یافته های نوین کشاورزی
سال دوم- شماره۲- زمستان ۱۳۸٦

مطالعه سیتولوژیکی و تعیین سطوح پلوئیدی در بعضی از گیاهان بذری دورگ کترا ۱۰ مرکبات

مهران محمودی *، عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله آملی
محمود خسروشاهلی، دانشیار دانشکده علوم پایه دانشگاه تبریز
عبدالرسول ذاکرین، استادیار دانشگاه آزاداسلامی واحد جهرم

چکیده

بررسی سطح پلوئیدی پایه های مرکبات شمال ایران که تعدادی از آنها دارای ویژگی های خاصی هستند می تواند کمک موثری در به نژادی ارقام پرمحصول و کیفی مرکبات مفید باشد. دراین رابطه شش دورگ طبیعی مرکبات بومی از ایستگاه کترای مازندران وابسته به مرکز تحقیقات مرکبات کشوردر رامسر انتخاب و از شماره ۷ تا ۱۲ نشانه گذاری شدند. این گیاهان حاصل بذور یک دورگ به نام کترا ۱۰ بوده و پس از ریشه دار شدن مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از روش له کردن ریشه ها و رنگ آمیزی آنها با استواورسئین، نتایج زیر حاصل شد. مطالعات مورفولوژیکی دورگ ها آنها را در رده شبه بالنگ قرار داد. تعدادکروموزوم ها در همه دورگ ها 2n=2x=18 بوده اند. بررسی مورفولوژیکی کروموزوم ها در رده شبه بالنگ نشان داد که آنها متاسانتریک با چند استثنای ساب متاسانتریک بودند و طول نسبی کروموزوم ها بین ۷ تا۳۲ درصد متغیر بوده است، در نتیجه تفاوت چندانی از نقطه نظر اندازه و مورفولوژی کروموزوم ها نداشتند. خصوصیات کاریوتیپی با توجه به همگن بودن کاریوتیپ و عدم وجود گوناگونی بین کروموزوم ها در این کاریوتیپ ها، نشانگر آن است که این دورگ ها در مراحل اولیه تکامل فیلوژنی می باشند.

واژه های کلیدی: مرکبات، سیتولوژی، سطح پلوئیدی، کاریوتیپ

* نویسنده رابط: E-mail: mehran.mahmoudi @yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله:۸۷/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/٤/۱۱

مقدمه

مرکبات، گیاهانی همیشه سبز هستند که از میوه آنها جهت تغذیه و از گل و برگ و پوست انواع مختلف آنها جهت تهیه عطر استفاده می شود (۱). مرکبات از تیره روتاسه ، زیر تیره اورانتئیده ، قبیله سیتره و زیر قبیله سیترینه می باشد. جنس های مختلف مرکبات شامل *Citrus*، *Poncirus*، *Fortunella*، *Microcitrus* و *Eremocitrus* است (۲). اغلب جنس های مرکبات دگرگشن هستند ولی از ویژگی های این دسته از گیاهان به ویژه جنس سیتروس، تولید بذور به طریق آپومیکسی می باشد یعنی بذوری که بدون دخالت گامت جنس نر (دانه گرده) تولید شده اند. مهمترین گونه های اهلی سیتروس، پرتقال، نارنگی، لیمو شیرین، لیمو ترش،گریپ فروت، بالنگ، نارنج، دارابی و شداک می باشند (۱). با توجه به اهمیت تعیین سطوح پلوئیدی در تدوین برنامه های اصلاحی از نظر بهره گیری از ویژگی های برتر ارقام پلی پلوئید و اهمیت این موضوع برای موسسه تحقیقات مرکبات و هم از نظر راه اندازی استفاده از یک روش ساده و سریع برای تعیین سطح پلوئیدی، پژوهش حاضر برنامه ریزی شد. توسعه تکنولوژی های جدید بر اساس امتزاج و کشت پروتوپلاست، هیبریدهای سوماتیکی را تولید نموده است. که تا حد زیادی در جهت اصلاح پایه ها و ارقام به کار می رود (۳). تکنیک های دور رگ گیری سوماتیکی برای مرکبات به خوبی توسعه یافته و درجهت تسهیل اصلاح پایه و پیوندک های این گیاهان به کار می رود. هیبریدهای سوماتیکی مرکبات، به روش غیر جنسی تکثیر و می تواند به عنوان پایه والد اصلاح شده تتراپلوئید بکار رود (٤).

کروموزوم های مرکبات کوچک هستند (درحدود دو میکرومتر طول در متافاز اول میوز) و برای مطالعات گسترده چندان مناسب نیستند. ولی با به کارگیری روش های مناسب آزمایشگاهی، می توان اقدام به این کار کرد (٦). در مرکبات و جنس های وابسته مثل *Microcitrus*، *Poncirus*، *Fortunella*، *Ormocitrus*، *Citropsis*، *Moraya* و دیگر جنس های طبیعت، دیپلوئیدی (2n=2x=18) یک قاعده کلی است، با این وجود سطوح پلوئیدی بالاتر هم مشخص و تولید شده است. نخستین فرم پلی پلوئیدی مشخص شده، کومکوآت هنگ کنگ ویلد تتراپلوئید بود. سپس تتراپلوئیدهای اتفاقی در مرکبات تشخیص داده شد و تریپلوئیدها از نتایج بذر والدهای دیپلوئید به وجود آمدند. تعدادی آنئوپلوئیدی و تعداد کمی نیز با سطوح پلوئیدی بیشتر گزراش شده است (۵). طبق گزارش رز وهمکاران (۱۹۹۸) مرکبات و گونه های وابسته معمولاً دیپلوئید هستند و تعداد کروموزوم آنها 2n=2x=18 می باشد به جز برخی پلی پلوئیدی هایی که یافت شده اند مانند کومکوآت هنگ کنگ ویلد و لایم بری که تتراپلوئید هستند و تاهیتی لایم، که تریلپوئید است (۱۸). طبق گزارش های وردی (۲۰۰۲) لاین های کالوس های خورشی جنین از تخمک های هفت گونه مرکبات توسعه یافته شامل یک رقم نارنج، دو رقم پرتقال، سه رقم نارنگی و یک رقم گریپ فروت، پروتوپلاست های این سلول ها (به شکل گیاهان اصلی، تحت تاثیر عواملی چون

