٠ درصد از مریستم‌های ریشه، در محیط MS حاوی یک میکرومولار NAA و ١٠ میکرومولار BA گیاهچه تولید نمودند. جوانه‌های رشدیافته در محیط MS دارای غلظت ٠/٥ مولار بنزیل آدنین تکثیر شده و سیرچه‌ها در تمام محیط‌های کشت تشکیل گردیدند (١٧). در مطالعه‌ای که توسط علیزاده و همکاران (٢٠١٣) برروی ریزازدیادی گیاه *Allium tuberosum* L. توسط مزوکوتیل انجام گرفت، بیش‌ترین تعداد جوانه در محیط کشت MS حاوی ١ میلی‌گرم در لیتر BAP و ٢ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید (IBA) به‌دست آمد. جوانه‌ها به‌منظور ریشه‌زایی به محیط MS حاوی ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر IBA منتقل شدند و مشخص شد که انتهای مزوکوتیل نمونه‌ها به‌طور چشم‌گیری در محیط MS حاوی BA می‌توانند سیرچه تولید نمایند (٢).

هدف از انجام این پژوهش مطالعه اثر نوع و غلظت‌های متفاوت از تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی صفات رویشی گیاهچه‌های تولیدی سیر و تولید سیرچه از آن‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای در کلون‌های مختلف از مناطق استان همدان بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در دو مرحله صورت گرفت و از ١٠ کلون بومی سیر استان همدان که پیش از این خالص‌سازی شده بودند (١)، استفاده گردید. کلون‌های مورد استفاده شامل کلون‌هایی از مناطق تویسرکان، مریانج، موئیجین، برفجین، شورین، علی‌آباد، سولان، حیدره، بهار و توئیجین بودند. به‌منظور شکستن خواب، سیرچه‌ها به‌مدت یک ماه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس تحت شرایط استریل مریستم‌ها جدا شده و در محیط کشت MS حاوی ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد کشت گردیدند. در مرحله اول، آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ده تکرار انجام شد. عوامل مورد بررسی شامل نوع کلون و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بود. سطوح فاکتور مواد تنظیم‌کننده رشد شامل؛ شاهد (بدون استفاده از هورمون)، MS+1µM BA و MS+10µM BA+5µM NAA و MS+10µM BA+5µM NAA بود. در آزمایشگاه پس از جدا نمودن پوسته‌های سیر و شستشوی کامل حبه‌ها در کلون‌های مختلف، به‌منظور سترون‌سازی، ابتدا حبه‌ها در اتانول ٧٠ درصد به‌مدت ده دقیقه و سپس محلول هیپوکلرید سدیم دو درصد حاوی چند قطره توین ٢٠ به‌مدت سی دقیقه قرار گرفتند و در نهایت آبکشی حبه‌ها با آب مقطر استریل در سه مرحله و در هر مرحله به‌مدت پنج دقیقه انجام شد. مریستم‌ها در شرایط استریل (زیر دستگاه لامینارفلو) با استفاده از اسکالپل و سرنگ نوک تیز در زیر بینی‌کولار جدا شده و به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت استریل حاوی تیمارهای مختلف هورمونی انتقال یافتند. سپس نمونه‌های کشت شده به اتاقک رشد با شرایط درجه حرارت ٢٥ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی انتقال یافتند. پس از ٣٨ روز صفاتی مانند، تعداد برگ و بزرگ‌ترین طول برگ و وزن گیاهچه اندازه‌گیری گردید. پس از تولید گیاهچه از مرحله اول آزمایش، به‌منظور تولید سیرچه در شرایط درون‌شیشه‌ای دوباره، از یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٣ تکرار و محیط کشت MS حاوی شش درصد ساکارز استفاده گردید. فاکتورهای آزمایش عبارت بودند از: کلون‌های بومی سیر (١٠ کلون استفاده شده در مرحله اول آزمایش) و ٤ سطح تیمار هورمونی استفاده شده در مرحله اول. نمونه‌های کشت شده به‌مدت چهار ماه در یخچال و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس به فیتوترون منتقل شدند. یک ماه بعد یادداشت‌برداری از وضعیت سیرچه‌های تولیدی در نمونه‌ها انجام گرفت. در خاتمه نرمال‌سازی داده‌ها با تبدیل لگاریتمی و آزمون یکنواختی واریانس‌ها

