مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۵، شماره ۱، سال ۱۳۸۸

تولید گیاهان دورگ گیلاس (سیلژ دلامارکا و زرد دانشکده) با استفاده از کشت جنین

Production of Sweet Cherry Hybrids (Silej-Delamarka and Zard-Daneshkadeh) Using Embryo Culture

حسین فتحی[۱]، کاظم ارزانی[۲]، علی عبادی[۳] و احمد خلیقی[۳]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران
۲- استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه ترتیب مدرس، تهران
۳- به ترتیب دانشیار و استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۸۵/۱۲/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸٦/۱۲/۱٦

چکیده

فتحی، ح.، ارزانی، ک.، عبادی، ع.، و خلیقی، ا. ۱۳۸۸. تولید گیاهان دورگ گیلاس (سیلژ دلامارکا و زرد دانشکده) با استفاده از کشت جنین. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۵**: ۶۴ - ۵۱.

یکی از فنون مورد استفاده در اصلاح درختان میوه کشت جنین هیبریدهایی است که به دلایل مختلف سبز نمی‌شوند و بذرهای دورگ گیلاس از این نظر مشکلات فراوانی دارند.کشت جنین در اصلاح هسته‌دارها به ویژه در تلاقی‌های بین گونه‌ای و در تلاقی‌هایی که والد بذری انتخابی رقم زودرس باشد کاربرد وسیعی دارد. با توجه به این که بذرهای هیبرید گیلاس به خصوص در ارقام زودرس کمتر از یک درصد جوانه‌زنی دارند، بنابراین برای بررسی امکان کشت و نجات جنین‌های دورگ در برنامه دورگ‌گیری برای تولید ارقام زودرس در گیلاس این پژوهش انجام شد. دراین پژوهش رقم زرد دانشکده از ارقام دیررس و رقم سیلژ دلامارکا از ارقام زودرس انتخاب شدند. جنین‌های به دست آمده در رقم سیلژ دلامارکا با گرده‌افشانی آزاد و در رقم زرد دانشکده با گرده‌افشانی کنترل شده (زرد دانشکده×سیاه مشهد)، پس از سترون‌سازی، روی محیط MS کشت شدند. جوانه‌زنی جنین‌ها در رقم زودرس سه هفته و در رقم دیررس شش هفته بعد از تمام گل شروع شد. رشد جنین‌ها وقتی مناسب بود که قبل از بلوغ به مدت ٤٠ روز و در زمان بالغ بودن به مدت ٦٠ روز در تیمار سرمادهی قرار گرفتند. نتایج نشان داد در حالی که جوانه‌زنی بذرهای رسیدهٔ رقم زودرس سیلژ دلامارکا به روش سنتی درحد صفر درصد است، با انجام کشت جنین۲۱ و ۲۸ روز پس از تمام گل جوانه‌زنی به ترتیب ۳۰ درصد و ٦٠ درصد افزایش یافت. در رقم دیررس زرد دانشکده جوانه‌زنی جنین به ٦٠ درصد و ۹۵ درصد به ترتیب بعد از ٤۲ و ٥٦ روز پس از تمام گل رسید، در حالی که بذرهای رسیده این رقم فقط ۲٦/٦ درصد جوانه‌زنی داشت.

واژه‌های کلیدی: گیلاس، بذر هیبرید، جوانه‌زنی، کشت جنین، ارقام زودرس.

نویسنده مسئول: arzani_k@modares.ac.ir

مقدمه

کشت جنین(Embryo culture) روش قابل قبولی برای نجات دورگ‌های به دست آمده در درختان میوه هسته‌دار است. برای این منظور جنین‌های بالغ و یا نارس در شرایط سترون بر روی یک محیط غذایی خاص کشت می‌شوند تا جنین‌های موردنظر از بین نروند. کشت جنین اولین بار در سال ۱۹۰۴ توسط هنیگ (Hannig)) شروع شد. دیتریچ (Dietrich) در سال ۱۹۲۴ از کشت جنین به عنوان تولد مصنوعی یاد کرده است. لایبچ (Laibach) در سال‌های ۱۹۲۵ و ۱۹۲۹ توانست جنین بذرکتان را کشت داده و گیاه زنده به دست آورد. توکی (Tukey) در سال‌های ۱۹۳۳ توانست جنین‌های سقط شدهٔ هسته‌دارها را نجات داده و دانهال‌های زنده به دست آورد (به نقل از Mark, 1994). با توجه به این که جوانه‌زنی بذرهای گیلاس وآلبالوهای زودرس و سایر درختان میوه هسته‌دار خیلی پائین و در حد صفر درصد است (Schmidt and Ketzel, 1993) و به دست آوردن دانهال به تعداد زیاد از گروه ارقام زودرس که بذر آن‌ها در زمان رسیدن میوه هنوز به مرحلهٔ بلوغ نرسیده‌اند مشکل است و این که در این گونه‌ها و ارقام بذرهای دورگ به دست آمده در برنامه‌های اصلاحی مشکل جوانه‌زنی دارند، لذا از تکنیک کشت جنین جهت نجات رویان‌های دورگ مطلوب بهره گرفته می‌شود (Susan *et al.*, 1996؛ Ramming, 1985). دراصلاح و معرفی ارقام هسته‌دار با خصو صیات جدید و سودمند با انجام دورگ‌گیری بین گونه‌ای دور، خصوصیات مطلوب به راحتی به دورگ‌های نسل بعد منتقل می‌شود، اما درصد تشکیل بذرهای دورگ زنده که جوانه‌زنی مطلوب داشته باشند خیلی پائین است. به دلیل وجود مشکلات زیاد در شرایط طبیعی در شکسته شدن پوسته بذر طی فرایند جوانه‌زنی در خاک و سقط جنین دورگ‌های زودرس دست‌یابی به گیاهان دورگ آسان نیست. به منظور جلوگیری از سقط جنین می‌توان از فن کشت جنین بهره جست (Ivanica and Mokra, 1982). یک عامل محدودکننده در موفقیت کشت جنین اندازه کوچک جنین‌ها در زمان انتقال آن‌ها به محیط کشت است زیرا دانهال‌های زنده فقط از جنین‌های تمایز یافته‌ای رشد می‌کنند که بر روی درخت به تمایز رسیده باشند و اندازه شان کمتر از نصف تا یک سوم اندازه نهایی جنین نباشد (Zdruijkovskaja-Richter, 1985).

