مطالعه گل‌دهی و باروری دانه گرده در هم‌گروه‌های سیر ایرانی

احمدرضا عباسی‌فر[۱]، فرشاد دشتی[۲*] و عبدالکریم چهرگانی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۱۴)

چکیده

سیر (*Allium sativum* L.) به‌دلیل عقیم بودن، توانایی تولید بذر را ندارد. جهت مطالعه گل‌دهی و تعیین باروری دانه گرده، تعداد ۶۸ هم‌گروه سیر از نقاط مختلف ایران جمع‌آوری و در سال‌های زراعی ۹۰-۱۳۸۹ و ۹۱-۱۳۹۰ در مزرعه تحقیقاتی گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه همدان مورد بررسی قرار گرفتند. برای تشخیص باروری گرده در هم‌گروه‌های سیر ایرانی از نشانگر اختصاصی RAPD، آزمون جوانه‌زنی دانه گرده، تشخیص زنده بودن گرده توسط استوکارمین و کاشت میوه و کیسه جنینی در محیط‌های کاشت مصنوعی استفاده گردید. نتایج نشان داد تعداد ۳۷ هم‌گروه سیر ایرانی توانایی ایجاد ساقه گل‌دهنده و تولید گل‌آذین را داشتند. رنگ پذیری دانه‌های گرده با استفاده از استوکارمین در محدوده‌ای بین حداقل ۰/۵ تا حداکثر ۲۰ درصد قرار گرفت که نشانگر عدم زنده بودن دانه‌های گرده می‌باشد. عدم تشکیل دو نشانگر ویژه $OPJ12_{1300}$ و $OPJ12_{1700}$ در همه هم‌گروه‌ها و عدم رشد دانه گرده در محیط کشت، عقیمی دانه گرده را در هم‌گروه‌های سیر ایرانی به‌کار رفته در این آزمایش ثابت نمود. زنده ماندن میوه و کیسه جنینی به‌مدت بیش از دو ماه در محیط کشت، می‌تواند نشان‌دهنده سلامت و توانایی آنها برای انجام لقاح با دانه گرده زایا باشد.

واژه‌های کلیدی: استوکارمین، عقیمی، گرده‌های نابارور، نشانگر، RPAD

۱ و ۲. به‌ترتیب دانشجوی سابق دکتری و دانشیار علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

۳. استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: dashti1350@yahoo.com

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-07-25]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.15.13.2]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.15.143]

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-07-25]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.15.13.2]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.15.143]

مقدمه

فلات ایران از مهم‌ترین مراکز تنوع گیاهی برای خانواده پیازی‌ها (Alliaceae) و به‌ویژه سیر محسوب می‌شود (۲۴). بر اساس آخرین آمار منتشر شده توسط فائو (۱۰)، ایران از جمله کشورهای مطرح در تولید سیر بوده و مقام نوزدهم تولید سیر را در دنیا دارد. اگرچه هم‌گروه‌های سیر از نظر صفت گل‌دهی، به گل‌ده کامل، گل‌ده ناقص و غیر گل‌ده طبقه‌بندی می‌شوند (۲۰ و ۳۲)، ولی امروزه تکثیر آن به‌طور کامل به‌صورت غیر جنسی صورت می‌پذیرد (۲۰ و ۳۱). پولر (۲۸)، تقریباً همه هم‌گروه‌های سیر آسیای مرکزی آزمایش شده را بارور تشخیص داد. سیر یک گیاه عقیم می‌باشد و دلایل عقیمی آن به تخریب تاپتوم (۲٦)، بیماری‌های ایجاد شده به‌وسیله موجودات زنده مثل باکتری‌های رایکتسی (Rickettsia) ، میکوپلاسما و یا ویروس‌ها (۲۱)، حذف کروموزومی (٦) و رقابت برای مواد غذایی بین گل و سیرچه‌های هوایی در گل‌آذین در حال نمو (۲۳)، نسبت داده شده است. اخیراً شمش (۳۰) سه نوع عقیمی کامل، نر عقیمی و نر عقیمی القاء شده توسط شرایط محیطی را در سیر گزارش نمود.

در انواع سیر گل‌ده، یک تعادل یا رقابت بین اندام‌های ذخیره‌ای و گل‌ها برحسب نمو نسبی و تخصیص منابع وجود دارد (۲۷، ۲۸ و ۲۹). گل‌های درحال نمو برای به‌دست آوردن مواد فتوسنتزی، توان رقابتی نسبتاً ضعیفی با سیرچه‌های هوایی در حال رشد دارند و در بسیاری از موارد، این رقابت منجر به سقط گل می‌شود. رشد سیرچه‌های هوایی، گل‌های جوان را فشرده و له کرده و در نتیجه باعث تخریب آنها می‌شود. بنابراین، از بین بردن مداوم سیرچه‌های هوایی می‌تواند به گل‌دهی، گرده افشانی و تولید بذر طبیعی منتج شود (۳، ۵، ۸، ۱۸، ۲۰ و ۲۹). کونویکا (۲۲)، پولر و سیمون (۲۹) این نظریه را تکمیل کرده و اعلام داشتند که گل‌های در حال نمو، رقابت ضعیفی نیز با سوخ زیرزمینی سیر دارند و لذا گیاهان سیر را درست از بالای ساقه کاذب و قبل از طویل شدن کامل ساقه گل‌دهنده، سربرداری کردند. سپس ساقه‌های بریده شده را برای گرده افشانی و نمو بذر، در ظرف‌های آب قرار دادند. این امر توانست به‌طور معنی‌داری تشکیل بذر را در گل آذین افزایش دهد.

تولید بذر جنسی سیر توسط محققین زیادی گزارش شده است (اتو و همکاران (۸)، اتو (۵، ٦ و ۷)، اینابا و همکاران (۱۷)، هانگ و اتو (۱۲)، هانگ و همکاران (۱۴)، اتو و سیمون (۹)، جندرک (۱۸)). امید بخش‌ترین گل‌ها برای تولید موفقیت‌آمیز بذر، معمولاً بساک‌های رنگی (ارغوانی یا قرمز) داشته و نر بارور هستند (۵، ۸، ۱۲، ۲۲ و ۲۹). اگرچه بعضی از گیاهان سیر نر بارور، بساک‌های زرد داشته و می‌توانند بذر نیز تولید نمایند (۱۸ و ۲۹).