صورت گرفت و سپس داده‌های تبدیل شده با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه آماری قرار گرفته و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس در مرحله اول آزمایش (جدول ۱)، اثر کلون و تنظیم‌کننده رشد بر صفات طول برگ، تعداد برگ و وزن گیاهچه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید. اثر متقابل کلون و تنظیم‌کننده رشد برای هیچ‌کدام از صفات مورد مطالعه معنی‌دار نشد. بنابراین مشخص‌شده که کلون‌های مورد بررسی در محیط‌های کشت مختلف رفتار یکسانی داشته‌اند. بیش‌ترین وزن گیاهچه (۰/۲۲ گرم) و طول برگ (۳۸/۲۶ میلی‌متر) در تیمار هورمونی دوم (MS+1µM BA) به‌دست آمد. بیش‌ترین میانگین تعداد برگ (۵/۱۸ عدد) در محیط MS+1µM BA+1µM NAA حاصل گردید. کم‌ترین وزن گیاهچه (۰/۰۷ گرم) و میانگین تعداد برگ (۳/٤٤) در محیط کشت فاقد تیمار هورمونی حاصل گردید در حالی‌که کم‌ترین طول برگ (۱۲/۲۲ میلی‌متر) در تیمار چهارم (MS+10µM BA+5µM NAA) به‌دست آمد (جدول ۲). مقایسه میانگین طول برگ و وزن گیاهچه در کلون‌های مختلف نشان داد که بیش‌ترین و کم‌ترین طول برگ و وزن گیاهچه به‌ترتیب متعلق به کلون‌های شورین (۳۳ میلی‌متر، ۰/۲۲ گرم) و مریانج (۱۹ میلی‌متر، ۰/۰۷ گرم) بود. مقایسه میانگین تعداد برگ در کلون‌های مورد مطالعه نشان‌دهنده تشکیل بیش‌ترین تعداد برگ در کلون موئیجین (٤/۷۸ برگ) و کم‌ترین میانگین تعداد برگ (۳/۲۳ برگ) در کلون مریانج بود (جدول ۳). در بین کلون‌های مورد مطالعه نیز اختلافات معنی‌داری وجود داشت. کلون شورین با برخورداری از بیش‌ترین میانگین تعداد برگ و طول برگ بالاترین وزن گیاهچه را نیز دارا بود و از نظر سه صفت مورد بررسی در جایگاه اول قرار گرفت. کلون‌های برفجین و بهار نیز در مجموع صفات مورد بررسی در رده‌های بعد از کلون شورین قرار گرفتند و از قابلیت مناسب‌تری برای کشت مریستم برخوردار بودند. کلون مریانج در هر سه صفت مورد بررسی کم‌ترین سطح را به‌خود اختصاص داد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر باززایی گیاهچه در کلون‌های مختلف سیر استان همدان.

Table 1. Analysis of variance of the effect of growth regulators on plantlet regeneration in different garlic clones of Hamedan Province.

منابع تغییرات Sources of Variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square		
		وزن گیاهچه (گرم) Plantlet weight (g)	تعداد برگ Leaf number	طول برگ (میلی‌متر) Leaf length (mm)
کلون Clone	9	19.22**	0.42**	1.02**
تنظیم‌کننده رشد گیاهی Growth regulators	3	69.98**	0.46**	19.17**
کلون × تنظیم‌کننده رشد گیاهی Clone × Growth regulators	27	11.26^{ns}	0.06^{ns}	0.30^{ns}
خطای آزمایش Error experiment		0.14	0.06	0.21
ضریب تغییرات (درصد) CV(%)		18.80	18.32	14.90

** و ^{ns} به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و غیرمعنی‌دار از نظر آماری.

** Show being significant (α=0.01), ^{ns} means no significant respectivly.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای صفات باززایی گیاهچه در کشت مریستم کلون‌های مختلف سیر استان همدان.

Table 2. Means comparison of different plant growth regulators levels on plantlet regeneration in meristem culture, of different garlic clones in Hamedan Province.

صفات باززایی گیاهچه Traits plantlet regeneration			Growth regulators (µm)	
طول برگ (میلی‌متر) Leaf length (mm)	تعداد برگ Leaf number	وزن گیاهچه (گرم) Plantlet weight (g)	BA	NAA
28.45[b]	3.44[d]	0.07[d]	0	0
38.26[a]	3.85[c]	0.22[a]	1	0
22.35[c]	5.18[a]	0.16[b]	1	1
12.22[d]	4.34[b]	0.11[c]	10	5

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Values with the same letter are not significantly different at probability levels of 5% using Duncan Multiple Range Test.