از سوی دیگر با توجه به این که اصلاح درختان هسته‌دار دارای مراحل گسترده و طولانی بوده و این مشکل عموماً به دلیل طولانی بودن دوره نونهالی موجود در بین نسل‌ها و بزرگ بودن اندازه درختان ناشی می‌شود در نتیجه، مجموعه این عوامل اجازه استفاده از جمیعت‌های زیاد را نمی‌دهد تا بتوان داخل آن‌ها اقدام به گزینش کرد. در نتیجه وجود این عوامل محدودکننده، سرعت بر نامه‌های اصلاحی نسبت به محصولات زراعی کندتر است. یکی دیگر از کاربردهای فن کشت جنین تعیین سریع مارکرهای مولکولی در گونه‌های مختلف درختان میوه برای تعیین هویت موادگیاهی است. از این شیوه در تعیین شباهت‌های منتقل شده، ارتباطات فیلوژنی، تعیین و تهیه نقشه ژنی و

آزمایش‌های جالب توجه در یافتن پیوستگی (Linkage) صفات برای استفاده در گزینش مارکرهای مولکولی یا در انتقال ژن استفاده می‌شود (Hormaza, 1999). علاوه بر این، ازکشت جنین در اصلاح درختان میوه برای غلبه بر دوره خواب (Dormancy) و موانع تولید مثلی، آزمایش‌های جوانه‌زنی بذر و نیز تولید گیاهان عاری از ویروس استفاده می‌شود (Ramming, 1990). این پژوهش به منظور بررسی امکان کشت جنین در دو رقم زودرس سیلژ دلامارکا و دیررس زرددانشکده انجام شد.

مواد و روش‌ها

عملیات دورگ‌گیری این پژوهش در ایستگاه تحقیقات باغبانی کمال‌آباد واقع در ۱۵کیلومتری غرب کرج و کارهای آزمایشگاهی آن در آزمایشگاه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام شد (Fathi and Arzani, 1999, 2002).

در ابتدا از هر کدام از ارقام سیلژدلامارکا و زرد دانشکده سه اصله درخت هم سن انتخاب شد و در هر درخت دو شاخه در جهت‌های مختلف قبل از شکوفائی گل‌ها انتخاب و علامت‌گذاری شدند. گرده‌افشانی در رقم زودرس سیلژ دلامارکا به صورت آزاد و در رقم دیررس زرد دانشکده به صورت کنترل شده با رقم سیاه مشهد به عنوان والد پدری در نظر گرفته شد. شاخه‌های انتخاب شده قبل ازشکوفائی گل‌ها با کیسه‌های پارچه‌ای ململ پوشیده شدند. همزمان شاخه‌هایی از والد پدری به آزمایشگاه منتقل وپس از باز شدن گل‌ها، گرده جمع‌آوری و تا زمان گرده‌افشانی در یخچال نگهداری شد. پس از شکوفا شدن گل‌های والد مادری در هر شاخه حدود صد عدد گل با قلم مو به صورت دستی گرده‌افشانی شد و با توجه به خود ناسازگاری کامل رقم مادری زرد دانشکده اخته کردن گل‌ها انجام نشد. پس از عمل گرده‌افشانی برای جلوگیری از ورود گرده‌های خارجی تا تشکیل میوه اولیه شاخه‌ها مجدداً در کیسه ململ قرار گرفتند. در زمان‌های ۲۱ و۲۸ روز پس از تمام گل از رقم سیلژ دلامارکا و ۳۵، ۴۲، ۴۹ و۵۶ روز از رقم زرد دانشکده نمونه‌برداری میوه انجام شد. در هر بار نمونه‌گیری تعداد ۵۰ عدد میوه از جهات مختلف درخت برداشت شدند. سپس بذرها را از میانبر(Mesocarp) میوه خارج کرده و مراحل سترون‌سازی به ترتیب شستشو با مایع ظرفشوئی به مدت ده دقیقه، سپس اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه، ودر ادامه با هیپوکلریت سدیم (۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه) انجام شد. در ادامه، بذرها به زیر هود لامینار منتقل و توسط انبردست سترون شده شکسته شدند (برای جلو گیری از آسیب دیدن جنین‌ها بین دسته‌های انبردست از لاستیک استفاده شد). جنین‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و ده عدد ریز نمونه در هر کرت در محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) با ۸ و ۳ درصد به ترتیب ساکارز برای جنین‌های نابالغ و بالغ و با ۷ درصد آگار با pH ۵/۵ کشت شدند. جنین‌ها به مدت‌های ۴۰ و۶۰ روز در در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال سرمادهی شدند. پس از آن

جنین‌ها در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد در اطاقک رشد قرار داده شدند. به منظور بررسی اثر هورمون جیبرلین به جای تیمار سرمادهی، جنین‌های بالغ رقم زرد دانشکده پس از حذف لپه‌ها بدون سرمادهی و با تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر GA3 کشت شدند. همچنین در زمان رسیدن کامل میوه بذرهای رسیده هر دو رقم تحت تیمار سرمادهی به مدت ۳ تا ۵ ماه در ۴ درجه سانتی‌گراد و در محیط پرلایت قرار گرفتند و درصد جوانه‌زنی بذرها در دو بستر پرلایت و محیط آگاریزه ویژه کشت جنین مقایسه شدند.

