بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دانشکده تولید گیاهی
گروه گیاه‌پزشکی

پایان‌نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی‌ارشد (M.Sc.)
در رشته بیماری‌شناسی گیاهی

شناسایی و تعیین نژادهای ویروس وای سیب زمینی به روش‌های مولکولی در مزارع توتون استان گلستان

پژوهش و نگارش:
فاطمه زینتی فخرآباد

اساتید راهنما:
دکتر سعید نصراله‌نژاد
دکتر اسداله احمدی‌خواه

استاد مشاور
مهندس میثم تقی‌نسب

خرداد ۱۳۹۰

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان‌نامه (رساله) خود، مراتب را قبلا بطور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **فاطمه زینتی فخرآباد** دانشجوی رشته **بیماری‌شناسی گیاهی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

تقدیم به

دلان پاک، روح های بزرگ و وجود خستگی ناپذیر:

پدر و مادر عزیزم

و

اساتید گرانقدر راهنمایم

تشکر و قدردانی

سپاس از یاور همیشه یارم، یاور همیشه یادم، مهربانی که هر چه داریم از اوست و سپاس از سرورانی که یاری‌اشان نیاز راهم بوده است.

از یاری و بزرگواری اساتید راهنمایم، جناب آقای دکتر سعید نصرالله نژاد و جناب آقای دکتر اسدالله احمدی‌خواه که در طی این تحقیق و تمامی مراحل تحصیل با راهنمایی‌های ارزشمندشان همراهیم کردند بینهایت سپاسگذارم. باسپاس از همراهی استاد مشاورم، جناب آقای مهندس میثم تقی نسب که علم و دانش خود را بی هیچ چشم‌داشتی بر من ارزانی داشتند، بزرگوارانی که در پناه یاری‌اشان سخترین لحظات این راه، شیرین ترین خاطراتم شد.

با تشکر از داوران محترم جناب آقای دکتر رهنما و جناب آقای دکتر ابراهیمی و نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر مجتبی آهنی‌آذری که با حضورشان بر کار بنده ارزش نهادند.
با تشکر و قدردانی از اساتید محترم گروه گیاهپزشکی که شاگردی‌اشان برایم افتخاری است گرانبها.
با سپاس از تلاش و همفکری جناب آقای مهندس زاهدی و جناب آقای مهندس اسلامی مسئولین محترم آزمایشگاه گیاهپزشکی و بیوتکنولوژی که از هیچ کمکی دریغ نورزیدند، سخاوتمندی و بزرگواری‌اشان منتی است ابدی.

فرصتی است مغتنم تا از محبت‌ها و دلگرمی‌های تمامی دوستانی که در این مدت همیار من بوده‌اند، که در طول دوره تحصیلی کارشناسی ارشد افتخار آشنایی با ایشان را داشته‌ام تشکر و قدردانی نمایم. از خداوند منان سربلندی و بهروزی ایشان را در تمام مراحل زندگی خواستارم.

و سرانجام سپاس و درود به خانواده‌ام، پدرم، مادرم و برادرانم که وجود نازنین‌اشان یعنی وجود من و بودنشان یعنی بودن من، می‌دانم که بهترین هستند، دوستشان دارم، دستشان را می‌بوسم و از خداوند مهرپیشه سلامتی و سربلندی ایشان را طلب می‌کنم.