برای کمک به انتخاب نر باروری در سیر، نشانگر مولکولی اختصاصی شناسایی شده است. اتو (٦)، هانگ و همکاران (۱۳) با استفاده از آغازگر OPJ12، دو باند ۱۳۰۰ و ۱۷۰۰ جفت بازی مربوط به باروری گرده را در ۳۱ هم‌گروه گرده بارور شناسایی کردند. درحالی‌که ۲۹ هم‌گروه گرده عقیم از ٦۰ هم‌گروه انتخابی، این دو باند را نشان ندادند. هانگ و همکاران (۱۴)، ۳۰ هم‌گروه جمع‌آوری شده از اسپانیا و پرتغال را با استفاده از این دو نشانگر برای تعیین گرده باروری مورد مقایسه قرار دادند. ۲۹ هم‌گروه از سیرهای گل‌ده و یک هم‌گروه از سیرهای غیر گل‌ده انتخاب شده بودند. هانگ با استفاده از این نشانگر، همه این ۳۰ هم‌گروه را عقیم تشخیص داد.

عدم امکان تکثیر جنسی در سیر، انجام روش‌های اصلاحی نظیر تلاقی درون و بین گونه‌ای را برای این محصول مهم غیر ممکن ساخته است. عدم تشکیل گرده در بساک و یا تولید گرده‌های نابارور از دلایل عقیمی سیر است. اولین گام در راه رفع این مشکل، شناسایی کلون‌های گل‌دهنده و بارور می‌باشد. به‌دلیل نزدیکی ایران به مرکز اصلی پیدایش سیر و دارا بودن ژرم پلاسم متنوع و غنی، می‌توان انتظار داشت که با انجام آزمایش‌های پایه‌ای و با یک برنامه چند ساله موفق به تولید بذر سیر ایرانی شد. هدف از این تحقیق، مطالعه گل‌دهی و تعیین هم‌گروه‌های گرده بارور در سیرهای ایرانی، به‌ویژه قبل از

گل‌دهی می‌باشد تا از این طریق بتوان هم‌گروه‌هایی را شناسایی و انتخاب نمود که در آینده به‌عنوان گرده‌زا برای تولید بذر سیر از آنها استفاده شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در تابستان ۱۳۸۹ تعداد ۴۰ هم‌گروه سیر از نقاط مختلف کشور تهیه و ضمن بررسی پتانسیل گل‌دهی، مراحل گل‌دهی و نحوه حذف سیرچه‌های هوایی در هم‌گروه‌های گل‌ده مورد مطالعه قرار گرفت. در تابستان ۱۳۹۰ مجدداً ۲۸ هم‌گروه جمع‌آوری و به‌همراه ۱۱ هم‌گروه منتخب از آزمایش مقدماتی سال قبل و یک نمونه از سیر غیر گل‌ده همدان به‌عنوان شاهد (در مجموع ۴۰ هم‌گروه) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در هر دو سال آزمایش، هم‌گروه‌های سیر مورد بررسی عمدتاً از نوار شمالی و شرقی کشور که شرایط اولیه برای ورود به مرحله گل‌دهی را داشته و به مبداء سیر یعنی ناحیه آسیای مرکزی نیز نزدیک بودند، جمع‌آوری شدند. مشخصات هم‌گروه‌های کاشته شده در سال‌های زراعی ۹۰ – ۱۳۸۹ و ۹۱ – ۱۳۹۰ در جدول ۱ درج گردیده است.

کاشت و گرده افشانی

هر یک از هم‌گروهای آزمایشی در پنج خط ۱۳۰ سانتی‌متری و با فواصل ۲۰ × ۱۰ سانتی‌متری در مزرعه تحقیقاتی گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا (با مشخصات جغرافیایی ″47 ′47 °34 :N ، ″40 ′28 °48 :E) و در اواخر مهرماه کشت شدند. در دهه اول خرداد، پس از نمایان شدن ساقه‌های گل‌دهنده و زمانی که قطر سیرچه‌های هوایی حدود دو الی پنج میلی‌متر بودند، اسپات گل آذین‌ها با دست باز گردید و همه سیرچه‌های هوایی قابل مشاهده حذف شدند. شروع حذف سیرچه‌های هوایی دهم خرداد و مراحل بعدی بسته به نوع هم‌گروه به فواصل تقریبی پنج تا هفت روز یک‌بار و به‌طور میانگین بین چهار تا هفت مرحله انجام شد. هم‌چنین برای جلوگیری از رقابت گل‌های در حال رشد با سوخ‌های زمینی، پس از اولین مراحل حذف سیرچه‌های هوایی، نسبت به قطع ساقه‌های گل‌دهنده از بوته اقدام گردید. برای استمرار رشد و حفظ گل‌ها، ساقه‌های گل‌دهنده به محیط گلخانه کولردار با حداکثر دمای حدود ۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و در بطری‌های محتوی آب قرار داده شدند (سیمون و جندرک ۲۰۰۳). برای انجام گرده افشانی، بساک‌ها بصورت دستی از گل‌های مختلف تهیه و پس از خشک شدن، مخلوط آنها خرد شده و پس از تهیه گرده به مقدار لازم، گرده افشانی به‌صورت دستی در تاریخ‌های ۲۶ و ۲۹ تیر، یکم ، چهارم و دهم مرداد انجام گردید.

انجام واکنش RAPD

استخراج دی‌ان‌ای به‌روش مورای و تامپسون (۱۹۸۰) انجام شد. کمیت و کیفیت دی‌ان‌ای به‌روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز دی‌ان‌ای بر روی ژل آگارز با غلظت یک درصد مشخص گردید.