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات باززایی گیاهچه در کشت مریستم از کلون‌های بومی سیر استان همدان.

Table 3. Mean comparison of plantlet regeneration traits by meristem culture in different garlic clones of Hamedan Province.

صفات باززایی گیاهچه Traits plantlet regeneration			Clones	کلون
طول برگ (میلی‌متر) Leaf length (mm)	تعداد برگ Leaf number	وزن گیاهچه (گرم) plantlet weight (g)		
19.74[cd]	3.39[bc]	015[ab]	Aliabad	علی‌آباد
28.86[ab]	4.29[ab]	0.18[a]	Barfejin	برفجین
32.96[a]	4.74[a]	0.22[a]	Sheverin	شورین
28.56[ab]	3.87[abc]	0.14[ab]	Bahar	بهار
26.22[ab]	4.47[a]	0.13[ab]	Toserkan	تویسرکان
19.86[cd]	4.16[a]	0.09[c]	Heydareh	حیدره
25.39[bc]	4.02[ab]	0.13[ab]	Solan	سولان
19.00[d]	3.32[c]	0.07[c]	Maryanaj	مریانج
25.21[ab]	4.78[a]	0.13[ab]	Moiejin	موئیجین
24.35[bc]	4.10[ab]	0.11[bc]	Toiejin	نوئیجین

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Values with the same letter are not significantly different at probability levels of 5% using Duncan Multiple Range Test.

نتایج مرحله دوم آزمایش: در مرحله دوم آزمایش اثر ٤ سطح تنظیم‌کننده رشد گیاهی استفاده شده در مرحله اول آزمایش بر روی صفات وزن گیاهچه، تعداد سیرچه، میانگین وزن سیرچه، میانگین وزن ریشه‌چه و میانگین وزن ساقه‌چه در ۱۰ کلون سیر مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به شرح زیر می‌باشند:

وزن نهایی گیاهچه: بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ٤)، اثر تیمارهای مختلف هورمونی و کلون در سطح احتمال یک درصد بر وزن نهایی گیاهچه معنی‌دار شد. همچنین اثر متقابل تیمار هورمونی و کلون نیز برای وزن گیاهچه اختلاف معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵) نشان دادند. مقایسه میانگین وزن گیاه در سطوح مختلف تیمارهای هورمونی نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین سطوح هورمونی مورد بررسی بود و حداکثر وزن گیاه در تیمار چهارم (MS+10µM BA+5µM NAA) و کم‌ترین وزن گیاهچه در محیط کشت فاقد تیمار هورمونی حاصل گردید.

کلون‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد از نظر وزن نهایی گیاهچه نشان دادند. همچنین اثر متقابل کلون در تیمار هورمونی بر وزن نهایی گیاهچه درسطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. بیش‌ترین وزن متوسط گیاهچه در تیمار چهارم هورمونی و کلون شورین (۵/۵۵ گرم) حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار چهارم هورمونی کلون برفجین نداشت و کم‌ترین وزن متوسط گیاهچه در محیط کشت فاقد مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی و کلون مریانج (۰/۷۵گرم) تولید شد. (جدول ۵).

تعداد سیرچه: تعداد سیرچه‌های تولیدشده در هر گیاهچه تحت‌تأثیر کلون، تنظیم‌کننده‌های رشد و اثر متقابل آن‌ها قرار گرفت (جدول ٤). بیش‌ترین تعداد سیرچه در محیط کشت حاوی 10µM BA+5µM NAA و کلون توئیجین (٦/٦٧ عدد) تولید شد که با کلون‌های شورین و موئیجین تفاوت معنی‌دار نداشت و کم‌ترین تعداد سیرچه در کلون مریانج و محیط کشت شاهد (۱/٦٧ عدد) تولید شد (جدول ۵).

میانگین وزن سیرچه: نوع کلون، تنظیم‌کننده‌های رشد و اثر متقابل آن‌ها بر وزن سیرچه‌های تولیدشده در هر گیاهچه تأثیر معنی‌دار داشتند (جدول ٤). در بین تیمارهای تنظیم‌کننده رشد به‌کار برده شده، متناسب با افزایش سطح آن‌ها، میزان وزن سیرچه‌های حاصله نیز افزوده شد (شکل ۲). بیش‌ترین وزن سیرچه در تیمار چهارم هورمونی و کلون برفجین (۲/۰۳ گرم) و کم‌ترین وزن سیرچه در محیط کشت شاهد و کلون مریانج (۰/۱۸ گرم) تولید گردید (جدول ۵).