چکیده

بیماری‌های ویروسی توتون به دلیل تاثیر بر کیفیت و کمیت محصول، از اهمیت بسیاری برخوردارند. یکی از مهمترین ویروس‌های توتون که از پراکنش جهانی برخوردار است، ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y*, PVY) می‌باشد. این ویروس از جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae* با پیکره ایزومتریک و ژنوم RNA تک لا و مثبت می‌باشد. به منظور بررسی پراکندگی مکانی و تعیین موقعیت تاکسونومیکی جدایه‌های PVY، در تابستان ۱۳۸۹ تعداد ۱۸۲ نمونه از مزارع توتون نواحی مینودشت، علی‌آباد، فاضل‌آباد و قرق استان گلستان جمع‌آوری گردید. آلودگی نمونه‌ها با آزمون DAS-ELISA بوسیله آنتی‌سرم چند همسانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۹۰ نمونه آلوده به PVY بودند. به منظور شناسایی علایم هر جدایه، عصاره تعدادی از نمونه‌هایی که در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شدند، بر روی گیاهان آزمون شامل *Nicotiana.tabacum cv.samsun* (ایجاد نقاط نکروتیک روی برگ و موزائیک)، *N.Whiteburley* (موزائیک)، *N.glutinosa* (موزائیک و ایجاد نقاط کلروتیک)، *N.rustica* (نکروز رگبرگ)، *Chenopodium amaranticolor* (ایجاد نقاط نکروتیک)، *Physalis floridana* (رگبرگ روشنی و ایجاد نقاط کلروتیک) و *Datura metel* (رگبرگ روشنی) مایه زنی شدند. RNA ویروس با استفاده از کیت RNX-Plus استخراج و برای ساخت cDNA بوسیله آغازگر الیگو dT رونویسی معکوس گردید و با یک جفت آغازگر اختصاصی PVY که در ناحیه CP طراحی شده بود، در واکنش RT-PCR تکثیر شد. بعد از تأیید بر روی ژل آگارز ۱٪ در الکتروفورز، نمونه‌های آلوده به PVY در محدوده ۱۰۰۰bp مورد انتظار، ایجاد باند نمودند. محصول PCR بطور مستقیم ترادف‌یابی شد و ترادف‌های بدست آمده به طول۸۵۰ نوکلئوتید همراه با ۳۰ ترادف انتخاب شده از GenBank مقایسه شدند. همردیف‌سازی چندگانه و آنالیز فیلوژنتیک با ClastalX و BLAST در نرم‌افزار BioEdit انجام و درخت فیلوژنتیک به روش maximum parsimony ترسیم گردید. آنالیز فیلوژنتیک نشان داد که جدایه‌های PVY از تمام دنیا در ۴ گروه قرار می گیرند و جدایه‌های علی‌آباد و فاضل‌آباد از ایران همراه با جدایه‌های اسپانیا، ایتالیا و بوشهر در یک گروه و جدایه مینودشت همراه با جدایه‌های هلند، ویتنام و تایوان در گروه دیگر قرار می‌گیرند. فواصل ژنتیکی بین و داخل گروهی نتایج آنالیز فیلوژنتیکی را تأیید نمودند.

واژه‌های کلیدی: توتون، ویروس PVY، داس الایزا، آنالیز فیلوژنتیک، RT-PCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱- توتون ۳

۱-۱-۱- تاریخچه توتون ۳

۱-۱-۲- گیاه‌شناسی ۳

۱-۱-۳- نیاز آب و هوایی ٤

۱-۱-٤- خاک و کود ٥

۱-۱-٥- اهمیت اقتصادی توتون ٥

۱-۲- بیماری‌های ویروسی توتون ٦

۱-۲-۱- علایم بیماری‌های ویروسی توتون ۷

۱-۲-۲- همه‌گیری شناسی و چرخه بیماری ۸

۱-۲-۳- کنترل بیماری‌های ویروسی توتون ۸

۱-۳- فرضیه‌ها ۹

۱-٤- اهداف ۹

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- ویژگی‌های گروه پوتی‌ویروس‌ها ۱۲