نتایج و بحث

در جدول ۱ مشخصات تیمارهای اعمال شده برای بررسی جوانه‌زنی بذر و جنین خلاصه شده است.

رقم سیلژ دلامارکا :

جدول ۲ تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی جنین رقم سیلژدلامارکا در زمان‌های مختلف برداشت را نشان می‌دهد. با توجه به این جدول، اختلاف جوانه‌زنی در زمان‌های مختلف برداشت جنین معنی‌دار بود، بدین معنی که بین درصد جوانه‌زنی در ۲۱ و ۲۸ روز پس از تمام گل از نظر آماری اختلاف وجود داشت. با افزایش زمان پس از تمام گل، درصد جوانه‌زنی جنین نیز افزایش یافت اما با افزایش طول دوره سرمادهی درصد جوانه‌زنی جنین‌ها ثابت ماند، به طوری که حداکثر و حداقل جوانه‌زنی جنین در این رقم به ترتیب ۲۸ و ۲۱ روز پس از تمام گل به دست آمد و جوانه‌زنی بذر رسیده این رقم حتی با ۵ ماه تیمار سرمادهی در حالت عادی صفر بود.

بالا و بروزیک (Balla and Brozik, 1996) گزارش کردند که بذرهای هیبرید ارقام زودرس گیلاس معمولاً کمتر از یک درصد جوانه‌زنی داشته و با کشت جنین می‌توان ۲۰ تا ۳۵ درصد دانهال به دست آورد. دروجکوفسکایا-ریختر (Zdrujkovskaja-Rikhter, 1985, 1974) ۲۸ روز پس از گرده‌افشانی در ارقام خیلی زودرس جنین‌های زنده زیادی به دست آورد و به درصد بالای جوانه‌زنی دست یافت. یافته‌های به دست آمده تحقیق فوق با یافته‌ها این تحقیق منطبق است.

نتایج ارزیابی بذرها در این پژوهش مشابه با نحوه ارزیابی بذر در آزمایش‌های سوزان و همکاران (Susan *et al*., 1996) بود، به گونه‌ای که وقتی بذرهای ارقام زودرس در مرحلهٔ جداسازی در آب غوطه‌ور شوند، اکثر بذرها بر روی آب شناور باقی می‌مانند و هیچ‌گونه جوانه‌زنی از خود نشان نمی‌دهند. چنین فرض می‌شود که بذرهای ارقام زودرس علی‌رغم اندازهٔ مناسب، از استعداد بیوشیمیایی و انباشتگی ذخیرهٔ مواد غذایی کافی در لپه‌هایشان برخوردار نبوده و این سبب می‌شود که وزن و چگالی نسبی آن‌ها کاهش یافته و قوهٔ نامیه بذرها پایین و در حد صفر باشد. در چنین بذرهایی اگر جنین‌ها را از بذر جدا کرده و در محیط *In-vitro* کشت شوند، درصد جوانه‌زنی جنین ۷۱ الی ۱۰۰ درصد افزایش می‌یابد. با بررسی داخل هسته‌ها مشخص شد که جنین‌های سقط شده فضای داخلی درونبر (Endocarp) را کاملاً پر نکرده‌اند (شکل ۱) و قابلیت شکستن درونبر و

جدول ۱- مشخصات تیمارها برای بررسی جوانه‌زنی و برآورد درصد جوانه‌زنی بذر و جنین‌ها