میانگین وزن ریشه: تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که وزن ریشه تولیدشده در هر گیاهچه تحت‌تأثیر کلون، مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی و همچنین اثر متقابل آن‌ها قرار گرفت (جدول ٤). بیش‌ترین وزن ریشه از کاربرد 10µM BA+5µM NAA در کلون شورین و علی‌آباد حاصل شد و کم‌ترین وزن ریشه در کلون مریانج و محیط کشت 1µM BA تولید شد که تفاوت معنی‌داری با محیط شاهد نداشت (جدول ۵).

میانگین وزن برگ: اثر نوع کلون و مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی و همچنین اثر متقابل آن‌ها بر میانگین وزن برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. بیش‌ترین وزن تر برگ در کلون شورین و محیط کشت MS+10µM BA+5µM NAA و کم‌ترین وزن برگ در محیط کشت حاوی 1µM BA حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت. (جدول ۵).

جدول ٤- تجزیه واریانس اثر تنظیم‌کننده رشد گیاهی روی صفات باززایی گیاهچه و تولید سیرچه در کلون‌های مختلف سیر استان همدان.

Table 4. Variance analysis of the effect of plant growth regulator on plantlet regeneration and bulblet formation in different garlic clones of Hamedan Province.

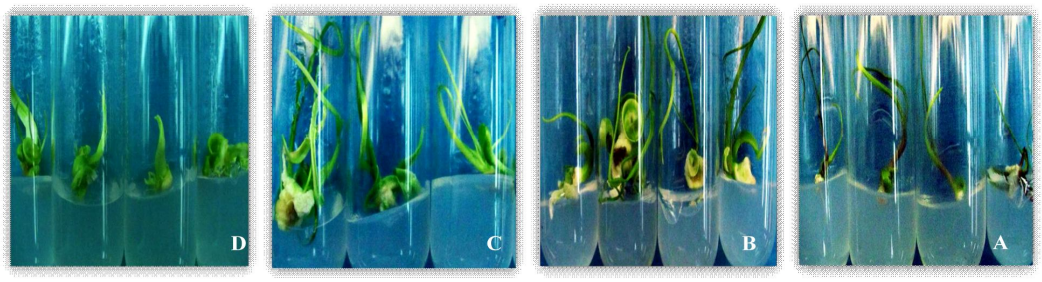
منابع تغییرات Sources of changes	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square				
		وزن گیاهچه Plant weight (g)	تعداد سیرچه Bulblet number	وزن سیرچه Bulblet weight (g)	وزن ریشه Root weight (g)	وزن برگ Leaf weight (g)
کلون Clone	9	6.49**	4.31**	0.75**	1.28**	1.20**
تنظیم‌کننده رشد گیاهی Growth regulators	3	38.35**	48.10**	2.31**	5.11**	5.64**
کلون × تنظیم‌کننده رشد گیاهی Clone × Growth regulators	27	0.90**	2.64**	0.11**	0.22**	0.22**
خطای آزمایش Error experiment	80	0.17	0.46	0.03	0.06	0.08
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		15.51	21.96	23.51	22.11	31.89

** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و غیرمعنی‌دار از نظر آماری.

** Show being significant (α=0.01), ns means no significant respectivly.

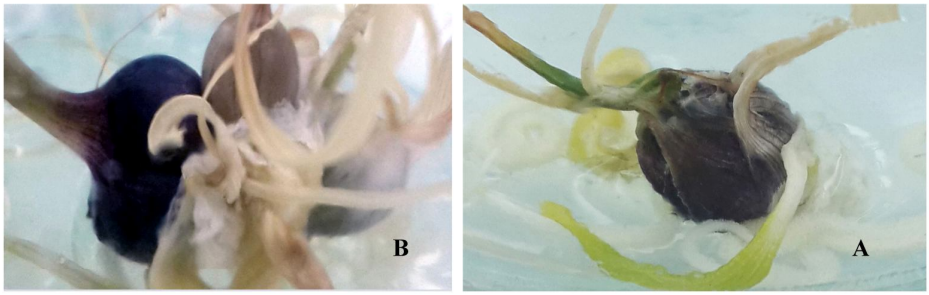
به‌طورکلی بر اساس نتایج حاصل از مرحله اول آزمایش کاربرد مواد تنظیم‌کننده رشد در محیط کشت باعث ایجاد تغییرات قابل‌توجهی در خصوصیات رشدی گیاهچه‌های تولیدی گردید. تیمار دوم (MS+1µM BA) بیش‌ترین وزن گیاهچه و طول برگ را داشت و متوسط وزن گیاهچه در این تیمار نسبت به تیمار شاهد (محیط کشت MS فاقد هورمون) بیش از ۳ برابر افزایش داشت. بنابراین به‌نظر می‌رسد افزودن یک میکرو مولار BA به محیط کشت MS می‌تواند باعث ایجاد پاسخ مناسب در رشد گیاهچه سیر گردد (شکل ۱، ب). روبرت و همکاران (۱۹۹۸) نیز بهترین سرعت ریزازدیادی سیر را در محیط کشت حاوی یک میکرومولار IAA و BA و سپس انتقال جوانه‌های حاصل به محیط کشت حاوی ۵ میکرومولار اسید جاسمونیک گزارش نمودند (١٦). در مطالعه دیگری که توسط شدیدالحق و همکاران (۲۰۰۳) بر روی ارقام بنگلادشی سیر انجام شد بیش‌ترین درصد رشد مریستم جوانه (۹۹/۵۵ درصد) در محیط MS بدون هورمون حاصل گردید اما گیاهچه‌های حاصل در محیط کشت حاوی هورمون BA به مراتب قوی‌تر از گیاهچه‌های به‌دست آمده در محیط MS فاقد هورمون بودند (۱۷). زاهدی و همکاران (۲۰۱۰) نیز اثر رقم و مقدار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BA را در پرآوری و وزن و تعداد برگ گیاه سیر مؤثر دانسته‌اند (۲۳). همچنین در مرحله دوم آزمایش کاربرد مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی در محیط کشت تغییرات قابل‌توجهی در همه خصوصیات رشدی گیاهچه‌های تولیدی ایجاد نمود و در تیمار چهارم (MS+10µM BA+5µM NAA) همه صفات مورد بررسی حداکثر مقدار خود را دارا بودند و این در حالی است که تمامی این صفات در محیط کشت فاقد تیمار هورمونی حداقل مقدار خود را دارا بودند به‌نحوی‌که متوسط وزن گیاهچه در تیمار چهارم نسبت به تیمار شاهد بیش از ۷/٤ برابر، میانگین تعداد سیرچه تشکیل شده ٦/٦٧ برابر، وزن سیرچه تشکیل شده ۱۱ برابر، میانگین وزن ریشه ۹/۲ برابر و میانگین وزن برگ ۱۰/۷۹ برابر افزایش داشت. بنابراین به‌نظر می‌رسد

افزودن مقدار پنج میکرومولار BA و ده میکرومولار NAA به محیط کشت MS می‌تواند باعث ایجاد پاسخ بسیار مناسب‌تری در رشد گیاهچه سیر گردد. این تنظیم‌کننده‌ها با اثری که بر روی سلول‌ها می‌گذارند منجر به افزایش تجمع آسمیلات‌ها و مواد فتوسنتزی در سلول شده و در نتیجه سبب افزایش وزن تر گیاهچه می‌گردند (۱۸). قهرمانی‌مجد و همکاران (۲۰۰۹)، بیش‌ترین تعداد پیازچه موسیر را در محیط کشت MS حاوی $2mgl^{-1}$ BA+ $1mgl^{-1}$ NAA به‌دست آوردند و اعلام نمودند که نسبت دو برابر غلظت BA به NAA اثر بیش‌تری در تولید پیازچه موسیر دارد و عدم حضور سیتوکینین به اکسین باعث کاهش تولید پیازچه و یا عدم تولید آن خواهد شد (۹). اثر مثبت افزودن مواد تنظیم‌کننده رشد NAA و BA به محیط کشت، بر عملکرد گیاهچه سیر و تعداد و اندازه سیرچه تشکیل شده در شرایط آزمایشگاهی توسط پژوهشگران زیادی به اثبات رسیده است (۲، ۱۱، ۱۲، ۱٤، ۱۵، ۱۹، ۲۰ و ۲۱). همچنین کلون‌های مورد استفاده تقریباً پاسخ یکنواختی به وجود یا عدم وجود مواد تنظیم‌کننده رشد نشان دادند اما در بین آن‌ها نیز اختلافات معنی‌داری وجود داشت و کلون شورین و برفجین به‌عنوان کلون‌های برتر و کلون مریانج ضعیف‌ترین کلون شناسایی گردید. لازم به ذکر است که در مورد باززایی کلون‌های محلی سیر همدان، تشکیل سیرچه در شرایط آزمایشگاهی و بررسی واکنش آن‌ها به محیط کشت‌های مختلف پیش از این مطالعه‌ای انجام نشده و تا به حال اطلاعاتی منتشر نشده است. بنابراین این بررسی نخستین مطالعه در این زمینه می‌باشد و به‌عنوان یافته‌ای جدید در برنامه تکثیر و سالم‌سازی سیر از کلون‌های بومی استان می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.