تثبیت کننده های اسمزی، اکسین های سنتیک، آنزیم ها و قندهای گوناگون) باززایی شدند که همه کالوس های به دست آمده دیپلوئید بودند (۲۲). سلیتو و پیو (۲۰۰۰) در مطالعات سیتولوژیکی سه کولتیوار پرتقال، سطح پلوئیدی آنها را دیپلوئید گزارش کردند (۲۱). زو و همکاران (۲۰۰٤) در مطالعه کاریوتیپ بالنگ، سطح پلوئیدی آن را گزارش کردند (۲۰۰۳). جکسون و شرمن (۲۰۰۵) تعداد کروموزوم تاهیتی لایم را 2n=3x=27 گزارش کرد (۱۲). خوروشویلی و تاکیدز سطح پلوئیدی لیموی گئورگیان را دیپلوئید گزارش کردند (۱٤). سارانتینو و کاروزو (۲۰۰۳) در تعیین سطوح پلوئیدی واریته های گوناگون پایه سیترنج، تعداد کروموزوم این دورگ را 2n=2x=18 گزارش کردند (۲۰). گروسر وگمیتر (۲۰۰۰) سطح پلوئیدی تانجلونوا و نیز دورگ های دیگری شامل سیترنج و سیتروملو را دیپلوئید ونتایج حاصله بین شداک و نارنگی و شداک و پرتقال را تتراپلوئید (2n=4x=36)گزارش کردند (۱۱). مکدر و همکاران (۱۹۹۸) طی آزمایش هایی سطح پلوئیدی پرتقال، لیمو، لایم، نارنگی و گریپ فروت را دیپلوئید و سطح پلوئیدی تاهیتی لایم را تریپلوئید و کومکوآت را تتراپلوئید گزارش کردند (۱۵). گروسر و همکاران (۱۹۹۸) سطح پلوئیدی دورگ های تانجلونوا و تانجلو مینئولا و همچنین نارنگی انشو و پرتقال را دیپلوئید گزارش کردند (۹). چن و سونگ (۱۹۹۹) سطح پلوئیدی نارنج سه برگ (گوانیون) را تتراپلوئید گزارش کردند(٤). ادریس (۲۰۰۲) طی آزمایش هایی سطح پلوئیدی گریپ فروت را دیپلوئید گزارش کرد (۵). جرمن و همکاران (۲۰۰٤) در آزمایشی سطح پلوئیدی نارنگی کلمانتین را دیپلوئید گزارش کردند (٦). سایتو و همکاران (۲۰۰۱) در آزمایشی سطح پلوئیدی لایم را دیپلوئید گزارش کرد (۱۹). اهگاوارا و همکاران (۲۰۰۵) سطح پلوئیدی دورگ حاصل از تلاقی نارنج سه برگ و پرتقال را 2n=4x=36 گزارش کردند (۱٦).

کروموزوم ها از نظر قرار گرفتن سانترومرشان در پنج گروه متاسانتریک، ساب متاسانتریک، آکروسانتریک، ساب تلوسانتریک و تلوسانتریک قرار می گیرند. در کروموزم های متاسانتریک، سانترومر در مرکز در کروموزوم های ساب متاسانتریک، سانترومر نزدیک به مرکز، در کروموزوم های آکروسانتریک، سانترومر از مرکز فاصله گرفته، در کروموزوم های ساب تلوسانتریک، سانترومر نزدیک به نوک و درکروموزوم های تلوسانتریک، سانترو مر دقیقاً در نوک کروموزوم قرار دارد. کروموزوم های مرکبات اولیه و شبه مرکبات از نوع متاسانتریک و ساب متاسانتریک بوده، که در روند تکامل گیاهی، کروموزوم های نوع آکروسانتریک، ساب متاسانتریک و متاسانتریک، در مرکبات امروزی پدید آمده است.

مواد و روش ها

بذور مورد نیاز برای آزمایش ها، از کلکسیون دورگ های موجود در ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا جمع آوری، سپس به بخش ژنتیک و ذخایر توارثی موسسه تهیه و اصلاح بذور و نهال و سبزی منتقل

