

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

مهران محمودی\*، عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی  
محمود خسروشاهلی، دانشیار دانشکده علوم پایه دانشگاه تبریز  
عبدالرسول ذاکرین، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی 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. در این رابطه شش دورگ طبیعی مرکبات بومی از ایستگاه کترای مازندران وابسته به مرکز تحقیقات مرکبات کشور در 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 استوارسین، نتایج زیر حاصل شد. مطالعات مورفولوژیکی دورگ ها آنها را در رده شبه بالنگ قرار داد. تعداد کروموزوم ها در همه دورگ ها  $2n=2x=18$  بوده اند. بررسی مورفولوژیکی کروموزوم ها در رده شبه بالنگ نشان داد که آنها متاساتریک با چند استثنای ساب متاساتریک بودند و طول نسبی کروموزوم ها بین ۷ تا ۳۲ 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](mailto:mehran.mahmoudi@yahoo.com)

## 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، قبيله سیتیره و زیر قبيله سیتیرینه می باشد. جنس های مختلف مرکبات شامل *Poncirus*، *Citrus*، *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 آپومیکیسی 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 در جهت 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 (۴).

کروموزوم های مرکبات کوچک هستند (در حدود 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 (۶). در مرکبات و جنس های وابسته مثل *Ormocitrus*، *Fortunella*، *Poncirus*، *Microcitrus*، *Moraya*، *Citropsis* 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، کومکوات هنگ کنگ و یلد تتراپلوئید بود. سپس تتراپلوئیدهای اتفاقی در مرکبات تشخیص داده شد و تریپلوئیدها از نتایج بذر والدهای دیپلوئید به وجود آمدند. تعدادی آنوپلوئیدی و تعداد کمی نیز با سطوح پلوئیدی بیشتر گزارش شده است (۵). طبق گزارش رز و همکاران (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 کومکوات هنگ کنگ و یلد و لایم بری که تتراپلوئید هستند و تاهیتی لایم، که تریپلوئید است (۱۸). طبق گزارش های وردی (۲۰۰۲) لاین های کالوس های خورشکی 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 (۲۰۰۴) 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 (۱۴). سارانینو و کاروزو (۲۰۰۳) در تعیین سطوح پلوئیدی واریته های گوناگون پایه سیترنج، تعداد کروموزوم این دورگ را  $2n=2x=18$  گزارش کردند (۲۰). گروسر و گمیتز (۲۰۰۰) سطح پلوئیدی تانجلونوا و نیز دورگ های دیگری شامل سیترنج و سیتروملو را دیپلوئید و نتایج حاصله بین شدادک و نارنگی و شدادک 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 کومکوات را تتراپلوئید گزارش کردند (۱۵). گروسر و همکاران (۱۹۹۸) سطح پلوئیدی دورگ های تانجلونوا و تانجلو مینشولا 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 (۴). ادیس (۲۰۰۲) طی آزمایش هایی سطح پلوئیدی گریپ فروت را دیپلوئید گزارش کرد (۵). جرمن و همکاران (۲۰۰۴) در آزمایشی سطح پلوئیدی نارنگی کلمانتین را دیپلوئید گزارش کردند (۶). 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 (۱۶).

کروموزوم ها از نظر قرار گرفتن سانترومرشان در پنج گروه متاسانتریک، ساب متاسانتریک، آکروسانتریک، ساب تلوسانتریک و تلوسانتریک قرار می گیرند. در کروموزوم 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 در کروموزوم های تلوسانتریک، سانترومر 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 بذره‌های نوعی از مرکبات شمال به نام کترا ۱۰ و سپس تلقیح طبیعی می باشد. کترا ۱۰ خود نوعی دورگ با والدین ناشناخته می باشد. بذره‌های دورگ های مورد نظر با ذکر شماره و برجسب 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 ۰.۲٪ به همراه یک قطره دی متیل سولفو کساید قرار داده شد، سپس نمونه ها در فیتوترون ۲۵ درجه به مدت ۴ 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 ۹۶٪ 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 به ۱ 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 در ۳ مرحله ۵ الی ۱۰ دقیقه ای عملی گردید. سپس نمونه ها در محلول ۳ به ۱ الکل و اسید استیک به مدت حداقل ۶ ساعت در حرارت ۴ 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 در حد میلی متری جدا و به مدت سه الی چهار ساعت در آنزیم سلولازین ۰.۲٪ در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس در فیتوترون قرار گرفت. 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 ۴۵ درصد قرار داد ه شد. در مرحله رنگ آمیزی، نمونه ها به مدت یک روز در دمای اتاق و پس از آن در حرارت ۴ درجه سلسیوس یخچال در استوارسٹین نگهداری و پس از این مدت به اسید استیک ۴۵ درصد جهت شستشو منتقل گردید. سپس جهت له کردن ( تکنیک اسکواش) نوک ریشه ها روی لام در یک قطره اسید استیک ۴۵ 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 آنثوپلوئید 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 گلیسرین 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 در ۲۶ سلول، در نمونه سوم در ۲۱ سلول در نمونه چهارم در ۴ سلول، در نمونه پنجم در ۱۶ 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 بررسی قرار گرفتند. در نمونه اول ۲۵ سلول در نمونه دوم در ۴ سلول، در نمونه سوم در ۱۶ سلول، در نمونه چهارم در ۵ سلول و در نمونه ۶ 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 قرار گرفتند. در نمونه اول در ۱۰ سلول، در نمونه دوم در ۴ 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 قرار گرفتند. در نمونه اول در ۱۶ سلول و در نمونه دوم در ۶۱ 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 ۲۴ سلول، در نمونه دوم در ۶ سلول، در نمونه سوم در هفت سلول، در نمونه چهارم در ۳ سلول، در نمونه پنجم در شش سلول و در نمونه ششم در ۹۷ سلول شمارش کروموزومی انجام گردید.