Table 1. Seed and embryo germination treatments

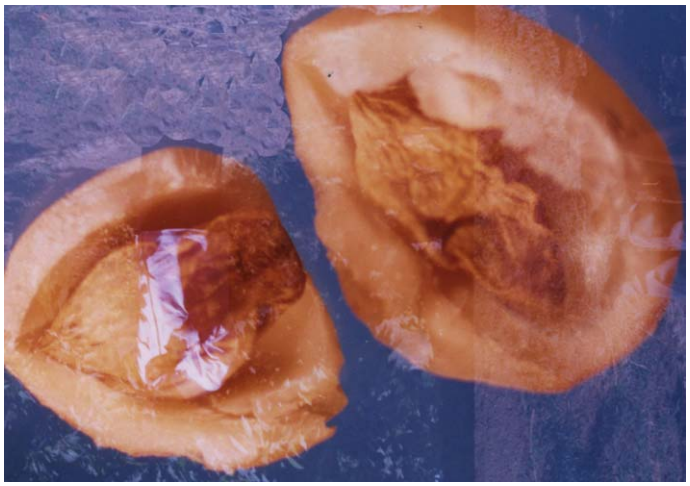
رقم Cultivar	Treatments	تیمارها
سیلژ دلامارکا Silej-Delamarka	28 days after full bloom with 40 days stratification	۲۸ روز پس ازتمام گل با ۴۰ روز سرمادهی
	28days after full bloom with 60 days stratification	۲۸ روز پس ازتمام گل با ۶۰ روز سرمادهی
	21 days after full bloom with 40 days stratification	۲۱ روز پس ازتمام گل با ۴۰ روز سرمادهی
	21 days after full bloom with 60 days stratification	۲۱ روزه پس ازتمام گل با ۶۰ روز سرمادهی
	Adult seed with 3 months stratification	بذر رسیده با ۳ ماه سرما دهی
زرد دانشکده Zard-Daneshkadeh	35 days after full bloom	۳۵ روز پس از تمام گل سرمادهی
	42 days after full bloom with 40 days stratification	۴۲ روز پس ازتمام گل با ۴۰ روز سرمادهی
	42 days after full bloom with 60 days stratification	۴۲ روز پس ازتمام گل با ۶۰ روز سرمادهی
	49 days after full bloom with 40 days stratification	۴۹ روز پس ازتمام گل با ۴۰ روز سرمادهی
	49 days after full bloom with 60 days stratification	۴۹ روز پس ازتمام گل با ۶۰ روز سرمادهی
	56 days after full bloom with 40 days stratification	۵۶ روز پس ازتمام گل با ۴۰ روز سرمادهی
	56 days after full bloom with 60 days stratification	۵۶ روز پس ازتمام گل با ۶۰ روز سرمادهی
	Adult embryos without cotyledons and stratification	جنین بالغ بدون لپه وبدون سرمادهی
	Adult embryos without cotyledons, with GA3(10mg)	جنین بالغ بدون لپه با ۱۰ میلی‌گرم GA3
	Adult seed with 3,4 and 5 months stratification	بذر رسیده با ۳، ۴ و ۵ ماه سرما دهی

جدول ۲ - تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی جنین رقم سیلژ دلامارکا

Table 2. Analysis of variance for embryo germination percentage of Silej-Delamarka cultivar

S.O.V.	منبع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات M.S.
Treatment	تیمار	3	900.00**
Error	اشتباه	8	19.25
C.V%	ضریب تغییرات		9.75

**: Significant at 1% probability level. **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.



شکل ۱- جنین‌های سقط شده رقم زودرس سیلژدلامارکا در داخل هسته در زمان رسیدن میوه
Fig.1. The aborted embryos of Silej-Delamarka in the stones at the time of fruit ripening

جوانه‌زنی را ندارند. این مشاهدات نشان داد که برای به دست آوردن دانهال بایستی الزاماً از کشت جنین استفاده کرد.

شروع تمایز لپه‌ها در گیلاس بستگی به شرایط آب و هوایی پس از گلدهی دارد به طوری که در برخی سال‌ها شروع رسیدن میوهٔ رقم زودرس سیلژدلامارکا را اوایل خرداد ماه گزارش کرده‌اند (Goharkhay, 1992, 1991؛ Seify and Arzani, 1999؛ Arzani, 1998). این در حالی است که در زمان انجام این تحقیق رسیدن رقم مذکور در هفتهٔ دوم اردیبهشت ماه واقع شد. چرخهٔ طبیعی رشد و نمومیوه (Fruit set) در داخل جنس پرونوس (Prunus) ثابت بوده و جوانه‌زنی بذر معمولاً بستگی به مرحلهٔ نهائی رشد در هر میوه دارد. استقلال جنین‌های جدا شده زمانی محقق می‌شود که تمایز جنین انجام یافته و مرحلهٔ دوم رشد میوه سپری شده باشد و جنین‌هایی که در شرایط طبیعی به این مرحله رشدی نرسیده باشند در شرایط درون شیشه‌ای نیز نمی‌توانند رشد کنند. در این تحقیق استقلال جنین‌های نجات یافته و کشت شده در محیط کشت بعد از سه هفته از تمام گل (Full bloom) در رقم زودرس سیلژدلامارکا به دست آمد و در این حالت جوانه‌زنی جنین به ۳۰ درصد رسید (شکل ۲)، در حالی که بذر رسیده این رقم به صورت عادی جوانه‌زنی نداشت. وجود این مشکل در گزارش اشمیت و کتزل (Schmidt and Ketzel, 1993, 1996) به صورت آشکار بیان شده است. آزمایش‌های آن‌ها نشان داد که حدود ۳۰ تا ۴۰ روز پس از گرده‌افشانی ۵۰ درصد بذرهائی که ریزش کرده بودند دارای جنین‌های زنده بودند و تولید دانهال کردند. اما پس از ۵۰ تا ۶۰ روز اکثر بذرها قادر به تولید دانهال نبودند.