گردید. این دورگ ها حاصل کاشت بذرهای نوعی از مرکبات شمال به نام کترا ۱۰ و سپس تلقیح طبیعی می باشد. کترا ۱۰ خود نوعی دورگ با والدین ناشناخته می باشد. بذرهای دورگ های مورد نظر با ذکر شماره و برچسب در درون پتری دیش ها قرار داده شد. پتری دیش های جداگانه حاوی کاغذ صافی مرطوب در حرارت ۲۵ درجه سلسیوس تحت شرایط کنترل شده در فیتوترون قرار داده شد. پس از ظهور ریشه ها، نوک ریشه ها به طول تقریبی یک سانتی متر جدا شدند. سپس جهت پیش تیمار، هر نمونه در یک میکروتیوپ حاوی محلول کلشی سین ۲٪ به همراه یک قطره دی متیل سولفو کساید قرار داده شد، سپس نمونه ها در فیتوترون ۲۵ درجه به مدت ٤ ساعت قرار داده شد. برای شستشو در ثابت کننده، نمونه ها در سه مرحله چند ثانیه ای در محلول الکل – اسید استیک (نسبت ۳ به ۱ اتانول ۹٦٪ به اسید استیک ۹۸٪) شستشو گردیدند تا اثر محلول پیش تیمار به کلی حذف و از عدم وجود پیش تیمار اطمینان حاصل گردد. سپس ریشه بذور جوانه زده به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق (۲۰ الی ۲۵ درجه سلسیوس) در محلول ۳ به۱ الکل– اسید استیک جهت ثابت کردن قرار داده شد. ثابت کردن جهت توقف فعالیت های بیوشیمیایی سلول می باشد. در مرحله بعدی نوک ریشه ها با آب یخ شستشو شده و ریشه ها از محلول ثابت کننده پاک گردیده مدت آن ۱۵ الی ۳۰ دقیقه و در۳ مرحله ۵ الی ۱۰دقیقه ای عملی گردید. سپس نمونه ها در محلول ۳ به ۱ الکل و اسید استیک به مدت حداقل ٦ ساعت در حرارت ٤ درجه سلسیوس درون یخچال قرار داده شد. پس از آن در مرحله تکرار شستشو با آب، نمونه ها به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه در سه مرحله ۵ الی ۱۰ دقیقه ای در آب یخ قرار داده شد تا اثرات محلول ثابت کننده حذف شود. سپس جهت نرم کردن و هضم دیواره سلولی، نخست نوک ریشه ها با اسکالپل درحد میلی متری جدا و به مدت سه الی چهار ساعت در آنزیم سلولازین ۲٪ در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس در فیتوترون قرارگرفت. در مرحله بعدی، نوک ریشه های جدا شده به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه در سه مرحله ۵ الی ۱۰ دقیقه ای در آب یخ شستشو شدند. سپس نوک ریشه های جدا شده به مدت سه دقیقه در اسید استیک ٤۵ درصد قرار داد ه شد. در مرحله رنگ آمیزی، نمونه ها به مدت یک روز در دمای اتاق و پس از آن در حرارت ٤ درجه سلسیوس یخچال در استواورسئین نگهداری و پس از این مدت به اسید استیک ٤۵ درصد جهت شستشو منتقل گردید. سپس جهت له کردن (تکنیک اسکوآش) نوک ریشه ها روی لام در یک قطره اسید استیک ٤۵ درصد قرار داده شد و بعد نوک ریشه ها با یک وسیله تیز به چند بخش تقسیم و پس از آن به مدت چند ثانیه روی حرارت چراغ الکلی نگه داشته شد و بعد نوک ریشه ها با یک وسیله تیز به چند بخش تقسیم و پس از آن به مدت چند ثانیه روی حرارت چراغ الکلی نگه داشته شد و بعد به صورت خیلی آرام نوک ریشه ها له شد و آن گاه لامل روی آن قرار گرفت و با وسیله ای مانند اسکالپل فشاری روی آن وارد آمد تا لامل به لام بچسبد. آنگاه تکه ای از کاغذ صافی روی آن قرار داده شد و پس از حذف اسید استیک اضافی به آرامی روی آن فشار آورده، تا کاملاً له گردد. به طور کلی،

له کردن جهت از بین بردن دیواره سلولی و جدا کردن سلول ها برای مطالعه می باشد. چنانچه دقت و ملاحظه کافی در تکنیک له کردن صورت نگیرد، احتمال اینکه نمونه ها به عنوان نمونه های آنئوپلوئید در زیر میکروسکوپ مشاهده شوند زیاد است. یعنی همیشه احتمال تغییراتی به علت دست کاری سلول ها وجود دارد و ممکن است تعداد کروموزوم ها کمتر از تعداد کامل دیده شود. پس از له کردن، دور لامل یک قطره از مخلوط روغن گلیسیرین و اسید استیک ۹۸ درصد به نسبت ۱ به ۱ ریخته شد تا نمونه مورد نظر برای مطالعات بعدی قابل رؤیت باشد و دوام نمونه برای مطالعه کروموزومی بیشتر به دست آید. برای هر یک از دورگ ها برای آزمایش یک درخت در نظر گرفته شد. دورگ شماره ۷، یک شبه بالنگ با مشخصات گیاهی تنه درخت تقریباً کوتاه، درخت کم ارتفاع و دارای تیغ های بزرگ با تعداد زیاد و برگ های کشیده و دمبرگ پهن، میوه گرد با پوست نسبتاً ضخیم لیمویی روشن می باشد. در دورگ شماره ۷ دو نمونه مورد مشاهده قرار گرفت. یعنی دو نوک ریشه در زیر لامل به طور جداگانه مشاهده و با استفاده از میکروسکوپ نوری اقدام به شمارش گردید. در نمونه اول در ۲۵ سلول و در نمونه دوم در ۱۳ سلول تعداد کروموزوم شمارش گردید.