۲-۱-۱- ویروس وای سیب‌زمینی ۱۳

۲-۱-۱-۱- دامنه میزبانی و علایم ویروس وای سیب‌زمینی ۱٤

۲-۱-۱-۲- وضعیت ویروس وای سیب‌زمینی در ایران ۱٥

۲-۱-۱-۳- ناقلین ویروس وای سیب‌زمینی ۱٦

۲-۱-۱-٤- ساختار ژنتیکی ۱۷

۲-۱-۱-٥- نژادهای ویروس وای سیب‌زمینی ۱۸

۲-۱-۱-٥-۱- نژاد C ۱۸

۲-۱-۱-٥-۲- نژاد O ۱۹

۲-۱-۱-٥-۳- نژاد N ۱۹

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۱-۱-٦- نوترکیبی در ژنوم ویروس Y سیب‌زمینی ۲۰
۲-۱-۱-۷- مقایسه دو روش رایج شناسایی PVY ۲۱

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- نمونه برداری از مزارع توتون ۲٦
۳-۲- مواد گیاهی ۲۷
۳-۲-۱- نگهداری نمونه ها در آزمایشگاه ۲۸
۳-۳- آزمون ساندیوچ دوطرفه الایزا (DAS-ELISA) ۲۸
۳-۳-۱- مرحله اول پوشش دادن چاهک‌های بشقابک با IgG ۲۹
۳-۳-۲- مرحله دوم ریختن آنتی ژن (عصاره‌ها) در چاهک‌ها ۲۹
۳-۳-۳- مرحله سوم ریختن آنتی بادی متصل شده به آنزیم (IgG-conj.) ۲۹
۳-۳-٤- مرحله چهارم ریختن سوبسترا ۳۰
۳-٤- ارزیابی نتایج آزمون الایزا ۳۰
۳-۵- انتخاب جدایه‌های مثبت ۳۰
۳-٦- مطالعات گلخانه‌ای ۳۱
۳-٦-۱- آماده‌سازی گیاهان محک ۳۱
۳-٦-۲- مایه‌زنی گیاهان محک ۳۱
۳-٦-۳- بررسی نوع علائم روی گیاهان محک تلقیح شده به PVY ۳۲
۳-۷- استخراج RNA کل گیاهی ۳۳
۳-۷-۱- استخراج RNA کل با استفاده از محلول تجاری RNX-Plus ۳٤
۳-۷-۲- استخراج RNA کل با استفاده از محلول تجاری Biozol ۳۵
۳-۸- بررسی کمیت و کیفیت RNA کل استخراج شده ۳٦
۳-۸-۱- روش الکتروفورز ژل آگارز ۳٦
۳-۹- ساخت cDNA ۳۷
۳-۱۰- انجام واکنش PCR ۳۸

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۱۰-۱- طراحی پرایمر ۳۸
۳-۱۰-۲- بررسی محصول RT-PCR ۳۹
۳-۱۱- روش مقایسه توالی نوکلئوتیدی نژادهای PVY با توالی مشابه در بانک ژن ۴۰

فصل چهارم: نتایج

۴-۱- نتایج نمونه برداری ۴۲
۴-۲- نتایج آزمون DAS-ELISA ۴۳
۴-۳- مطالعات گلخانه ای ۴۴
۴-۳-۱- مقایسه بررسی علائم ویروس Y سیب‌زمینی روی گیاهان افتراقی ۴۴
۴-۴- نتایج استخراج RNA کل گیاهی ۴۹
۴-۵- نتایج آزمون RT-PCR ۵۰
۴-۶- تنوع ژنتیکی ۵۳
۴-۷- بیشترین درصد تشابه جدایه‌های مورد بررسی با نژادهای اصلی PVY در جهان ۵۳
۴-۸- مقایسه نتایج حاصله از آزمون‌های گیاهان افتراقی، DAS-ELISA و RT-PCR ۵۵

فصل پنجم: بحث

بررسی نوترکیبی در ایزوله‌های ایرانی ویروس Y سیب‌زمینی ۶۱
پیشنهادهای اجرایی و پژوهشی ۶۲
فهرست منابع و مآخذ ۶۳