مقایسه میانگین‌های جوانه‌زنی در دو زمان مختلف در جدول ۳ آورده شده است. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که از نظر جوانه‌زنی تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای

جدول ۳ – مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر جوانه‌زنی جنین‌های دو رقم گیلاس

Table 3. Means comparison of the effects of different treatments on germination of embryos of two cherry cultivars

Cultivar	رقم	Treatments	تیمارها	میانگین درصد جوانه زنی Mean of germination percent
Silej-Delamarka	سیلژ دلامارکا	28 days after full bloom with 40 days stratification	۲۸ روز پس ازتمام گل با ۴۰ روز سرمادهی	60 a
		28days after full bloom with 60 days stratification	۲۸ روز پس ازتمام گل با ۶۰ روز سرمادهی	60 a
		21 days after full bloom with 40 days stratification	۲۱ روز پس ازتمام گل با ۴۰ روز سرمادهی	30 b
		21 days after full bloom with 60 days stratification	۲۱ روزه پس ازتمام گل با ۶۰ روز سرمادهی	30 b
		Adult seed with 90 days stratification	بذر رسیده با ۳ ماه سرمادهی	0
Zard-Daneshkadeh	زرد دانشکده	35 days after full bloom with 40 days stratification	۳۵ روز پس ازتمام گل گل با ۴۰ روز سرمادهی	0
		42 days after full bloom with 40 days stratification	۴۲ روز پس ازتمام گل با ۴۰ روز سرمادهی	60 c
		42 days after full bloom with 60 days stratification	۴۲ روز پس ازتمام گل با ۶۰ روز سرمادهی	60 c
		49 days after full bloom with 40 days stratification	۴۹ روز پس ازتمام گل با ۴۰ روز سرمادهی	80 b
		49 days after full bloom with 60 days stratification	۴۹ روز پس ازتمام گل با ۶۰ روز سرمادهی	80 b
		56 days after full bloom with 40 days stratification	۵۶ روز پس ازتمام گل با ۴۰ روز سرمادهی	95 a
		56 days after full bloom with 60 days stratification	۵۶ روز پس ازتمام گل با ۶۰ روز سرمادهی	95 a
		Adult embryos without cotyledons and stratification	بالغ بدون لپه وبدون سرمادهی	0
		Adult embryos without cotyledons, with GA3 (10mg)	بالغ بدون لپه با ۱۰ میلی گرم GA3	80 b
بذرهای بالغ رقم زرد دانشکده Adult seeds of Zaed-Daneshkadeh		Adult seeds with 90 days stratification	بذر رسیده با ۳ ماه سرمادهی	0
		Adult seeds with 120 days stratification	بذر رسیده با ۴ ماه سرمادهی	13.33 b
		Adult seeds with 150 days stratification	بذر رسیده با ۵ ماه سرمادهی	26.67 a

میانگین ها با حروف مشابه در سطح احتمال ۱٪ بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن اختلاف آماری معنی دار ندارند.

Means with similar letters are not significantly different at 1% level according to Duncan’s multiple range tests.

شکل۲- جوانه‌زنی جنین‌های رقم سیلژدلامارکا پس از ۴۰ روز سرمادهی

Fig. 2. Embryos germination of Silej-Delamarka cultivar after 40 days stratification

در زمان‌های مختلف پس از تمام گل وجود دارد به گونه‌ای که جوانه‌زنی جنین در ۲۱ و ۲۸ روز پس از تمام گل با هم اختلاف زیادی داشتند.

رقم زرد دانشکده

تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی جنین‌های این رقم در جدول ۴ نشان داده شده است. این جدول نشان می‌دهد که بین تیمارهای سرمادهی در جوانه‌زنی جنین اختلاف در سطح ۱٪ معنی‌دار است. بدین ترتیب که جوانه‌زنی جنین در ۳۵ روز پس از تمام گل هنوز شروع نشده و۴۲ روز پس از تمام گل به ۶۰ درصد رسید. این زمان مصادف با آغاز رسیدن میوه بود، یعنی زمانی که تمایز جنین پایان یافته و جنین‌ها استقلال خود را به دست آورده بودند. میزان جوانه‌زنی جنین در ۴۹ و ۵۶ روز پس از تمام گل به ترتیب به ۸۰ و ۹۵ درصد افزایش یافت. بذرهای رسیده این رقم در حالت معمولی و با ۳ ماه تیمار سرمادهی جوانه‌زنی نداشتند، در ۴ و ۵ ماه تیمار سرمادهی به ترتیب ۱۳/۳۳ و ۲۶/۶ درصد جوانه‌زنی نشان دادند.

نتایج این پژوهش نشان داد که زمان تمایز و استقلال جنین‌ها در رقم زودرس ۲۱ روز و در دورگ (زرددانشکده×سیاه مشهد) شش هفته یعنی ۴۲ روز پس از تمام گل انجام می‌شود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که جوانه‌زنی جنین‌ها ۵۶ روز پس از تمام گل به حداکثر می‌رسد (جدول۳). نتایج این تحقیق با یافته‌های استانیز (Stanys, 1998) و ایوانیکا و پریتوا (Ivanica and Pretova, 1986) مطابقت دارد. آن‌ها گزارش کرده‌اند فقط جنین‌های تمایز یافته تولید دانهال می‌کنند و باید تا زمان تمایز جنین، یعنی شروع رسیدن میوه کشت جنین را به تعویق انداخته و در زمان انتقال جنین نیز اندازهٔ آن از نصف تا یک سوم اندازه نهایی جنین کوچک‌تر نباشد. بالبوآ و همکاران (Balboa *et al*., 1981) مدت تمایز جنین برای ارقام مختلف را متفاوت ذکر کرده‌اند .مثلاً برای رقم مسیریر(Mecirier) این

جدول ۴ – تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی جنین در رقم زرد دانشکده

Table 4. Analysis of variance for germination percentage of Zard-Daneshkadeh cultivar

S.O.V.	منبع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات M.S.
Treatment	تیمار	7	2844.64**
Error	اشتباه	16	10.25
C.V%	ضریب تغییرات		4.66

**: Significant at 1% probability level. **: معنی دار در سطح احتمال ۱٪

مدت را ۳۵ روز از زمان تمام گل ذکر کرده‌اند.