شکل ۱- گیاهچه‌های به‌دست آمده از کشت مریستم سیر در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در مرحله اول آزمایش. A- محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی، B- MS+1µM BA، C- MS+1µMBA+1µm NAA، D- MS+10µM BA+5µM NAA.

Fig. 1. Plantlets obtained from meristem culture in MS medium supplement with various levels of plant growth regulators. A: MS without plant growth regulators, B: MS+1µM BA, C: MS+1µMBA+1µm NAA, D: MS+10µM BA+5µM NAA.



شکل ۲- سیرچه‌های درون‌شیشه‌ای حاصل از مرحله دوم آزمایش. A- محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد، B- محیط کشت MS+10µM BA+5µM NAA.

Fig. 2. Invitro bulblets formation of second step of study. A: Control without hormone B: MS+10µM BA+5µM NAA.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل کلون و تنظیم‌کننده رشد گیاهی برای صفات باززایی گیاهچه و تولید سیرچه در کشت مریستم کلون‌های مختلف سیر استان همدان.

Table 5. Comparison means of the interaction between colon and plant growth regulator for plantlet regeneration and bulblet formation in meristem culture of different garlic clones in Hamedan Province.

کلون	تنظیم‌کننده رشد		وزن گیاه	تعداد سیرچه	وزن سیرچه	وزن ریشه	وزن برگ	کلون	تنظیم‌کننده رشد		وزن گیاه	تعداد سیرچه	وزن سیرچه	وزن ریشه	وزن برگ
Clon	Plant growth regulator (µm)		Plant weigth	Bulb number	Bulb weigth	Root weigth	Leaf weigth	Clon	Plant growth regulator (µm)		Plant weigth	Bulb number	Bulb weigth	Root weigth	Leaf weigth
	NAA	BA							NAA	BA					
علی آباد Aliabad	0	0	1.09^{e-q}	1.67^{h-j}	0.46^{h-m}	0.53^{m-p}	0.32^{n-p}	حیدره Heydareh	0	0	1.18^{q-t}	2.33^{f-j}	0.27^{l-m}	0.48^{n-p}	0.42^{m-p}
	1	0	2.70^{i-m}	2.00^{g-j}	0.68^{e-j}	1.26^{e-i}	0.88^{e-n}		1	0	1.23^{p-t}	2.67^{f-i}	0.34^{k-m}	0.49^{n-p}	0.40^{n-p}
	1	1	3.19^{f-k}	3.00^{e-h}	0.77^{e-h}	1.34^{e-h}	1.09^{d-j}		1	1	2.90^{h-l}	3.67^{e-f}	0.60^{f-k}	1.20^{e-j}	1.10^{d-i}
	5	10	3.38^{f-i}	3.33^{d-g}	0.87^{ef}	2.06^{a}	0.62^{h-p}		5	10	3.34^{f-i}	3.67^{e-f}	0.70^{e-j}	1.41^{d-h}	1.22^{d-f}
برفجین Barfejin	0	0	1.55^{o-t}	2.67^{f-i}	0.39^{j-m}	0.63^{k-p}	0.49^{k-p}	سولان Solan	0	0	1.76^{o-r}	1.33^{i-j}	0.29^{k-m}	1.05^{l-g}	0.71^{f-p}