واکنش پی‌سی‌آر در حجم ۲۵ میکرولیتر و به‌روش ویلیام و همکاران (۱۹۹۰) انجام شد که شامل ۲۰ نانوگرم دی‌ان‌ای ژنومی، یک برابر غلظت بافر پی‌سی‌آر، دو و نیم میلی‌مولار کلرید منیزیم، دو دهم میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدها، دو دهم میکرومولار از آغازگر و یک واحد آنزیم تک دی‌ان‌ای پلیمراز انجام گردید. برای جلوگیری از تبخیر احتمالی محلول پی‌سی‌آر، مقدار ۱۰ میکرولیتر از روغن معدنی نیز به آرامی به تیوپ محلول پی‌سی‌آر اضافه گردید. برای تعیین باروری گرده در هم‌گروه‌های سیر مورد نظر از آغازگر OPJ12 (5′GTCCCGTGGT-3′) استفاده شد (۶، ۱۴ و ۱۳).

به‌منظور تعیین بهترین دما جهت مرحله اتصال پی‌سی‌آر، گرادیان دمایی از ۳۷ تا ۴۱ درجه سانتی‌گراد با فواصل یک درجه و با دی‌ان‌ای دو هم‌گروه سیر گل‌ده اعمال گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر بیورد (Bio-Rad) انجام گرفت. تکثیر تحت شرایط واسرشت‌سازی

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-07-25]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.15.13.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.15.143]

اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه و ۴۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، توسعه آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه و به‌دنبال آن توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه صورت پذیرفت (۱۳).

الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر روی ژل آگارز یک درصد در تی‌بی‌ئی یک برابر غلظت به‌مدت ۱۵۰ دقیقه در ۵۰ ولت صورت گرفت. رنگ آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید به غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر و به‌مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. سپس باندها در دستگاه ژل‌داکیومنت (مدل Transilluminator) و زیر نور ماوراء بنفش نمایان و از آنها عکس گرفته شد.

آزمون جوانه‌زنی گرده

برای تهیه دانه گرده ابتدا بساک‌های رسیده توده‌های مختلف به آرامی از گل جدا و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اطاق روی کاغذ صافی و در محیط خشک قرار داده شدند. پس از خشک شدن، بساک‌ها در بوته چینی و به آرامی خرد و گرده‌ها جمع‌آوری شدند. آزمون جوانه‌زنی دانه گرده روی محیط کاشت حاوی ۱۵ درصد ساکاروز، یک درصد آگار و هم‌چنین ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسید بوریک، ۳۰۰ پی‌پی‌ام نیترات کلسیم، ۲۰۰ پی‌پی‌ام سولفات منیزیم، ۱۰۰ پی‌پی‌ام نیترات پتاسیم و ۱۰ پی‌پی‌ام تتراسایکلین صورت گرفت (۱، ۱۳ و ۱۴).

آزمون تعیین سلامت گرده با استفاده از استوکارمین

سلامت گرده هم‌گروه‌های سیر مورد آزمایش با استفاده از آزمون استوکارمین ارزیابی گردیدند. برای این منظور بساک‌های که در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند پس از خروج از فریزر در هوای آزاد خشک شدند. سپس بساک‌ها بر روی لام قرار داده شده و به آرامی پاره گردیدند تا گرده‌ها از آنها خارج شوند. یک قطره استوکارمین بر روی گرده‌ها ریخته شده و پس از قرار دادن لامل روی آنها، به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. با استفاده از فتومیکروسکوپ (ZEISS مدل AXIOSTAR) مجهز به دوربین (کانن مدل G11- power shot)، دانه‌های گرده مشاهده و عکس‌برداری صورت گرفت. تعداد کل گرده‌ها و گرده‌های رنگ گرفته شمارش و درصد گرده‌های سالم محاسبه گردید. دانه‌های گرده پر و خوب رنگ گرفته، به‌عنوان گرده بارور و دانه‌های گرده خالی و رنگ نگرفته، به‌عنوان گرده عقیم در نظر گرفته شدند (۲).

آزمون کاشت میوه و کیسه جنینی

بعد از رشد اولیه میوه‌ها و با هدف تأمین مواد غذایی جهت ادامه رشد آنها، در تاریخ ۱۱ مرداد تعدادی از میوه‌ها از گل آذین جدا و در محیط کاشت موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog) کشت گردیدند. علاوه بر محیط کاشت پایه، برای بررسی بیشتر تأثیر مواد غذایی بر رشد و نمو میوه‌های جدا شده از گل آذین، اسید آبسسیک به‌میزان یک میلی‌گرم در لیتر و نفتالن استیک اسید به‌میزان نیم میلی‌گرم در لیتر به‌عنوان دو تیمار جداگانه به محیط کاشت پایه اضافه گردید. در تاریخ ۱۳ شهریور نسبت به واکاری نمونه‌های میوه پلاسیده نشده، سالم و سبز و انتقال آنها به محیط کاشت جدید، اقدام شد. هم‌زمان با این اقدام، تعدادی از میوه‌های تولید شده بر روی ساقه گل‌دهنده و با قرار دادن در بطری‌های حاوی آب معمولی، به‌عنوان شاهد مورد مقایسه قرار گرفتند.

علاوه بر این، برای حصول اطمینان از انجام مراحل تلقیح، تعدادی از کیسه‌های جنینی تشکیل‌شده از هم‌گروه‌هایی که موفق به تولید میوه شدند، با دقت از میوه‌ها جدا و در محیط کاشت ذکر شده در بالا کشت گردیدند.

نتایج

توانایی گل‌دهی

همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در سال زراعی ۹۰

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-07-25]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.15.13.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.15.143]

– ۱۳۸۹ هم‌گروه‌های محلی لنگرود، چینی زابل، پائین نقب بابلسر، جویبار شمال، محلی سیستان، رمدان گلوگاه، لشت نشاء، مازند زابل، آستانه اشرفیه، نجکش بهشهر، طارم زنجان، مازندران، تبریز، یزد، اراک – مازندران، گلپایگان و پلاستیک زرد همگی گل‌ده و بقیه هم‌گروه‌ها غیر گل‌ده بودند. در سال زراعی ۹۱ – ۱۳۹۰ هم‌گروه‌های سیر تفرش، حیدره همدان و رفسنجان به‌عنوان سیرهای غیر گل‌ده شناسایی شدند. هم‌گروه‌های سیر گرگان، طارم تنکابن، آذرشهر تالش، لنگرود۲، جویبار، رمدان گلوگاه، پائین نقب بابلسر، فیروزکوه، بابلسر، نکا، پاک پیاده لنگرود و آذرشهر رضوانشهر سیرهای گل‌دهنده‌ای بودند که در مراحل گل‌دهی، گل آنها از بین رفت و یا در گل‌آذین آنها فقط سیرچه‌های هوایی تشکیل شد. سایر هم‌گروه‌های مورد بررسی همگی گل‌ده کامل بوده، ساقه گل‌دهنده تشکیل و مراحل تکامل گل در گل‌آذین آنها انجام گردید. مراحل تشکیل و تکامل گل و میوه در شکل ۱ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از آزمون رنگ‌آمیزی گرده با استوکارمین