در گزارش پینتو و همکاران (Pinto *et al.*, 1994) در مورد کشت جنین‌های هلو این نکته تاکید شده که جنین‌های برداشت شده در زمان رسیدن میوه جوانه‌زنی مناسب و نهایتاً دانهال‌های مناسبی داشته‌اند و به این نتیجه رسیده‌اند که اندازه جنین با جوانه‌زنی جنین همبستگی دارد، به طوری که هر چه قدر اندازه جنین بزرگ‌تر باشد میزان جوانه‌زنی بیشتر و به دست آوردن دانهال آسان‌تر است. نتایج حاصل از این تحقیق با یافته‌های این محققین منطبق است.

به طورکلی سه مرحله را در رشد و نمو میوهٔ گیلاس می‌توان تشخیص داد. در این مراحل وزن میوه، طول میوه و طول بذر افزایش می‌یابد. در مرحلهٔ اول جنین در مرحلهٔ کروی (Globular) باقی مانده و تقسیمات سلولی در میوه انجام می‌شود. مرحلهٔ دوم رشد میوه که یک مرحلهٔ بحرانی است با تمایز لپه‌ها شروع می‌شود. در طول این مرحله بذر به بیشینه اندازهٔ خود می‌رسد. تمایز لپه‌ها و رشد سریع طول لپه‌ها و جنین از مشخصات بارز این مرحله است. حجم میوه و رشد جنین در طول این مرحله هیچ تغییری نمی‌کند. تمایز لپه‌ها و رشد گسترده جنین از ۱۶ تا ۲۰ روز بسته به رقم فرق می‌کند و در برخی ارقام زودرس حتی هشت روز نیز گزارش شده است. در طول این مرحله رشد جنین‌های ارقام زودرس مانند ارقام دیررس به درجهٔ نهائی می‌رسد با این تفاوت که طول این دوره در ارقام زودرس کمتراز ارقام دیررس است و منحنی رشدی آن‌ها تا حدودی به سیگموئیدی تمایل پیدا می‌کند. افزایش وزن میوه و رشد طول آن دوباره در مرحلهٔ سوم رشد میوه واقع می‌شود ولی اندازهٔ جنین تغییر نمی‌کند و بذر به طرف دورهٔ خواب می‌رود. استانیز (۱۹۹۸) نشان داد که استقلال جنین‌های جدا شده زمانی محقق می‌شود که تمایز جنین انجام شده و مرحلهٔ دوم رشد میوه سپری شده باشد. جنین‌هایی که در شرایط طبیعی به این مرحله رشدی نرسیده باشند در شرایط درون شیشه‌ای نمی‌توانند رشد کنند. این مدت ممکن است از ۲۱ روز در ارقام خیلی زودرس، تا ۴۵ الی ۶۳ روز در ارقام دیررس متفاوت باشد.

نتایج همچنین نشان داد که با افزایش زمان پس از تمام گل میزان جوانه‌زنی جنین‌ها بیشتر شد که

این مسئله به تکامل جنین مربوط می‌شود. با افزایش دوره سرمادهی به خصوص برای جنین‌های بالغ میزان درصد جوانه‌زنی نیز افزایش یافت که این افزایش به القاء خواب در بذرها مربوط می‌شود. این نتیجه با یافته‌های ابو زید و همکاران (Abou-Zeid *et al.*, 1972a,b) مبنی بر این که جنین‌ها پس از گذر از مرحله دوم نمو میوه به دورهٔ خواب وارد می‌شوند مطابقت دارد. این نتایج همچنین با یافته‌های بسی و انفانته (Bassi and Infante, 1994)، بسی و همکاران (Bassi *et al.*, 1985) و امرشاد و رمینگ (Emershad and Ramming., 1994.) که معتقدند درکشت جنین هسته‌دارها به خصوص گیلاس، قرار دادن جنین‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ماه باعث جوانه‌زنی و رشد نرمال جنین می‌شود مطابقت دارد. براک (Braak, 1978) و مارک (Mark, 1994) عامل محدودکنندهٔ رشد جنین در کشت درون شیشه‌ای را مرحله رشدی جنین دانسته و اعتقاد دارند که دانهال‌های سالم از جنین‌هایی به دست می‌آید که رشد کافی داشته باشند. آن‌ها دمای پایین محیط و دیر گلدهی را از عوامل تولید جنین‌های توسعه نیافته ذکر کرده‌اند. به همین دلیل توصیه کرده‌اند که گیاهان مادری در گلخانه کاشته و یا در شرایط کنترل شده قرار داده شوند تا باعث نمو بهتر آندوسپرم جنین درگیاه مادری شده و در نتیجه باعث رشد بهتر جنین شود.