دورگ شماره ۸، یک شبه بالنگ با مشخصات گیاهی تنه درخت کوتاه و گستردگی شاخ درخت زیاد، پر تیغ با تیغ های بزرگ، برگ های کشیده با دمبرگ باریک، میوه بزرگ کشیده با پوست ضخیم لیمویی رنگ می باشد. در دورگ شماره ۸ ، شش نمونه مورد آزمایش قرار گرفتند. در نمونه اول در ۲ سلول، در نمونه دوم در۲٦ سلول، در نمونه سوم در ۲۱ سلول در نمونه چهارم در ٤ سلول، در نمونه پنجم در ۱٦ سلول و در نمونه ششم در ۳۱ سلول تعداد کروموزوم شمارش گردید. دورگ شماره ۹، یک شبه بالنگ با مشخصات گیاهی تنه درخت روشن و کوتاه، درخت پر تیغ با تیغ های بلند، برگ های کشیده با دمبرگ کوتاه و میوه بزرگ با پوست نسبتاً ضخیم با رنگ لیمویی روشن می باشد. در دورگ شماره ۹ شش نمونه مورد برسی قرارگرفتند. در نمونه اول ۲۵ سلول در نمونه دوم در ٤ سلول، در نمونه سوم در ۱٦ سلول، در نمونه چهارم در ۵ سلول و در نمونه ٦ در ۱۵ سلول شمارش کروموزومی انجام شد. دورگ شماره ۱۰ یک شبه بالنگ با مشخصات گیاهی تنه درخت کوتاه با شاخه های منشعب کم تیغ با تیغ های کوچک، برگ های کشیده و پهن با دمبرگ باریک و میوه بزرگ کشیده شده با پوست ضخیم لیمویی رنگ می باشد. در دورگ شماره ۱۰ سه نمونه مورد بررسی قرا رگرفتند. در نمونه اول در ۱۰ سلول، در نمونه دوم در ٤ سلول و در نمونه سوم در ۱۵ سلول شمارش کروموزومی انجام شد.

دورگ شماره ۱۱، یک شبه بالنگ با مشخصات گیاهی تنه درخت کوتاه دارای تیغ های نسبتاً کوچک به تعداد زیاد، برگ های کشیده و پهن با دمبرگ باریک و تاج درخت گسترده، و میوه بیضوی با پوست ضخیم لیمویی روشن می باشد. در دورگ شماره ۱۱ دو نمونه آزمایش قرارگرفتند. در نمونه اول در ۱٦ سلول و در نمونه دوم در ٦۱ سلول، شمارش کروموزومی انجام شد.

دورگ شماره ۱۲، یک شبه بالنگ بوده با مشخصات گیاهی تنه درخت کوتاه با شاخه های منشعب، درخت پرتیغ با تیغ های بزرگ، برگ های کشیده و پهن با دمبرگ پهن و میوه گرد و یا بیضوی با پوست نسبتاً ضخیم لیمویی رنگ می باشد. در دورگ شماره ۱۲، شش نمونه آزمایش قرارگرفت. در نمونه اول در ۲٤ سلول، در نمونه دوم در ٦ سلول، در نمونه سوم درهفت سلول، در نمونه چهارم در ۳ سلول، در نمونه پنجم در شش سلول و در نمونه ششم در۹۷ سلول شمارش کروموزومی انجام گردید.

جدول ۱: ویژگی های مورفولوژیکی دورگ های مورد مطالعه

تعداد تیغ	فرم تیغ	رنگ میوه	فرم میوه	فرم دمبرگ	فرم برگ	تیپ رشد	وضعیت تنه	نوع گونه	شماره دورگ
زیاد	بزرگ	لیمویی روشن	گرد	پهن	کشیده	کم ارتفاع	کوتاه	شبه بالنگ	۷
زیاد	بزرگ	لیمویی	بزرگ و کشیده	باریک	کشیده	تاج گسترده	کوتاه	شبه بالنگ	۸
زیاد	بلند	لیمویی روشن	کشیده	کوتاه	کشیده	کم ارتفاع	کوتاه	شبه بالنگ	۹
زیاد	کوچک	لیمویی	بزرگ و کشیده	باریک	بزرگ و کشیده	شاخه های منشعب	کوتاه	شبه بالنگ	۱۰
زیاد	کوچک	لیمویی	بیضوی	باریک	پهن وکشیده	تاج گسترده	کوتاه	شبه بالنگ	۱۱
زیاد	بزرگ	لیمویی	گرد و یا بیضوی	پهن	پهن و کشیده	شاخه های منشعب	کوتاه	شبه بالنگ	۱۲