جدول ۱: ویژگی های مورفولوژیکی دورگ های مورد مطالعه

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

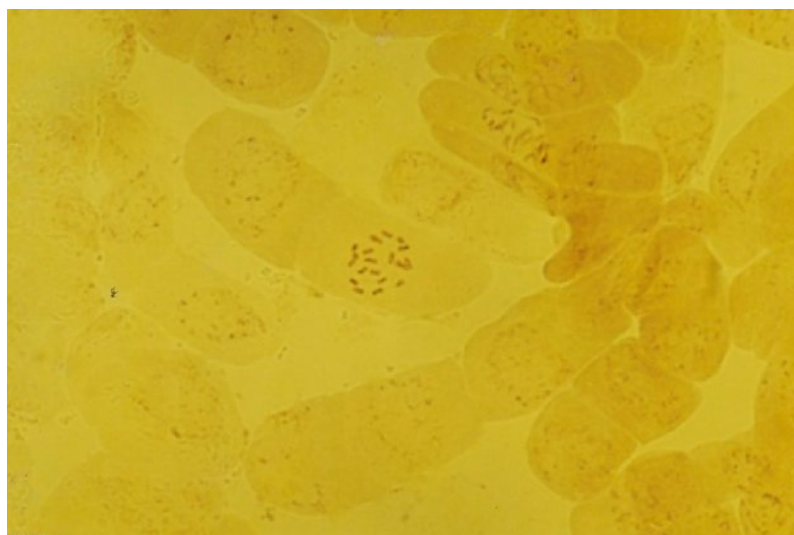
## نتایج و بحث

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 کروموزوم پایه، ۸ کروموزوم متاسانتریک و ۱ کروموزوم ساب متاسانتریک است و هیچ کروموزوم آکروسانتریک، ساب تلوسانتریک و تلوسانتریکی مشاهده نگردید (جدول ۲). مطالعات سیتولوژیکی نشان داد که سطح پلوئیدی دورگ شماره ۸ دیپلوئید و تعداد کروموزوم در این دورگ  $2n=2x=18$  می باشد. از مجموع ۹ کروموزوم پایه، ۷ کروموزوم پایه، ۷ کروموزوم آن متاسانتریک و ۲ کروموزوم ساب متاسانتریک 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 ۴). مطالعات سیتولوژیکی بر روی دورگ شماره ۱۰ نشان داد که سطح پلوئیدی دورگ پلوئید است.