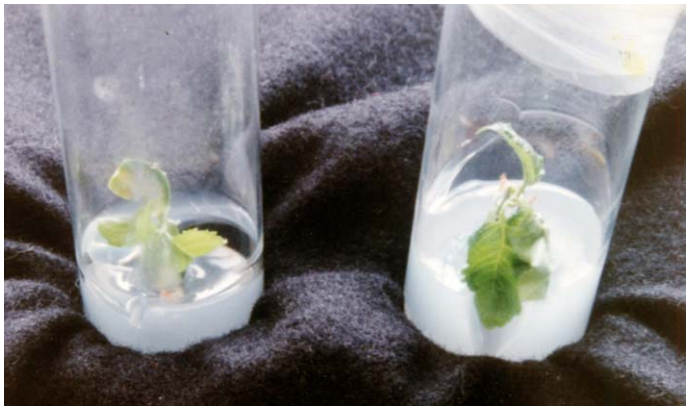
نتایج همچنین نشان داد که جنین‌های بالغ رقم زرد دانشکده با حذف لپه‌ها و بدون تیمار سرمادهی بر روی محیط MS با ۰/۷ گرم در لیتر آگار جوانه‌زنی نداشتند که تائیدی بر وجود خواب در محور جنین گیلاس است، ولی با افزودن ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک (GA3) در همان محیط، جنین‌های بالغ این رقم شروع به جوانه‌زنی کردند (شکل‌های۳ و ۴) و جوانه‌زنی جنین‌ها در این حالت به ۸۰ درصد رسید.

نتایج این بررسی نشان داد که می‌توان بدون تیمار سرمادهی هم جوانه‌زنی جنین‌ها را مورد بررسی قرار داد، ولی این جنین‌ها در مقایسه با جنین‌های لپه‌دار و تیمار شده با سرما رشد ضعیفی داشتند. ضعف رشد به شکل برگ‌های باریک و گیاهچه‌هائی با رشد رویشی کم ظاهر شد. گیاهان ضعیف ریشه‌های فرعی تولید نمی‌کردند ولی اگر نوک ریشه در محیط رشد هرس و قطع می‌شد یا به محیط ریشه‌زایی که حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بود انتقال داده می‌شدند گیاهچه‌ها می‌توانستند ریشه‌های فرعی تولید کنند. این نتایج با یافته‌های بسی وهمکاران (۱۹۸۵) و استانیز (۱۹۹۸) مطابقت دارد.

نتایج حاصل از تیمار جنین‌ها با اسید جیبرلیک با یافته‌های دروجکوفسکایا-ریختر (۱۹۸۵ و ۱۹۷۴) در مورد افزودن GA به محیط کشت جنین جهت افزایش رشد جنین‌ها مطابقت دارد. گزارش‌های ابوزید و همکاران (Abou-Zeid *et al.*, 1972 a,b) و خان (Khan, 1997) در مورد استفاده از اسید جیبرلیک و حضور آن در کشت جنین به خصوص در مواقعی که رکود وجود دارد برای تسریع در رشد جنین نیز نتایج حاصل از این تحقیق را تایید می‌کند. بدین ترتیب می‌توان از جنین‌های سبز شده گیاهچه تولید

شکل۳ – عدم جوانه‌زنی جنین‌های رقم زرد دانشکده بدون تیمار سرمادهی

Fig. 3. The lack of embryos germination of Zard-Daneshkadeh cultivar without stratification treatment



شکل۴- رشد جنین‌های رقم زرد دانشکده در محیط کشت حاوی هورمون جیبرلین (GA3)

Fig. 4. The growth of embryos of Zard-Daneshkadeh cultivar in the culture medium. containing GA3.

وهیبرید مورد نظر را حفظ کرد.

از زمانی که توکی در سال‌های ۱۹۳۴ تا ۱۹۳۳ توانست جنین بدون آندوسپرم در گیاهان هسته‌دار را نجات داده و دانهال‌های زنده از آن‌ها به دست آورد کشت جنین پیشرفت قابل ملاحظه‌ای کرد و تاکنون ارقام متعددی در دنیا با استفاده از این روش تولید شده‌اند که به عنوان مثال می‌توان به دو رقم هلوی زودرس گلدکریست (Gold Creast) و می‌فیرنکتارین (May fair nectarin) که به طریق کشت جنین حاصل شده‌اند و جزو زودرس‌ترین ارقام تجارتی آمریکا محسوب می‌شوند اشاره کرد. از طرفی دیگر با توجه به طولانی بودن مراحل

جوانه‌زنی بذرهای حاصل از دورگ‌گیری که شامل برداشت میوه‌ها در فصل رسیدن میوه، حذف میانبر و برون‌بر (Exocarp) میوه‌ها، سرمادهی بذرها در دمای پائین به مدت چندین ماه در طول زمستان و یا در یخچال (۲ الی ۷ درجهٔ سانتی‌گراد) و جوانه‌زنی بذرها در بهار آینده است (Susan *et al*., 1996)، دانهال چندین ماه پس از برداشت میوه به دست می‌آید و تقریباً بیشتر مواد به دست آمده تلف می‌شوند. همچنین با توجه به این که تنها تعداد کمی از گل‌های گرده‌افشانی شده به میوه تبدیل می‌شوند بهره‌گیری از روش کشت جنین و کمک به جوانه‌زنی جنین‌ها در شرایط درون شیشه‌ای (*In vitro*) به منظور غلبه بر این مشکلات و دست‌یابی به تعداد دانهال مورد نیاز یک انتخاب ضروری است. به این وسیله دانهال‌ها در دورهٔ زمانی کوتاهی به دست آمده و طول دوره اصلاحی کاهش می‌یابد، به طوری که می‌توان بذرهای جمع‌آوری شده در طول همان فصل را وادار به جوانه‌زنی کرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از آقای محمد عرفت پور کارشناس آزمایشگاه باغبانی واحد علوم و تحقیقات تهران وآقای مهندس غفاری به دلیل راهنمائی در تجزیه‌های آماری و همچنین از مسئولین باغ تحقیقاتی کمال‌آباد موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تشکر وقدردانی می‌شود.