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- مشخصات ظاهری گیاه توتون ٤
شکل ۲-۱- شمای کلی ژنوم ویروس Y سیب زمینی ١٤
شکل ۳-۱- علائم ویروس Y سیب زمینی بر روی توتون ۲۷
شکل ۳-۲- مرحله کاشت گیاهان محک ۳۳
شکل ٤-۱- نکروز رگبرگ ایجاد شده توسط ویروس Y سیب زمینی ٤۲
شکل ٤-۲- علائم موزائیک در اثر PVY بر روی برگ توتون ٤۲
شکل ٤-۳- علائم ایجاد رگبرگ روشنی بوسیله ویروس Y سیب زمینی بر روی توتون ٤۳
شکل ٤-٤- ایجاد لکه های نکروز بر روی کیاه سلمه تره بر اثر تلقیح ویروس PVY ٤٦
شکل ٤-٥- روشن شدن رگبرگ بر اثر ویروس Y سیب زمینی بر روی عروسک پشت پرده ٤٦
شکل ٤-٦- نکروز و موزائیک برروی گیاه توتون رقم سامسون بوسیله تلقیح PVY ٤۷
شکل ٤-۷- ایجاد موزائیک و کلروز بر روی توتون گلوتینوزا بوسیله ویروس Y سیب زمینی ٤۷
شکل ٤-۸- ایجاد نکروز رگبرگ بوسیله PVY برروی توتون رقم روستیکا ٤۸
شکل ٤-۹- علائم رگبرگ روشنی ویروس Y سیب زمینی بر روی داتوره ٤۸
شکل ٤-۱۰- موزائیک شدید ایجاد شده بر روی توتون وایت بارلی بوسیله تلقیح PVY ٤۹
شکل ٤-۱۱- استخراج RNA کل با استفاده از محلول RNX-Plus ٥۰
شکل ٤-۱۲- نتایج آزمون PCR در ژل آگارز ۱٪ با بافر TBE ٥۱
شکل ٤-۱۳- دندروگرام (درخت‌واره) حاصل از گروهبندی ایزوله‌های توالی‌یابی شده ٥۲
شکل ٤-١٤- نمودار بیشترین درصد تشابه جدایه‌های مورد بررسی با نژادهای اصلی PVY در دنیا ٥٤
شکل ٤-۱٥- درصد پراکنش استرین‌های PVY براساس این تحقیق در استان گلستان ٥٥

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- سطح زیر کشت توتون (هکتار) در ایران ٦
جدول ۳-۱- گیاهان محک استفاده شده در تحقیق ۳۳
جدول ۳-۲- مواد لازم و مقدار هر یک از آنها برای تهیه cDNA ۳۸
جدول ۳-۳- توالی و موقعیت آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق ۳۸
جدول ۳-٤- مواد لازم و مقدار هر یک از آنها برای تهیه محلول پایه PCR ۳۹
جدول ٤-۱- فراوانی ویروس Y سیب زمینی در کل نمونه‌ها به تفکیک منطقه نمونه‌برداری ٤۳
جدول ٤-۲- علائم بدست آمده از مایه‌زنی ویروس Y سیب زمینی بر روی گیاهان افتراقی ٤٥