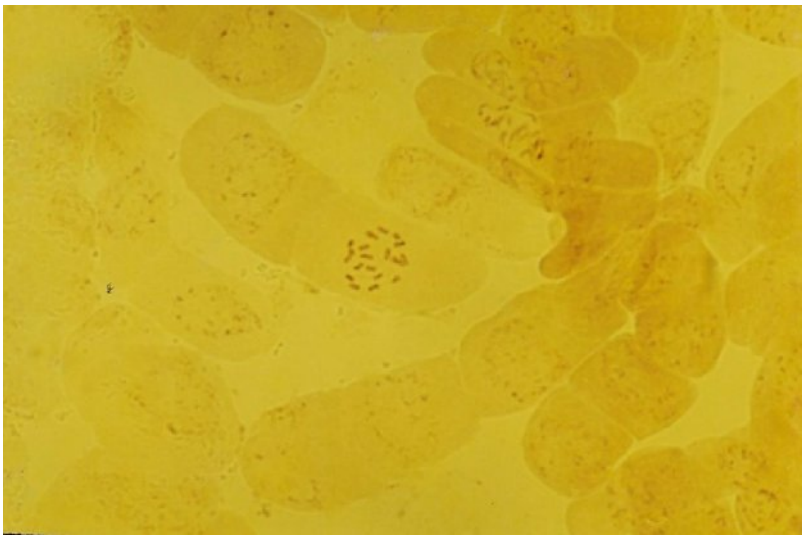
نتایج و بحث

تعداد کروموزوم ها، وضعیت کروموزوم ها و نوع کروموزوم ها بر اساس نسبت بازوی بلند و کوتاه تعیین شدند. مطالعات سیتولوژیکی روی دورگ شماره ۷ نشان داد که سطح پلوئیدی این دورگ، دیپلوئید و تعداد کروموزوم $2n=2x=18$ می باشد. از مجموع ۹ کروموزم پایه، ۸ کروموزوم متاسانتریک و ۱ کروموزوم ساب متا سانتریک است و هیچ کروموزوم آکروسانتریک، ساب تلوسانتریک و تلوسانتریکی مشاهده نگردید (جدول ۲). مطالعات سیتولوژیکی نشان داد که سطح پلوئیدی دورگ شماره ۸ دیپلوئید وتعداد کروموزوم در این دورگ $2n=2x=18$ می باشد. از مجموع ۹ کروموزم پایه، ۷ کروموزوم پایه، ۷ کروموزوم آن متاسانتریک و ۲ کروموزوم ساب متا سانتریک بوده و هیچ کروموزوم آکروسانتریک، ساب تلوسانتریک و تلوسانتریکی مشاهده نگردید (جدول ۳).

مطالعات سیتولوژیکی بر روی دورگ شماره ۹ نشان داد که سطح پلوئیدی این دورگ دیپلوئید می باشد. از مجموع ۹ کروموزوم پایه، ۸ کروموزوم آن متاسانتریک و یک کروموزوم ساب متاسانتریک بود (جدول ٤). مطالعات سیتولوژیکی برروی دورگ شماره ۱۰ نشان داد که سطح پلوئیدی دورگ پلوئید است.

جدول ۲: تجزیه کاریوتیپ دورگ شماره ۷

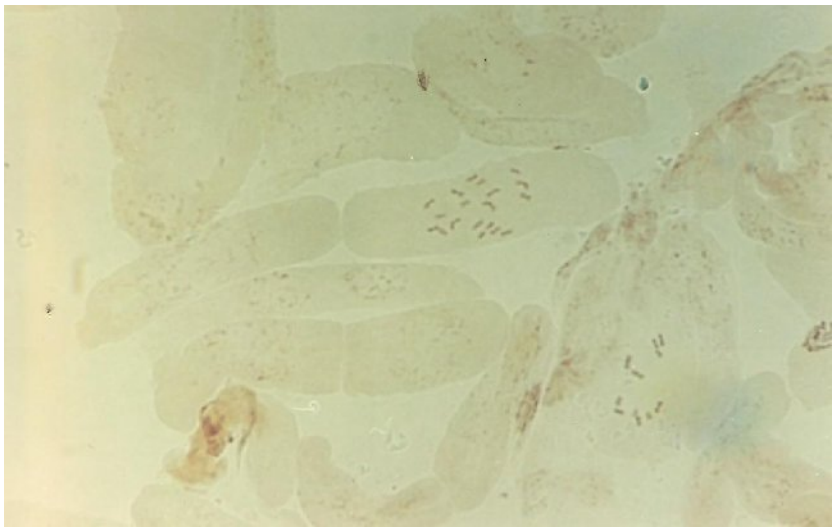
نوع کروموزوم	نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه	شاخص سانترومری (درصد)	طول نسبی (درصد)	شماره کروموزوم
متاسانتریک	۱	۵۰	۱٤	۱
متاسانتریک	۱/۲۰	٤۵	۱۳	۲
ساب متاسانتریک	۲	۳۳	۱۲	۳
متاسانتریک	۱	۵۰	۱۲	٤
متاسانتریک	۱/۳۷	٤۱	۱۱	۵
متاسانتریک	۱/٤۹	٤۱	۱۰	٦
متاسانتریک	۱	۵۰	۹	۷
متاسانتریک	۱	۵۰	۸	۸
متا سانتریک	۱/٤۰	٤۱	۷	۹



شکل ۱- پلاک متافازی دورگ کترا ۷

جدول ۳: تجزیه کاریوتیپ دورگ شماره ۸

نوع کروموزوم	نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه	شاخص سانترومری (درصد)	طول نسبی (درصد)	شماره کروموزوم
متاسانتریک	۱/۵۰	۲۰	۳۰	۱
متاسانتریک	۱/٦۸	۲۵	۳۹	۲
ساب متاسانتریک	۱/۵۵	۲۹	۲۸	۳
متاسانتریک	۱/۷۱	۲٦	۲۳	٤
متاسانتریک	۱/٦٦	۲۷	۱۹	۵
متاسانتریک	۱/۱٤	۲٦	۱۸	٦
متاسانتریک	۱/۸۰	۲۵	۱۷	۷
متاسانتریک	۱	۵۰	۱۷	۸
متا سانتریک	۱/۱٦	۲٦	۱۵	۹