نتایج بررسی باروری گرده به‌روش رنگ‌آمیزی با استوکارمین نشان داد که هم‌گروهای فریدونکنار، محلی سیستان، طارم زنجان، چینی زابل، گمرک ۲، آستانه اشرفیه، نجکش بهشهر و طارم تالش دارای گرده‌های رنگ گرفته بودند، ولی درصد آنها خیلی کم بود. به‌طوری‌که حداکثر گرده رنگ گرفته متعلق به هم‌گروه طارم زنجان با ۲۰ درصد و حداقل آن مربوط به هم‌گروه‌های محلی سیستان، چینی زابل و آستانه اشرفیه با نیم درصد بود (شکل A ۲).

نتایج حاصل از آزمون جوانه‌زنی گرده

از بین هم‌گروه‌های سیر مورد آزمایش، فقط تهیه گرده از هم‌گروهای فریدونکنار، محلی سیستان، طارم زنجان، چینی زابل، گمرک ۲، آستانه اشرفیه، نجکش بهشهر و طارم تالش ممکن گردید. این هم‌گروه‌ها مراحل تکامل گل را طی نموده و اندام‌های جنسی را نیز تولید کردند. اگر چه از تعداد هم‌گروه‌های بیشتری امکان تهیه میوه فراهم گردید. پس از کاشت گرده این هم‌گروه‌ها و با گذشت ۲۴ و حتی ۴۸ ساعت از کشت گرده در محیط کشت درون شیشه‌ای، جوانه‌زنی دانه‌های گرده مشاهده نگردید و فقط تعداد کمی از گرده‌ها متورم شده بودند (شکل B ۲).

نتایج حاصل از آزمون کاشت میوه در محیط کشت

از بین هم‌گروه‌های منتخب، هم‌گروه‌های چینی زابل، فریدونکنار، تازه آباد تالش، آستانه اشرفیه، طارم تالش و لشت نشاء ۱ موفق به تولید میوه‌های مناسب‌تر، سالم و به تعداد بیشتری شدند. هم‌گروه‌های محلی سیستان، مازند زابل، قائم شهر۱، گمرک ۲، نجکش بهشهر، ییلاق رضوانشهر، کیاکلا و طارم لنگرود نیز موفق به تولید میوه ولی به تعداد کمتر و با کیفیت پائین‌تری گردیدند. علی‌رغم سلامتی و شادابی میوه‌ها به‌خصوص در گروه اول، میوه‌های کاشته شده به‌طور میانگین پس از گذشت حدود یک ماه از کاشت درون شیشه‌ای و علی‌رغم تأمین مواد غذایی، شروع به زرد شدن و از بین رفتن نمودند (شکل C ۲ و D ۲). بیشترین طول عمر میوه در محیط کاشت درون شیشه‌ای با بیش از دو ماه مربوط به هم‌گروه فریدونکنار بود. کمترین طول عمر میوه در محیط کاشت درون شیشه‌ای با ۲۵ روز مربوط به هم‌گروه طارم تالش بود. طول عمر بقیه هم‌گروه‌های کاشته شده در محیط کاشت درون شیشه‌ای، به‌طور میانگین ۴۵ روز بود. در مقایسه با میوه‌های رشد یافته بر روی ساقه گل‌دهنده‌ای که در بطری‌های آب قرار داشتند، میوه‌های قرار داده شده در محیط کاشت درون شیشه‌ای به‌طور میانگین بین یک تا یک و نیم ماه طول عمر بیشتری را داشتند.

نتایج حاصل از آزمون کاشت کیسه جنینی در محیط کشت

هیچ‌یک از کیسه‌های جنینی کاشته شده از هم‌گروه‌های مختلف در هر دو تیمار، علی‌رغم زنده ماندن به مدت سه ماه و آلوده نشدن در محیط کاشت، عکس‌العمل و رشدی را نشان ندادند

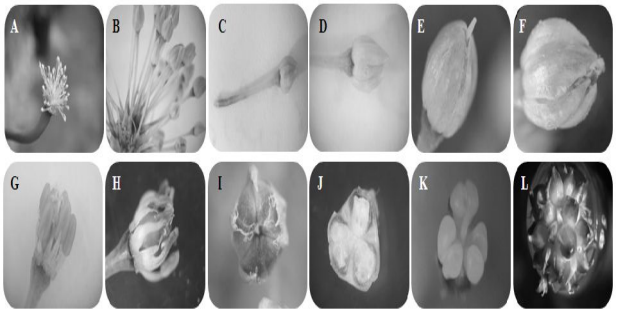
[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-07-25]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.15.13.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.15.143]

جدول ۱. مشخصات هم‌گروه‌های سیر جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران

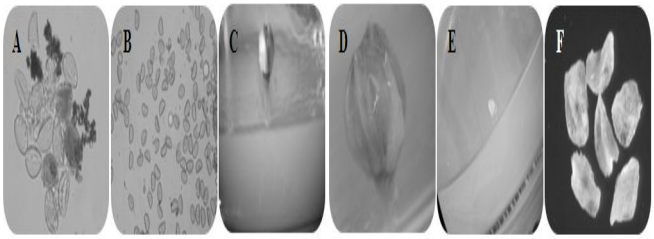
ردیف	سال زراعی ۹۰ - ۱۳۸۹		سال زراعی ۹۱ - ۱۳۹۰				
	نام هم‌گروه	وضعیت گل‌دهی	نام هم‌گروه	وضعیت گل‌دهی	تولید گرده	تشکیل میوه و کیسه جنینی	تعداد ساقه گل‌دهنده حاوی گل	متوسط تعداد گل در چتر
۱	محلی لنگرود	گل‌ده	طارم تالش	گل‌ده کامل	*	*	٦	۴۰
۲	چینی زابل	گل‌ده	مازند زابل	گل‌ده کامل		*	۱۳	۳۵
۳	پائین نقب بابلسر	گل‌ده	قائم شهر ۱	گل‌ده کامل		*	۲۴	۲۴
۴	جویبار شمال	گل‌ده	گرگان	گل‌ده کامل			۱	#
۵	محلی سیستان	گل‌ده	لاهیجان	گل‌ده کامل			۵	۲۷
٦	رمدان گلوگاه	گل‌ده	کردکوی	گل‌ده کامل			۵	۲۲
۷	لشت نشاء	گل‌ده	گمرگ ۲	گل‌ده کامل	*	*	۲۱	۲۸
۸	مازند زابل	گل‌ده	قلعه گردن تنکابن	گل‌ده کامل			۱۰	۴
۹	آستانه اشرفیه	گل‌ده	طارم تنکابن	گل‌ده کامل			۱	#
۱۰	نجکش بهشهر	گل‌ده	آذر شهر تالش	گل‌ده کامل			۵	#
۱۱	طارم زنجان	گل‌ده	فریدونکنار	گل‌ده کامل	*	*	۱۱	۲۳
۱۲	مازندران	گل‌ده	طارم زنجان	گل‌ده کامل	*		۲	۹۰
۱۳	تبریز	گل‌ده	رشت	گل‌ده کامل			۱۱	۱۸
۱۴	یزد	گل‌ده	تبریز آستانه اشرفیه	گل‌ده کامل			۷	۱۶
۱۵	اراک - مازندران	گل‌ده	محلی سیستان	گل‌ده کامل	*	*	۱۰	۱۷
۱٦	گلپایگان	گل‌ده	لشت نشاء ۱	گل‌ده کامل		*	۵	۵۰
۱۷	تنکابن	گل‌ده	لنگرود ۲	گل‌ده کامل			۱	#
۱۸	موئین	غیر گل‌ده	ییلاق رضوانشهر	گل‌ده کامل		*	۸	۱۷
۱۹	مریانج	غیر گل‌ده	رمدان گلوگاه	گل‌ده کامل			۱	#
۲۰	حیدره	غیر گل‌ده	کلار آباد	گل‌ده کامل			۹	۴۲
۲۱	شورین	غیر گل‌ده	نجکش بهشهر	گل‌ده کامل	*	*	۸	۳۴
۲۲	الموت قزوین۲	غیر گل‌ده	جویبار	گل‌ده کامل			۴	#
۲۳	توئین	غیر گل‌ده	کیاکلا	گل‌ده کامل		*	۱۷	۱۸
۲۴	سولان	غیر گل‌ده	چینی زابل	گل‌ده کامل	*	*	۹	۵۱
۲۵	مشهد۱	غیر گل‌ده	تازه آباد تالش	گل‌ده کامل		*	۱	۳۶
۲٦	تربت جام	غیر گل‌ده	گمرک ۱	گل‌ده کامل			۵	۵
۲۷	برفجین	غیر گل‌ده	پائین نقب بابلسر	گل‌ده کامل			۷	#
۲۸	ژاپنی	غیر گل‌ده	طارم لنگرود	گل‌ده کامل		*	۱۱	۴۱
۲۹	بهار	غیر گل‌ده	آستانه اشرفیه	گل‌ده کامل	*	*	۱۱	۶۳
۳۰	تویسرکان	غیر گل‌ده	قائم شهر ۲	گل‌ده کامل			۵	۱
۳۱	علی آباد همدان	غیر گل‌ده	لشت نشاء ۲	گل‌ده کامل			۷	۸
۳۲	شیروان	غیر گل‌ده	فیروزکوه	گل‌ده کامل			۳	#
۳۳	اهواز	غیر گل‌ده	بابلسر	گل‌ده کامل			۵	#
۳۴	قاین	غیر گل‌ده	نکا	گل‌ده کامل			۵	#
۳۵	کاشمر	غیر گل‌ده	پاک پیاده لنگرود	گل‌ده کامل			۱	#
۳٦	طبس	غیر گل‌ده	آذر شهر رضوانشهر	گل‌ده کامل			٦	#
۳۷	مشهد ۲	غیر گل‌ده	لنگرود ۱	گل‌ده کامل			۱	#
۳۸	قزوین همدان ۲	غیر گل‌ده	تفرش	غیر گل‌ده			-	-
۳۹	قزوین همدان ۱	غیر گل‌ده	حیدره همدان	غیر گل‌ده			-	-
۴۰	الموت قزوین ۱	غیر گل‌ده	رفسنجان	غیر گل‌ده			-	-

#: سیرهای گل‌دهنده‌ای که در مراحل گل‌دهی، گل آنها از بین رفته و یا در گل‌آذین آنها، فقط سیرچه‌های هوایی تشکیل شده‌است.

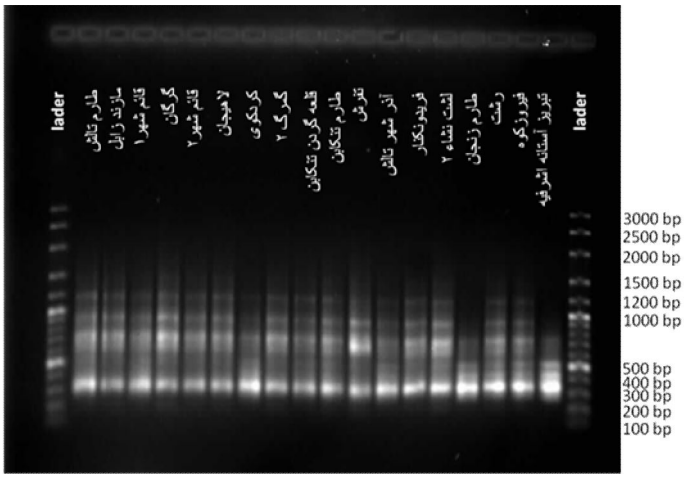
[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-07-25]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.15.13.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.15.143]