فصل اول

مقدمه و کلیات

ویروس‌ها موجوداتی بسیار کوچک و غیر قابل رویت با میکروسکوپ‌های معمولی (نوری) هستند که تنها در سلول‌های زنده تکثیر می‌یابند. حدود ۵۰ سال قبل، اولین ویروس‌ها جدا شده و خصوصیات شیمیایی آنها تعیین گردید. آنها ویروس‌های واگیر دار گیاهان بودند. همزمان، بحث‌های زیادی در خصوص تعلق این عوامل به دنیای زنده یا غیر زنده مطرح گردید. در خلال ۳۰ سال اخیر، به کمک کاربرد مفاهیم و روش‌های زیست‌شناسی مولکولی، کاملاً مشخص شده است که ویروس‌ها قسمتی از جهان زنده می‌باشند. در واقع ویروس‌ها، انگل‌های اجباری بسیار کوچکی هستند که دارای یک تا چند صد ژن می‌باشند. این ژن‌ها مانند ژن‌های سلولی می‌توانند جهش یافته و تکامل یابند (پوررحیم و همکاران، ۱۳۸۱). خانواده ***Potyviridae*** جزو مهمترین گروه‌های ویروسی بیماری‌زای گیاهی و یکی از بزرگترین آن‌ها است. در میان پوتی ویروس‌ها[1]، ویروس‌وای‌سیب‌زمینی (PVY)[2] به عنوان یکی از مخربترین بیمارگرهای توتون، سیب زمینی، گوجه فرنگی و فلفل محسوب می‌گردد، به طوری که در برخی موارد، کاهش محصول توتون بین ۸۰ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است (شیو و لوکاس، ۱۹۹۱؛ هوکر، ۱۹۹۰). آلودگی به ویروس وای‌سیب‌زمینی موجب کاهش کمی و کیفی تولید توتون می‌گردد (سیورت، ۱۹۷۱؛ لاتور، ۱۹۸۳). در سال‌های اخیر بیشترین فعالیت‌های تحقیقاتی در زمینه کنترل بیماری‌های ویروسی شامل اصلاح رقم‌های ایمن یا مقاوم با روش‌های کلاسیک ژنتیکی، کنترل ناقلین با استفاده از راهبردهای مختلف، تولید بذور و اندام‌های رویشی ازدیادی عاری از ویروس و تولید گیاهان تراژنی است که حامل ژن‌های ویروسی هستند و موجب بروز مقاومت در برابر ویروس می‌گردند (پوررحیم و همکاران، ۱۳۸۱). عملی‌ترین راه کنترل ویروس‌های توتون، اقدام به کاشت ارقام مقاوم است. کاشت ارقام حساس توتون در مناطقی که هم ویروس و هم ناقل وجود دارند، چالشی در تهیه و تدوین راهبردهای مدیریت و سازماندهی کنترل بیماری‌های ویروسی است (دانش، ۱۳۷۹). اساس هر انتخاب یا برنامه به‌نژادی، وجود تنوع ژنتیکی در بین گیاهان یک گونه در واکنش به یک ویروس خاص است و در مورد بسیاری از ویروس‌های گیاهی که اهمیت اقتصادی دارند، می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (جعفرپور، ۱۳۸۲).

1. Potyviruses 2. *Potato virus Y*

۱-۱- توتون

۱-۱-۱- تاریخچه توتون

سابقه‌ی کشت توتون به ۳۰۰۰ سال پیش می‌رسد. زراعت توتون و استفاده از فرآورده‌های این گیاه تا قبل از کشف قاره آمریکا برای کشاورزان ناشناخته بود. در سال ۱۵٤۲ میلادی هنگامی‌که کریستف کلمب به این قاره رسید، مشاهده نمود که بومیان آنجا از این گیاه استفاده می‌کردند. این گیاه توسط کاشفین آمریکا به اروپا برده شد و اولین کشور اروپایی که کشت این گیاه در آنجا صورت گرفت، پرتغال بود. در قرن پانزدهم میلادی شخصی به نام نیکوت مقداری توتون و بذر این گیاه را از پایتخت پرتغال به فرانسه آورد و به ملکه فرانسه هدیه نمود. چون این گیاه مورد علاقه ملکه قرار گرفت نام این گیاه به پاس خدمات نیکوت، نیکوتیانا و آلکالوئید آن نیکوتین نامگذاری شد. توتون پس از ورود به اروپا برای درمان بیماری‌های پوستی به کار رفت و به تدریج، برگ آن برای تهیه‌ی سیگارت مورد استفاده قرار گرفت. در ایران بذر توتون در زمان صفویه از بنادر جنوب وارد شد (خدابنده، ۱۳٦۸).