	0	1	4.24^{cd}	2.33^{f-j}	0.96^{de}	1.75^{a-d}	1.54^{a-d}		0	1	2.60^{j-n}	1.67^{h-j}	0.51^{g-l}	1.11^{f-j}	0.98^{d-m}
	1	1	3.93^{c-e}	3.67^{c-f}	1.63^{b}	1.44^{e-h}	1.86^{ab}		1	1	3.91^{c-e}	3.33^{d-g}	0.75^{e-i}	1.62^{b-e}	1.54^{a-d}
	5	10	5.43^{*a}	4.00^{c-e}	2.03^{a}	1.38^{d-h}	1.92^{a}		5	10	4.57^{bc}	5.67^{a-b}	0.81^{e-g}	1.85^{a-c}	1.91^{a}
شورین Sheverin	0	0	1.78^{o-r}	1.76^{h-j}	0.53^{g-l}	0.80^{i-n}	0.46^{l-p}	مریانج Maryanaj	0	0	0.75^{t}	1.00^{j}	0.18^{m}	0.31^{op}	0.26^{op}
	0	1	2.62^{j-n}	2.00^{g-j}	0.77^{e-h}	1.48^{e-f}	0.54^{i-p}		0	1	0.85^{r-t}	3.33^{d-g}	0.43^{i-m}	0.23^{p}	0.19^{p}
	1	1	3.45^{e-h}	3.67^{c-f}	1.22^{cd}	1.22^{e-j}	1.01^{l-d}		1	1	1.59^{o-s}	4.00^{c-e}	0.48^{h-m}	0.58^{l-p}	0.53^{j-p}
	5	10	5.55^{a}	6.00^{a}	1.39^{bc}	2.12^{a}	2.05^{a}		5	10	2.73^{h-m}	4.33^{cd}	0.52^{g-l}	1.16^{f-j}	1.05^{d-k}
بهار Bahar	0	0	2.20^{m-p}	1.33^{i-j}	0.57^{f-l}	1.13^{f-j}	0.50^{k-p}	مویجین Moiejin	0	0	0.80^{st}	1.67^{h-j}	0.19^{m}	0.33^{o-p}	0.28^{op}
	0	1	2.14^{m-p}	1.67^{h-j}	0.68^{e-j}	0.76^{j-o}	0.65^{g-p}		0	1	3.01^{g-k}	2.00^{g-j}	0.53^{g-l}	1.29^{e-h}	1.20^{d-g}
	1	1	3.16^{f-k}	2.33^{f-j}	0.87^{ef}	1.46^{e-h}	1.12^{d-h}		1	1	3.24^{f-j}	6.00^{a}	0.88^{e-f}	1.26^{e-h}	1.22^{d-f}
	5	10	3.71^{d-f}	3.67^{c-f}	0.93^{de}	1.46^{e-h}	1.32^{e-e}		5	10	3.52^{d-g}	2.67^{f-i}	0.68^{e-j}	1.47^{c-h}	1.37^{b-e}
توسرکان Toserkan	0	0	0.97^{r-t}	1.67^{h-j}	0.25^{l-m}	0.41^{n-p}	0.31^{op}	تویجین Toiejin	0	0	0.85^{r-t}	1.33^{ij}	0.29^{k-m}	0.30^{op}	0.26^{op}
	0	1	2.46^{k-o}	2.33^{f-j}	0.68^{e-j}	0.96^{h-m}	0.82^{e-o}		0	1	1.22^{p-t}	4.33^{cd}	0.76^{e-h}	0.24^{p}	0.25^{op}
	1	1	3.01^{g-k}	2.33^{f-j}	0.75^{e-i}	1.10^{f-k}	1.06^{d-k}		1	1	1.96^{n-q}	5.67^{ab}	0.69^{e-j}	0.44^{n-p}	0.42^{m-p}
	5	10	5.02^{ab}	4.67^{bc}	1.00^{de}	1.93^{ab}	1.77^{a-c}		5	10	2.40^{l-o}	6.67^{a}	0.73^{e-i}	1.00^{l-g}	0.80^{e-o}

* میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Values with the same letter are not significantly different at probability level of 5% using Duncan Multiple Range.