شکل ۱. مراحل تشکیل گل و میوه در هم‌گروه‌های سیر گل‌ده



شکل ۲. نتایج آزمون‌های مختلف تشخیص زنده بودن دانه گرده، کاشت کیسه جنینی و میوه



شکل۳. الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر واکنش رپید ۱۸ هم‌گروه سیر با استفاده از آغازگر OPJ12

A: گل آذین اولیه پس از حذف سیرچه‌های هوایی. B: گل آذین در مرحله قبل از رسیدن بساک‌ها. C، D و E: مراحل رشد و تکامل تک گل. F: گل کاملاً رسیده. G: پرچم‌ها قبل از رسیدن. H: رشد تخمدان و بساک‌های رسیده. I: میوه تشکیل شده درمراحل اولیه. J: برش عرضی میوه و تشکیل کیسه‌های جنینی. K: کیسه‌های جنینی تشکیل شده درون تخمدان. L: تشکیل فقط سیرچه‌های هوایی در گل آذینA: رنگ‌آمیزی گرده با استفاده از استوکارمین B: کاشت گرده در محیط کشت C: میوه کاشته شده در محیط کاشت درون شیشه‌ای بعد از قطع از ساقه گل‌دهنده D: میوه کاشته شده دو ماه بعد از کاشت در محیط درون شیشه-ای E: کیسه‌های جنینی کاشته شده در محیط درون شیشه‌ای سه ماه پس از کاشت. F : کیسه‌های جنینی رشد یافته درون تخمدان میوه‌ها که به بذر تبدیل نشدند.

نتیجه با نتایج حاصل از آزمون جوانه‌زنی و آزمون استوکارمین نیز مطابقت دارد.

نتایج حاصل از نشانگر رپید

نتایج حاصل از واکنش رپید توسط آغازگر OPJ12 نشان داد که هیچ کدام از توده‌های سیر ایرانی به‌کار رفته در آزمایش، دو نشانگر ویژه $OPJ12_{1300}$ و $OPJ12_{1700}$ را تشکیل ندادند و این بدان معنی است که هیچ کدام از هم‌گروه‌های سیر ایرانی به‌کار رفته در این تحقیق، دارای گرده بارور نیستند (شکل ۳). دی‌ان‌ای هم‌گروه‌های سیر به‌وسیله این آغازگر، در محدوده ۳۰۰ و ۷۰۰ جفت باز، باند تشکیل دادند. تقریباً چهار عدد باند مشترک در همه هم‌گروه‌ها مشاهده شد.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-07-25]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.15.13.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.15.143]

بحث

شناسایی توانائی گل‌دهی هم‌گروه‌های سیر ایرانی، گام اول برای تولید بذر می‌باشد. بر اساس اطلاعات مندرج در جدول ۱ در هر دو سال آزمایش و در شرایط یکسان، تعدادی از هم‌گروه‌ها توانایی ورود به مرحله گل‌دهی را داشتند. این نتیجه منطبق بر تحقیقات ماتیو (۲۴) است که عنوان نمود، بسیاری از ژنوتیپ‌های سیر با قرار گرفتن در شرایط محیطی مناسب، وادار به گل‌دهی می شوند. در هم‌گروه‌های گل‌ده، گل‌ها در مراحل (شکل E ۲). هم‌چنین هیچ‌گونه تفاوتی نیز بین کیسه‌های جنینی کاشته شده در بین هم‌گروه‌های مختلف مشاهده نگردید. این اولیه گل‌دهی از رشد و نمو مناسبی برخوردار بودند. اندام‌های جنسی در گل به‌خوبی تشکیل شدند. ولی در ادامه، پرچم‌ها قبل از تکامل، باز شدن بساک و آزادسازی گرده و گرده افشانی، از بین رفتند (شکل ۱G و ۱H). اما تخمدان‌ها و کیسه‌های جنینی درون آن همگی سالم بوده و تا مدت‌ها نیز، چه در محیط کاشت درون شیشه‌ای و چه در بطری‌های آب سالم باقی ماندند (شکل ۱I، ۱J و ۱K). همان‌گونه که اتو (۸)، اتو و همکاران (۷)، پولر و سیمون (۲۹)، هانگ و اتو (۱۲)، هانگ و همکاران (۱۴) اعلام داشتند، در برخی از هم‌گروه‌های سیر، بافت تولید اسپور نمی‌تواند به میوز وارد شود، ولی در بعضی از هم‌گروه‌ها میکروسپروجنسیس (مراحل تولید گرده) کامل بوده، امّا سپس میکروسپورها (گرده‌ها) در مرحله تتراد یا بعد از آن از بین می‌روند. مشاهدات میکروسکوپی شمش (۳۰) نشان داد که در بعضی از سیرهای عقیم، دانه‌های گرده در داخل بساک و قبل از انتشار تخریب می‌شوند. احتمالاً علت عقیمی گرده در هم‌گروه‌های سیر مورد آزمایش، نیز می‌تواند از بین رفتن گرده‌ها در مرحله تتراد یا بعد از آن باشد.