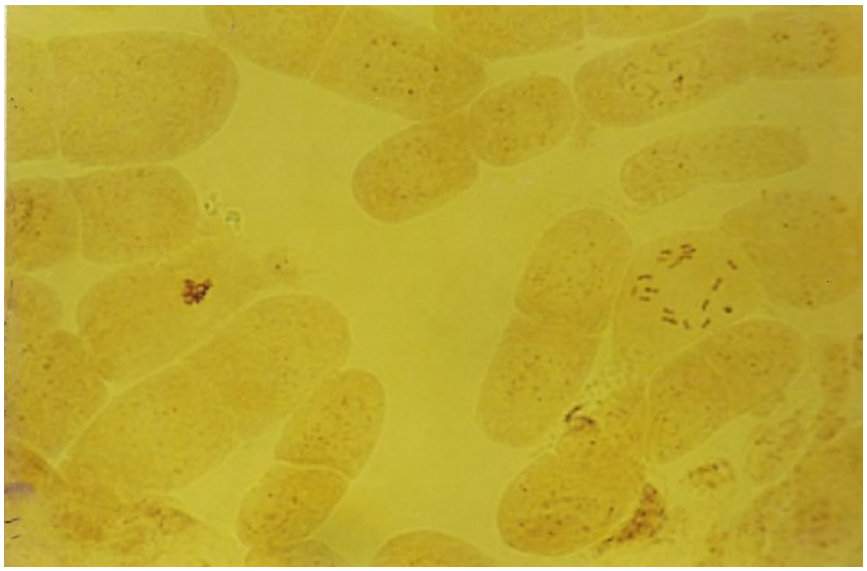


شکل ۲- پلاک متافازی دورگ کترا ۸

از مجموع ۹ کروموزوم پایه، هر ۹ کروموزوم آن متاسانتریک بوده هیچ کروموزوم دیگری مشاهده نگردید (جدول۵).

جدول ٤: تجزیه کاریوتیپ دورگ شماره ۹

نوع کروموزوم	نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه	شاخص سانترومری (درصد)	طول نسبی (درصد)	شماره کروموزوم
متاسانتریک	۱/٤۲	۱٤۱	۲۸	۱
متاسانتریک	۱/۱۲	٤۷	۲۸	۲
ساب متاسانتریک	۱/٦٤	٤٦	۲۵	۳
متاسانتریک	۱	۵۰	۲۳	٤
متاسانتریک	۱/۱٦	٤٦	۲۱	۵
متاسانتریک	۲	٤۳	۲۰	٦
متاسانتریک	۱/٤۰	٤۱	۲۰	۷
متاسانتریک	۱/۲۰	٤۵	۱۸	۸
متا سانتریک	۱	۵۰	۱۳	۹



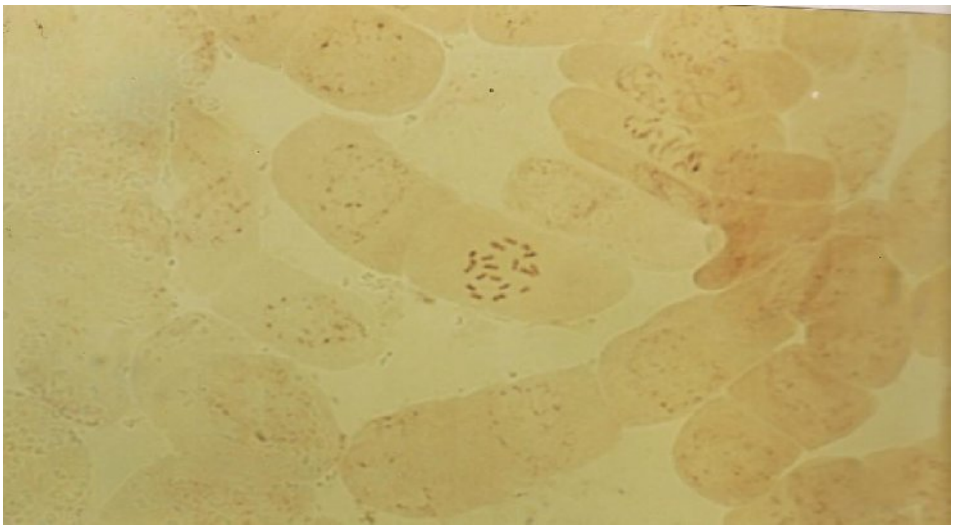
شکل ۳- پلاک متافازی دورگ کترا ۹

مطالعات سیتولوژیکی بر روی دورگ شماره ۱۱ نشان داد که سطح پلوئیدی این دورگ دیپلوئید است. از مجموع ۹ کروموزوم پایه،٦ کروموزوم آن متاسانتریک و ۳ کروموزوم متاسانتریک بوده و هیچ کروموزم دیگری مشاهده نگردید (جدول ٦).

مطالعات سیتولوژیکی روی دورگ شماره ۱۲ نشان داد که سطح پلوئیدی ای دورگ دیپلوئید می باشد. از مجموع ۹ کروموزوم پایه، ۸ کروموزم آن متاسانتریک و یک کروموزوم ساب متاسانتریک بود (جدول ۷).

جدول ۵: تجزیه کاریوتیپ دورگ شماره ۱۰

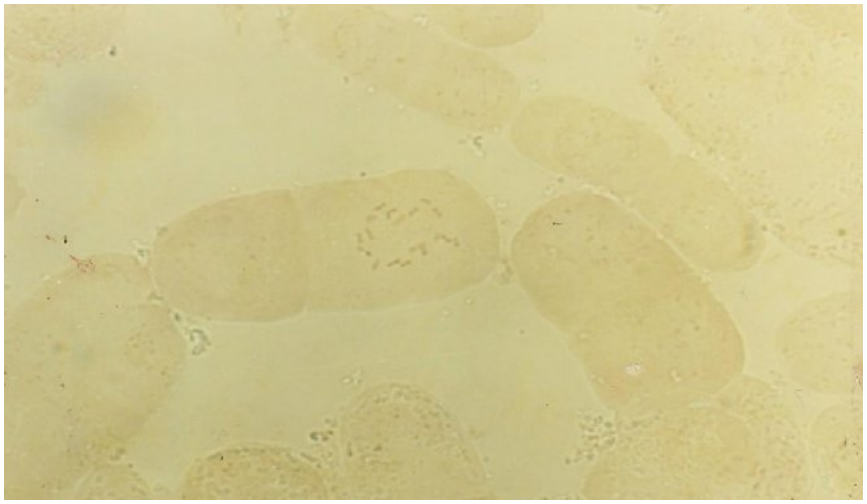
نوع کروموزوم	نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه	شاخص سانترومری (درصد)	طول نسبی (درصد)	شماره کروموزوم
متاسانتریک	۱	۱۵۰	۱۱۳	۱
متاسانتریک	۱/٦۰	۳۸	۱۲	۲
ساب متاسانتریک	۱/۵۰	٤۰	۷	۳
متاسانتریک	۱	۵۰	۱۰	٤
متاسانتریک	۱/۲۰	٤۵	۱۲	۵
متاسانتریک	۱/۵۰	٤۰	۱۵	٦
متاسانتریک	۱	۵۰	۹	۷
متاسانتریک	۱/۲۵	٤٤	۱۱	۸
متا سانتریک	۱	۵۰	۱۰	۹