منابع

1. Abedi, M., Nosrati, A.E. and Bayat, F. 2008. Selection on local garlic population of hamedan. Final research project report. Ministry of jihad-e-agriculture. Extention, Education and Research CRG. Seed and Plant Improvement Institute. Agricultural Engineering Research Institue. Project no: 100-12-20-81169. (In Persian)
2. Alizadeh, B., Royandazagh, S.D., Khawar, K.M. and Ozcan, S. 2013. Micro-propagation of garlic chives (*Allium tuberosum* rottl. Exsprang) using mesocotyl axis. J. Anim. Plant Sci. 23: 2. 543-549.
3. Anonymous. 1389. Agricultural statistics Hamedan province. Manage. Planning, Statistics and Planning Office Agric. Organization of Hamedan province. (In Persian)
4. FAO. 2016. Food and Agriculture Organization Of The United Nations. Statistics Division. Available On: *http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E*.
5. Ayuso, P. and Pena-Iglesias, A. 1981. The elimination of garlic viruses by thermotherapy and tissue culture. Cell Biol. Int. Rep. 9: 5. 835-836.
6. Bos, L. 1982. Viruses and virus diseases of Allium species. Acta Hortic. Rep. 127: 11-29.
7. Conci, V.C., Perotto, M.C., Cafrune, E. and Lunello, P. 2005. Program for Intensive Production of Virus-free Garlic Plants. Acta Hort. 688: 543-548.
8. Fritsch, R. and Friesen, N. 2002. Evaluation, domestication and taxonomy. In: Rabinovitch, H.D., Currach, R. (ed-itors), Allium Crop Science: Recent Adv. New York: CABI Publishing, Pp: 5-27.
9. Ghahramani Majd, H., Dashti, F., Piri, Kh. and Yari, M.B. 2010. Invitro bulblet formation of mooseer (*Allium hirtifolium*). Plant Prod. Technol. 9: 65-73. (In Persian)
10. Havel, L. and Novak, F.J. 1985. Meristem tip culture of *Allium cepa* L. Sci. Hort. 27: 209-214.
11. Matsubara, S. and Chen, D. 1989. In vitro production of garlic plants and field acclimatization. Hort. Sci. J. 24: 677-679.
12. Mohamad-Yasseen, Y., Splittoesser, W.E. and Litz, R.E. 1994. *In vitro* shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. Plant Cell Tiss. Org. 36: 243-247.
13. Moriconi, D.N., Conci, V.C. and Nome, S.F. 1990. Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) in vitro. Phyton. 51: 145-151.
14. Nagakubo, T., Takaichi, M. and Oeda, K. 1997. Micro-propagation of *Allium sativum* L. (Garlic). Biotechnol. Agric. Forest. 39: 1-19.
15. Park, C.H., Lee, M.S.,Choi, D.C., Lim, H.C., Kim, C.S., Chen, S.K., Park, K.H. and Choi, B.J. 1993. Effects of naphthalene acetic acid and sucrose on bulblet formation in floral and vegetation bad culture of garlic (*Allium sativum* L.). Korea. Soc. Hort. sci. 34: 248-256.
16. Robert, U., Zel, J. and Ravnikar, M. 1998. Thermotherapy in virus elimination from garlic: influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation *in vitro*. Sci. Hort. 73: 193-202.
17. Shahidul Haque, M., Wada, T. and Hattori, K. 2003. Shoot regeneration and bulblet formation from shoot and root meristem of garlic cv. Bangladesh Local Asian. J. Plant Sci. 2: 1. 23-27.
18. Tsonev, T.D., Lazova, G.N., Stoinova, Z.G. and Popova, L.P. 1998. A possible role for Jasmonic acidin adaptation of barley seedling to salinity stress. Plant Growth Regul. 17: 153-159.
19. Ucman, R., Jana, Z. and Maja, R. 1998. Termotherapy in virus elimination from garlic influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro. Sci. Hort. 73: 193-202.
20. Vargas, T.E., Mejias, A., Oropeza, M. and Garcia, E. 2004. Plant regeneration of *Anthurium andreanum* cv. Rubrun. Elec. J. Biotechnol. 7: 3. 10-11.
21. Verbeek, M., van Dijk, P. and van Well, P.M.A. 1995. Efficiency of eradication of four viruses from garlic (*Allium sativum*) by meristem-tip culture. Eur. J. Plant Pathol. 101: 231-932.

22. Walkey, D.G.A., Webb, M.J.W., Bolland, C.J. and Miller, A. 1987. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A.ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. J. Hort. Sci. 62: 211-220.

23. Zahedi, B., Masahebi, Gh., Zamani, Z. and Khashi, A. 2010. Elimination of Potyviruses from Two Commercial Iranian Garlic (*Allium sativum* L.) Populations through Thermotherapy and by Meristem Tip Culture. Iran. J. P. P. Sci. ISSN 2008-4781. 41: 342-345. (In Persian)