۱-۱-۲- گیاه‌شناسی

توتون با نام علمی (*Nicotiana tabacum*) و با نام انگلیسی Virginian tobacoo یا Tobacoo، گیاهی یکساله و متعلق به تیره‌ی بادمجانیان *Solanaceae* می‌باشد. تعدادی از محققان معتقدند N.tabacum گیاه دورگی است که از آمیزش گونه سیلوستریس و توفتوزا و یا از آمیزش گونه میلوستریس با تومنتوزیفوریس بوجود آمده است. ارتفاع بوته در شرایط مزرعه و بدون گل‌آذین به ۱/۵ متر و همراه با گل‌آذین به بیش از ۲ متر می‌رسد. طول دوره رشد گیاه در زمین اصلی و برای تولید برگ، به نوع رقم و شرایط تولید برگ بستگی زیادی دارد و معمولاً ۳ تا ۵ ماه می‌باشد. این گیاه دارای یک ریشه اصلی عمیق است که از آن انشعابات جانبی زیادی تولید می‌گردد. عمق توسعه ریشه به ندرت از ٦۰ سانتی‌متر تجاوز می‌کند. علی‌رغم سطحی بودن گسترش، ریشه می‌تواند بوته را در مقابل بادهای شدید نگه دارد. توتون دارای ساقه‌ای راست با میان‌گره‌های کوتاه است که توسط کرک‌های ترشحی و لزج پوشیده شده است. برگ‌های این گیاه، ساده، بدون بریدگی و بدون دمبرگ، بزرگ و بیضی شکل و طویل، با ناحیه رأسی کشیده، به رنگ سبز روشن، شکننده، با بوی مواد مخدر و مواد تلخ و تند هستند و با آرایش مارپیچی روی ساقه قرار می‌گیرند. برگ در ارقام مختلف از نظر

اندازه، ضخامت، بافت ظاهری و برجستگی رگبرگ‌ها فرق می‌کند. گل‌آذین توتون خوشه‌ای است و گل‌ها که به رنگ سفید، صورتی، قرمز و زرد هستند، از ۵ کاسبرگ، ۵ گلبرگ به هم پیوسته (قیفی شکل)، ۵ پرچم و یک مادگی دو برچه‌ای تشکیل شده اند. توتون به دلیل همزمانی گرده‌افشانی و آمادگی کلاله برای دریافت دانه گرده و عدم وجود موانع ژنتیکی، خودگشن است. میوه این گیاه، کپسولی دوبرچه‌ای و تخم مرغی شکل می‌باشد که توسط کاسه گل احاطه شده است. مهمترین مواد تشکیل‌دهنده برگ توتون عبارتند از ترکیبات ازت دار، کربوهیدرات، اسید آلی، تانن‌ها، مواد رنگی و اسانس است. مهمترین آلکالوئیدهای توتون شامل نورنیکوتین، آنابازین، نیکوتئینم و از همه مهمتر نیکوتین است. این مواد موثره در ریشه ساخته شده و به برگ منتقل می گردد و در آن ذخیره می شود. که مقدار آن بین ۷ تا ۳ درصد است (خواجه‌پور، ۱۳۸۳).

شکل ۱-۱. مشخصات ظاهری گیاه توتون که شکل برگ‌ها و گل‌ها را نشان می‌دهد (بی‌نام، ۲۰۰۰).

۱-۱-۳- نیاز آب و هوایی

منشا توتون نواحی نیمه‌گرمسیر می‌باشد و بدین لحاظ، گیاهی گرمادوست محسوب می‌گردد. از آنجایی که بخش قابل توجهی از دوران رشد گیاه در خزانه سپری می‌شود، امکان کشت آن در مناطقی با حداقل ۱٤۰ روز بدون یخبندان (جهت رشد در زمین اصلی) با دمای بالا و رطوبت کافی در طی این دوران، وجود دارد. کاشت بذر توتون ممکن است در گلخانه، شاسی سرد و یا محیط باز انجام گیرد. دمای مناسب برای سبز شدن بذر توتون ۱۸ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. بذر در این شرایط بین ۷ تا ۱۲ روز سبز می‌گردد. طول دوران رشد در خزانه در شرایط گلخانه‌ای به ٦ تا ۸ هفته، در شاسی