شکل ٤- پلاک متافازی دورگ کترا ۱۰

جدول ٦: تجزیه کاریوتیپ دورگ شماره ۱۱

نوع کروموزوم	نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه	شاخص سانترومری (درصد)	طول نسبی (درصد)	شماره کروموزوم
متاسانتریک	۱	۱۵۰	۱۳۰	۱
متاسانتریک	۱/۵۰	٤۰	۲۷	۲
ساب متاسانتریک	۲	۳۳	۲٤	۳
متاسانتریک	۱/۲۵	٤٤	۲٤	٤
متاسانتریک	۲/۷۵	۲٦	۲۰	۵
متاسانتریک	۱/۵۰	٤۰	۲۰	٦
متاسانتریک	۱	۵۰	۱۹	۷
متاسانتریک	۱	۵۰	۱٦	۸
متا سانتریک	۱/۷۵	٤٦	۱۵	۹

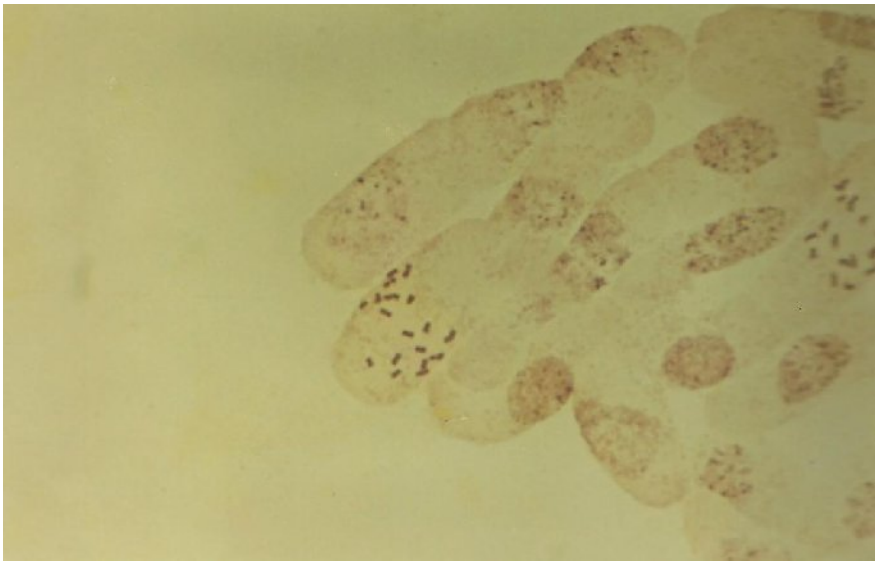


شکل ۵- پلاک متافازی دورگ کترا ۱۱

در تمامی دورگ های مطالعه شده در این بررسی، عدد کروموزومی یکسان بوده و هیچ گونه تفاوتی بین دورگ ها وجود نداشت. عدد پایه کروموزومی در همه دورگها x=9 به دست آمد واین داده ها، نتایج ذکر شده در منبع را تایید می کند. بدین ترتیب تمامی دورگ های مورد مطالعه، دیپلوئید (2n=2x=18) می باشند. در دورگ های مورد مطالعه، دو نوع کروموزوم دیده شد که شامل متاسانتریک و ساب متاسانتریک بود و اشکال کروموزومی دیگر مشاهده نشد.

جدول ۷: تجزیه کاریوتیپ دورگ شماره ۱۲

نوع کروموزوم	نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه	شاخص سانترومری (درصد)	طول نسبی (درصد)	شماره کروموزوم
متاسانتریک	۲	۳۳	۱۳	۱
متاسانتریک	۱/۵۰	٤۰	۱۳	۲
ساب متاسانتریک	۱/۱٤	٤٦	۱۳	۳
متاسانتریک	۱/٦۰	۳۸	۱۱	٤
متاسانتریک	۱/۱٦	٤٦	۱۱	۵
متاسانتریک	۱/۵۰	٤۰	۹	٦
متاسانتریک	۱/۲۰	٤۵	۹	۷
متاسانتریک	۱	۵۰	۹	۸
متا سانتریک	۱/۲۵	٤٤	۸	۹



شکل ٦- پلاک متافازی دورگ کترا ۱۲

بررسی جداول مربوط به شکل و اندازه کروموزوم ها نشان می دهد که اکثر کروموزوم ها از نوع متاسانتریک هستند و این نشان دهنده همگن بودن کاریوتیپ دورگ ها می باشد. به عبارت دیگر این دورگ ها از لحاظ فیلوژنی و سطح تکاملی از ارقام ابتدایی مرکبات محسوب می شوند. از طرف دیگر دورگ مورد بحث، علاوه بر دارا بودن تعداد کروموزوم یکسان، از نظر نوع کروموزوم ها، اندازه

کروموزوم ها و طول بازوی بلند و کوتاه، شباهت زیادی با یکدیگر نشان دادند که این موضوع بیانگر شباهت ژنتیکی بین دورگ های مورد نظر می باشد. طول نسبی کروموزوم بین ۷ درصد و ۳۰ درصد متغیر است و با توجه به هم شکل بودن اکثر کروموزوم ها می توان نتیجه گرفت که دارای کاریو تیپ همگن بوده و بنابراین از لحاظ تکامل گیاهی ابتدایی محسوب می شوند.