References

Abou-Zeid, A., Gruppe, W., and Neumann, K.H. 1972a. A method of growing normal cherry seedlings from embryo axes. Gartenbauwissenschaft 37(19):399-407.

Abou-Zeid, A., Gruppe, W., and Neumann, K.H. 1972b. The growth of cherry embryos of various species varieties depending on the extent of embryo development, temperature exposure and nutrient medium. Gartenbauwissenschaft 37(3):225-238.

Arzani, K. 1998. The position of cherry culture and breeding in Iran. Proceedings of the Anniversary Conference of the Hungarian Sweet Cherry Breeding, Anniversary Conference. Budapest, Hungary, pp. 55-64.

Balboa, Z. O., Gil, S. G., and Valenzuela, C. W. 1981. Germination of immature embryos of sweet cherry cultured *in vitro*. Ciencia e Investigation Agraria 8 (1):65-67.

Balla, I., and Brozik, S. 1996. Embryo culture of sweet cherry hybrids. Acta Horticulturae 410: 385-386.

Bassi, D., Gaggioli, D., and Montalti, P. 1985. Chilling effect on development of immature peach and sweet cherry embryos. Efficiency in Plant Breeding. Proceedings of the 10th Congress of the European Association for Research on Plant Breeding, Wageningen, the Netherlands. 19-24 June. Page 293.

Bassi, D., and Infante, R. 1994. Embryo culture experiments in peach and cherry breeding. Rivista di Frutticolturae di Ortofloricoltura 56(7/8) 65-70.

Braak, J.P. 1978. The effect of flowering date and temperature on embryo development in sweet cherry (*p.avium* L.). Netherlands Journal of Agricultural Science 26:13-30.

Emershad, R.L., and Ramming, D. W. 1994. Effects of media on embryo enlargement, germination and plant development in early-ripening genotypes of prunus grown *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 37: 55-59.

Fathi, H., and Arzani, K. 1999. Germination evaluation of hybrid seeds of some sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. Abstract Book of the Second Iranian Horticultural Congress. 19 – 21 September, Karaj, Iran. Page 303.

Fathi, H., Arzani, K., Khalighi, A. and Ebadi A. 2002. The application of embryo culture in sweet cherry (*Prunus avium* L.) breeding. Abstract Book of the Third Iranian Horticultural Congress. 31 August – 2 September, Karaj, Iran. Page 355.

Ghoharkhay, S. 1991. Investigation and selection of suitable pollinizer for four commercial cultivars of sweet cherry. Seed and Plant 9 (3 and 4): 30-34 (in Farsi).

Goharkhay, S. 1992. The evaluation of fruit quantitative and qualitative characteristics and vegetative performance of sweet cherry cultivars and determination of correlations between some of evaluated traits. Seed and Plant 8 (3 and 4): 39-44 (in Farsi).

Hormaza, J. I. 1999. Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture. Scientia Horticulturae 79:121-126.

Ivanica, J., and Mokra, A. 1982. Development and cultivation of early-ripening cherry embryos. Biologia Czechoslovakia 37: 1, 3-12.

Ivanica, J., and Pretova, A. 1986. Cherry. pp. 154-169. In: Bajaj, Y. P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. 1: Trees. Springer Verlag, Berlin.

Khan, A. A. 1997. Quantification of seed dormancy: Physiological and molecular considerations. HortScience 32:609-614.

Mark, P. B. 1994. A review of plant embryo culture. HortScience 29: 1243-1246.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Phisiologia Plantarum Plantanum 15: 473-497.

Pinto, A.C.Q., Dethier Rogers, S.M., and Byrne, D.H. 1994. Growth of immature peach embryos in response to media, ovule supports method and ovule perforation. Hort Science 29: 1081.

Ramming, D. W. 1985. In ovulo embryo culture of early maturing prunus. HortScience 20: 419-420.

Ramming, D. W. 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. HortScience 25: 393-398.

Schmidt, H., and Ketzel, A. 1993. Regeneration of adventitious shoots *in vitro* in cherries. IV. Use of adventitious shoot regeneration of cotyledons and "embryo rescue" in cherry breeding. Gartenbauwissenschaft 58(2): 64-67.

Schmidt, H., and Ketzel, A. 1996. *In vitro* culture techniques in sweet cherry breeding. Acta Horticulturae 410: 111-114.

Seify, E. and Arzani, K. 1999. The study of compatibility and incompatibility of some sweet cherry cultivars in fertilization and fruit set of sweet cherry cv. Siah Mashhad. Seed and Plant 14 (4): 30-38 (in Farsi).

Susan, K., Borwn, A., Iezzoni, A.F., and Harold, W. F. 1996. Cherries. pp. 213-255. In: Janick, J., and Moore, N.J.N. (eds.). Fruit Breeding. Vol. 1. Tree and Tropical Fruits. JohnWiely & Sons, London.

Stanys, V. 1998. *In vitro* techniques to increase the output of cherry seedlings from early-ripening parents. Acta Horticulturae 468: 203-208.

Zdrujkovskaja-Rikhter, A. I. 1974. Obtaining early-ripening forms of sweet cherry (*Prunus avium* L.) Moench from embryos by cultivation *in vitro*. Dokl Sov Ochenykh K XIX Mezhdunar. Kongr Po Sadovodst Varshava 82-85.

Zdrujkovskaja-Rikhter, A. I. 1985. *In vitro* culture of excised embryos and ovules of (*Prunus avium* L.) Moennch. Doklady Akademii Nauk SSSR 283(1): 246-249.