در تحقیق حاضر، میزان رنگ‌پذیری دانه‌های گرده با استوکارمین بین نیم تا ۲۰ درصد متغیر بود. اگرچه رنگ‌پذیری به معنای زنده بودن دانه گرده می‌باشد، ولی مسلماً میزان پائین آن تأثیری در باروری نداشته و نمی‌تواند یک لقاح مناسب را تأمین نماید. در آزمایشات محققین دیگر قابلیت رنگ‌پذیری و جوانه‌زنی گرده به‌طور گسترده‌ای در بین هم‌گروه‌های سیر متفاوت بوده و اساساً میزان جوانه‌زنی گرده کمتر از قابلیت رنگ‌پذیری آنها گزارش شده است. برای مثال هانگ و اتو (۱۲) و جندراک و هانان (۱۹) قابلیت رنگ‌پذیری صفر تا ۹۸/۳ درصد را مشاهده کردند. درحالی‌که این محققین میزان جوانه‌زنی دانه‌های گرده را هفت دهم تا ۴۹/۷ درصد گزارش نمودند. سیمون و جندرک (۳۱)، مقدار گرده رنگ پذیر را در بساک‌های زرد ۶۸/۶ درصد ولی میزان جوانه‌زنی گرده را ۳۰/۱ درصد اعلام نموده‌اند. پولر و سیمون (۲۹) جوانه‌زنی دانه گرده را خیلی کم (از صفر تا ۱۰/۵ درصد) و اعلام نمودند، در بیشتر کولتیوارهای اروپایی، مطالعه میکروگامتوژنسیس حاکی از تخریب میکروسپور قبل یا در مرحله تتراد می‌باشد و یا این‌که دانه‌های گرده خالی بوده و با استوکارمین رنگ نگرفتند. اتو (۴)، گوری و فری (۱۱)، تخریب میکروسپور را در هنگام نمو دانه‌های گرده، بین مراحل تتراد و تولید میکروسپور به‌همراه تخریب بساک در بسیاری از هم‌گروه‌های عقیم سیر اعلام نمودند. هم‌چنین اتو (۶) مهم‌ترین دلیل اساسی عقیمی را در سیر، حذف کروموزومی عنوان کرد. این فرضیه به‌صورت مکرر در تترادها یا میکروسپورهای هم‌گروه‌های عقیم مشاهده شده است. شمش (۳۰) مقدار جوانه‌زنی دانه‌های گرده را در انواع سیر عقیم، کمتر از پنج درصد گزارش نمود، درحالی‌که اندام ماده این گل‌ها را بارور تشخیص داد. از مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققین، می‌توان رنگ پذیری دانه‌های گرده به‌میزان خیلی کم و عدم جوانه‌زنی آنها را، به‌دلیل ناباروری و از بین رفتن دانه‌های گرده قبل از شکوفایی بساک دانست.

دلیل اصلی عدم تبدیل کیسه‌های جنینی کاشته شده در محیط کاشت درون شیشه‌ای به جنین زیست‌پذیر، عدم لقاح موفق می‌باشد. پولر و سیمون (۲۹) از طریق کاشت تخمک، موفق به تولید جنین زیست پذیر نشدند و اعلام نمودند مشخص نیست که عامل این عدم موفقیت شرایط محیط کاشت است یا عدم لقاح. نتایج سایر آزمون‌های انجام شده در این

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-07-25]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.15.13.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.15.143]

تحقیق (استفاده از نشانگر، جوانه‌زنی گرده و رنگ آمیزی گرده با استوکارمین) و عدم وجود گرده بارور در هم‌گروه‌های سیر نیز مؤید این مطلب می‌باشد.

از بین رفتن تدریجی میوه‌های نگهداری شده در بطری‌های محتوی آب، ممکن بود این شبه را ایجاد کند که از بین رفتن میوه‌های تشکیل شده، به‌دلیل عدم تأمین مواد غذایی کافی از سوی ساقه‌های گل‌دهنده می‌باشد. ولی از نتایج کاشت میوه در محیط کاشت درون شیشه‌ای و مقایسه آن با روند رشد میوه‌های نگهداری شده در بطری‌های محتوی آب، می‌توان نتیجه گرفت که دلیل عدم رشد و تکامل میوه‌ها و کیسه‌های جنینی درون آنها، عدم تأمین مواد غذایی نیست، بلکه دلیل آن عدم وجود گرده بارور در گرده‌های مورد استفاده در گرده افشانی و به‌تبع آن عدم لقاح جنین و عدم رشد و تکامل کیسه جنینی و بذر درون میوه می‌باشد. به همین دلیل کیسه‌های جنینی موجود در میوه‌های نگهداری شده در بطری‌های آب و هم در میوه‌های کاشته شده در محیط‌های کاشت درون شیشه‌ای، هر دو رشد نمودند ولی تبدیل به بذر نشدند (شکل۲F). نتایج به‌دست آمده از سایر آزمون‌ها نیز تائیدی بر این نتیجه می‌باشد.

عدم تشکیل دو باند نشانگر اختصاصی $OPJ12_{1300}$ و $OPJ12_{1700}$ در هم‌گروه‌های سیر مورد آزمایش، بیانگر گرده عقیمی آنها می‌باشد. هانگ و همکاران (۱۳ و ۱۴) از این روش برای بررسی عقیمی دانه گرده استفاده کردند. اگر چه استفاده از نشانگرهای مولکولی برای تشخیص باروری در سیر عمومیت نداشته است، ولی این تحقیق می‌تواند شروعی برای این قبیل آزمون‌ها باشد. زیرا این دو نشانگر می‌توانند به‌عنوان نشانگر ویژه برای تحقیق و تعیین هم‌گروه‌های بارور سیر در تحقیقات آینده به‌کار روند.

نتیجه‌گیری کلی

این تحقیق اولین گام برای تولید بذر جنسی در سیر ایرانی می‌باشد. در مجموع نتایج بدست آمده از آزمون‌های نشانگر مولکولی، جوانه‌زنی دانه گرده، رنگ پذیری گرده، کاشت کیسه جنینی و کاشت میوه، همگی گرده ناباروری را در هم گروه‌های مورد استفاده در این آزمایش تائید می‌نمایند. برای به‌دست آوردن بذر سیر ایرانی، علاوه بر شناسایی هم‌گروه‌های گل‌ده و اقدامات لازم برای حفظ و نگهداری گل بر روی گل‌آذین، می‌بایست به هم‌گروه‌هایی دست یافت که گرده بارور نیز باشند، تا علاوه بر خودباروری، بتوان از آنها به‌عنوان گرده دهنده، برای گرده افشانی هم‌گروه‌های گرده نابارور استفاده نمود. گیاهان گرده عقیم شناسایی شده، احتمالاً ماده بارور بوده و با انتقال گرده به آنها می‌توانند بذر تولید نمایند. بنابراین، با استفاده از نتایج این آزمایش می‌توان از هم‌گروه‌های سیر شناسایی شده نر عقیم، به‌عنوان لاین مادری برای تلاقی استفاده نمود. به‌دلیل نزدیکی ایران به آسیای میانه (مرکز اصلی پیدایش سیر) و دارا بودن ژرم پلاسم متنوع و غنی، می‌توان انتظار داشت که با انجام آزمایش‌های پایه‌ای و با یک برنامه چند ساله، موفق به تولید بذر سیر ایرانی شد.