منابع

۱- **شیبانی، ح. ۱۳۷۰.** باغبانی عمومی جلد چهارم ، میوه های گرمسیری و نیمه گرمسیری ، مرکز نشر سپهر.

۲- **مجتهدی، ع. ۱۳٦۲.** عملیات باغداری مرکبات د رکنار دریای خزر ، انتشارات جهاد دانشگاهی گیلان.

3-Aidakr, T. and Omura, M. 2002. Regeneration of somatic hybrid plants obtained by electrical fusion . 16 of 29 between *Citrus unshu* and *C.jambhiri* or *C.junos*. Japanese journal of breeding . 42 (1) : 79 – 89

4-Chen, Q. Y. and Song, N. J. 1999. A Teraploidtrifoliate orange. Guanyun : 1. Acta -horticulturae - sinica 16 (1) : 78 – 80

5-Edriss, M. H. 2002. Studies on the Anther culture of Cirtus paradis. Zagazig journal of agricultural research . Egypt . May . 19 (2) :875 – 881

6-German, M. A., Wang, Y. Y., Barbagallo, M. G., Jannolino, G. and Cresimanno, F. G. 2004. Recovery of haploid and diploid plantlets from anther culture of Citrus clementina and Cirtus reticulata . Blanko . Journal of Horticultural Science . 69 (3) : 473 – 480

7-Grosser, J. W. and G – J. R. 2000. Somatic hybridization of citrus with relatives for germplasm enhancement and cultivar development . Hortscience . 25 (2) : 147 – 51

8-Grosser, J. W., Gmitter, F. G - J. R. and Chandler, J. L. 1999. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species citrus sinensis and severinia disticha . The - Appl - Gen . 75 (3) : 397 – 401

9-Grosser, J. W., Jiang, J., Louzada, E . S., Chandler, J. L. and Gmitter, F. R. 1998 . Somatic hybridization , an integral component of Cirtus cultivar improvement. 1 : scion improvement . Hort Science . 33 (6) : 1057 – 1059 .

10-Grosser, J. W., Gmitter, F. G., Franca, I. R. Sesto. Deng xiuxin and Chandler, J. L. 2002. Six new somatic citrus hybrids and their potential for cultivar improvement . Amr - J - Soc - Hort . 117 (1) : 169 – 173

11-Grosser, J. W., Gmitter, F. G - J. R., Tusa, N. and Candler, J. L. 2000. Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species of Citrus . 24 of Citrus reticulata and Citrupsis gilletiana . plant Cell Reports . 8 (11) : 656 – 59 .

12-Jckson, L. K. and Sherman, W. B. 2005. Chromosomes counts in Thiti lime . proceeding of the florida state . Horticltural Society . (88) : 458 – 459 .

13-Jules, J. and More, J. N. 2006. Tree and tropical fruits breeding . (1) 257 – 313

14-Khuroshhvili, K. G. and Takidze, Mi. 1979. Some data from the cytological analysis of plants obtained by means of artificial invitro embryo cultured . Subtrpoic heski cultury . 5 (1) : 55 – 58

15-Mukadder, Kayim, Kemal, N. KOC., Veli Mati and Rokka. 1998. Variation of the nucellar DNA content of species of subtribe . Hortscience 33 (7) :1247 – 1250

16-Ohgawara, T. Kobayashi , S. ohgawara, E. Uchimiya, H. Ishi , S. and Ohgawara, E. 2005. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between Citrus sinensis and poncirus trifoliate . Theorical and applied genetcs . 71 (1) : 1 – 4

17-Perez, R. M., Galina , A. M., Navarro, L. and Duran . N. 1998. Emberyogenesis invitro of several citrus species and cultivars , Journal of horticulturl science and biotechnology . 73 (6) : 796 - 802

18-Rose, M. L., Scwarzacher, T. and Harrison, H. 1998. The chromosomes of Citrus and poncirus species and hybrids . The Journal of Heredity . 89 (1) : 83 – 86

19-Saito, W. Ohgawara, T. Shimizu , J. And Ishii , S. 2001. A Somatic hybridization between C . Sudachi and C . aurantifolia swing ، produced by electrofusion . plant science . 77 (1) : 125 – 130

20-Sarrantino, A. and Carus, A. 2003. Invitro propagation of troyer and Carrizo Citrange . Plant Breeding and Genetics . 84 (1) : 39 n- 47

21-Sellito, B. and Pio, Y. M. 2000. Cytogenetical investigations of three cultivars of sweet orange . Revista - Barsileiaa – de – Genetica . 12 (1) : 117 – 126

22-Vardi, A. 2002. Protoplast derived plants from different citrus species and cultivars . Proceeding of International Society , Citriculture . 79 (1) : 149 – 152

23-Xu, G. T., Li, H. and Shen, D. L. 2004 . study on karyotype of Citrus medica Sarcodactylis Swingle . Journal of Shonghi Agricultural College . 12 (3) : 172 – 176