منابع مورد نیاز

1. Ajam gard, F. and A. Talaei. 2002. Study of Pollen germination three varieties of olive cultivated in vitro and in vivo. *Journal of Iranian Agricultural Sciences* 33(2): 343-349. (In Farsi).
2. Chehregania, A., F. Mohsenzadeha and S. Hosseinib. 2011. Effect of the water-soluble fraction of diesel exhaust particles on the development and protein patterns of pollen grains in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Toxicological and Environmental Chemistry* 93(3): 526–536
3. Cheng, S. S. 1982. Sexual process in garlic (*Allium sativum L. CV. "Chonon"*). Proceeding of Tropical Region, *American Society for Horticultural Science* 25: 69-72
4. Etoh, T. 1979. Variation of chromosome pairing in various clones of garlic, *Allium sativum* L. *Memoirs of the Faculty of Agriculture of Kagoshima University* 15: 63-72

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-07-25]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.15.13.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.15.143]

5. Etoh, T. 1983. Germination of seeds obtained from a clone of garlic, *Allium sativum* L. *Proceedings of the Japan Academy* 59: 83–87.
6. Etoh, T. 1985. Studies on the sterility in garlic, *Allium sativum* L. *Memoirs of the Faculty of Agriculture of Kagoshima University* 21: 77-132.
7. Etoh, T. 1997. True seeds in garlic. *Acta Horticulture* 433:247–255.
8. Etoh, T., Y. Noma, Y. Nishitarumizu and T. Wakomoto. 1988. Seed productivity and germinability of various garlic clones collected in Soviet Central Asia. *Memoirs of the Faculty of Agriculture of Kagoshima University* 24: 29–139.
9. Etoh, T. and P. W. Simon. 2002. Diversity, fertility, and seed production of garlic. PP. 101–117. *In:* H. Rabinowitch and L, Currah (Eds.), Allium Crop Science: Recent Advances. CABI Publ, New York.
10. FAO. 2012. Statistics, FAOSTAT-Agriculture. Agricultural production. Available online at: http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx. Accessed 2 December 2012.
11. Gori, O. and S. Ferri. 1982. Ultrastructural study of the microspore development in *Allium sativum* clone piemonte. *Journal of Ultrastructure Reaserch* 79: 341-349
12. Hong, C. J. and T. Etoh. 1996. Fertile clones of garlic (*Allium sativum* L.) abundant around the Tien Shan mountains. *Breeding Science* 46: 349–353.
13. Hong, C. J., T. Etoh, B. Landry and N. Matsuzoe. 1997. RAPD markers related to pollen fertility in garlic (*Allium sativum* L."). *Breeding Science* 47: 359–362.
14. Hong, C. J., H. Watanabe, T. Etoh and S. Iwai. 2000. A search of pollen fertile clones in Iberian garlic by RAPD markers. *Memoirs of the Faculty of Agriculture of Kagoshima University* 36: 11–16.
15. Hossein Ava, S., M. Tatari, D. Javadi mojadad and J. Saedi. 2010. Evaluation GP of pollen and pollinizer selection for hazelnut three cultivars. *Eugenic of Seed and Plant* 26-1(3): 367-381. (In Farsi).
16. Imani, A. and A. Talaei. 1998. Effect of culture medium on pollen germination in almond grown In vitro. *Agricultural Sciences of Iranian* 29(1):79-85. (In Farsi).
17. Inaba, A., T. Ujiie and T. Etoh. 1995. Seed productivity and germinability of garlic. *Breeding Science* 45: 310.
18. Jenderek, M. M. 1998. Generative reproduction of garlic (*Allium sativum*) (in Polish). *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej im. H. Kollataja w Krakowie*. 57:141–145.
19. Jenderek, M. M and R. M. Hannan 2000. Seed producing ability of garlic (*Allium sativum* L.) clones from two public U.S. collections. *In:* Proceedings of the 3th International Symposium on Edible Alliaceae, Athens, Georgia, USA. pp. 73–75.
20. Kamenetsky, R and H. D. Rabinowitch. 2001. Floral development in bolting garlic. *Sexual Plant Reproduction* 13: 235–241.
21. Konvicka, O. 1973. The causes of sterility in *Allium sativum* L. *Biology of Plant* 15: 144–149.
22. Konvicka, O. 1984. Generative reproduction of garlic (*Allium sativum*). *Allium Newslett* 1: 28–37.
23. Koul, A. K. and R .N. Gohil. 1970. Causes averting sexual reproduction in *Allium sativum* Linn. *Cytologia* 35: 197-202.
24. Mathew, D., Y. Forer, H. D. Rabinowitch and R. Kamenetsky. 2011. Effect of long photoperiod on the reproductive and bulbing processes in garlic (*Allium sativum* L.) genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 71: 166–173
25. Mosavi, A. 1994. Study the ecophysiological characteristics of Tareh Irani. MSc. Thesis. Tehran University. Tehran. (In Farsi).
26. Novak, F. J. 1972. Tapetal development in the anthesis of *Allium sativum* L. and *Allium longicuspis* Regel. *Experientia* 28: 1380–1381.
27. Pooler, M. R. 1991. Sexual reproduction in garlic (*Allium sativum* L.). Ph.D Thesis. University of Wisconsin, Madison, USA.
28. Pooler, M. R. and P. W. Simon. 1993. Garlic flowering in response to clone, photoperiod, growth temperature, and cold storage. *HortScience* 28:1085–1086.
29. Pooler, M. R. and P. W, Simon. 1994. True seed production in garlic. *Sexual Plant Plant Reproduction* 7: 282–286.
30. Shemesh, E., K. Winiarczyk, L. Błaszczyk, A. Kosmala, H. D. Rabinowitch and R. Kamenetsky. 2012. Male gametogenesis and sterility in garlic (*Allium sativum* L.): barriers on the way to fertilization and seed production. *Planta*, 237(1): 103-120. DOI 10.1007/s00425-012-1748-1
31. Simon, P. S. and M. M. Jenderek. 2003. Flowering, Seed Production, and the Genesis of Garlic Breeding. *Plant Breeding Reviews* 23:211-244
32. Takagi, H. 1990. Biochemistry, food science, and minor crops. PP. 109–146. *In:* J. L. Brewster and H. D. Rabinowitch (Eds.), Onions and Allied Crops. CRC Press, Boca Raton, Florida

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-07-25]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.15.13.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.15.143]