جدول ۲: تجزیه کاریوتیپ دورگ شماره ۷

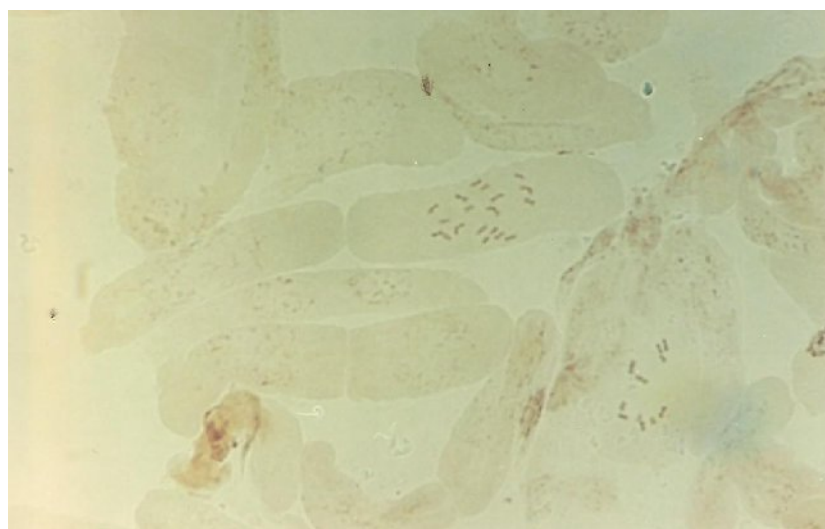
شماره کروموزوم	طول نسبی (درصد)	شاخص سانترومری (درصد)	نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه	نوع کروموزوم
۱	۱۴	۵۰	۱	متاسانتریک
۲	۱۳	۴۵	۱/۲۰	متاسانتریک
۳	۱۲	۳۳	۲	ساب متاسانتریک
۴	۱۲	۵۰	۱	متاسانتریک
۵	۱۱	۴۱	۱/۳۷	متاسانتریک
۶	۱۰	۴۱	۱/۴۹	متاسانتریک
۷	۹	۵۰	۱	متاسانتریک
۸	۸	۵۰	۱	متاسانتریک
۹	۷	۴۱	۱/۴۰	متاسانتریک



شکل ۱- پلاک متافازی دورگ کترا ۷

جدول ۳: تجزیه کاریوتیپ دورگ شماره ۸

شماره کروموزوم	طول نسبی ( درصد )	شاخص سانترومری ( درصد )	نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه	نوع کروموزوم
۱	۳۰	۲۰	۱/۵۰	متاسانتریک
۲	۳۹	۲۵	۱/۶۸	متاسانتریک
۳	۲۸	۲۹	۱/۵۵	ساب متاسانتریک
۴	۲۳	۲۶	۱/۷۱	متاسانتریک
۵	۱۹	۲۷	۱/۶۶	متاسانتریک
۶	۱۸	۲۶	۱/۱۴	متاسانتریک
۷	۱۷	۲۵	۱/۸۰	متاسانتریک
۸	۱۷	۵۰	۱	متاسانتریک
۹	۱۵	۲۶	۱/۱۶	متاسانتریک



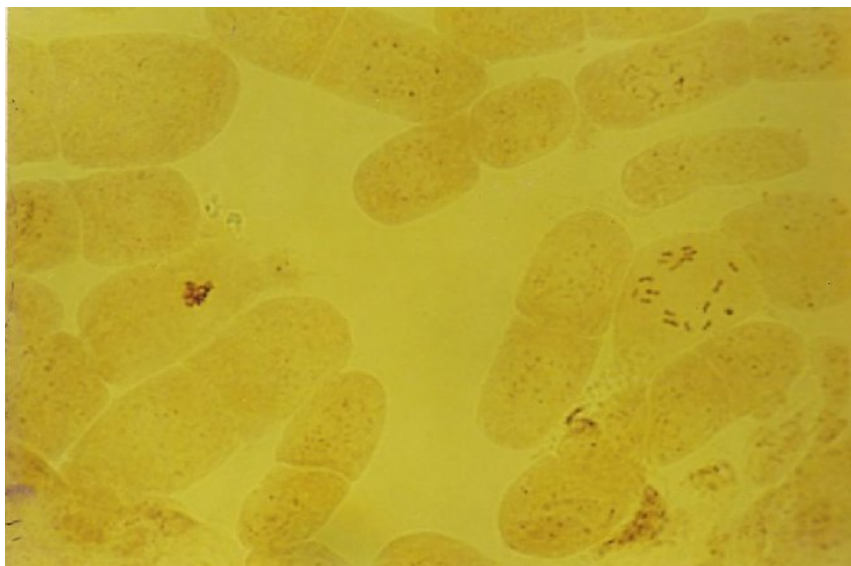
شکل ۲- پلاک متافازی دورگ کترا ۸

از مجموع ۹ کروموزوم پایه، هر ۹ کروموزوم آن متاسانتریک بوده هیچ کروموزوم دیگری مشاهده نگردید (جدول ۵).



جدول ۴: تجزیه کاریوتیپ دورگ شماره ۹

شماره کروموزوم	طول نسبی ( درصد )	شاخص سانتومری ( درصد )	نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه	نوع کروموزوم
۱	۲۸	۱۴۱	۱/۴۲	متاسانتریک
۲	۲۸	۴۷	۱/۱۲	متاسانتریک
۳	۲۵	۴۶	۱/۶۴	ساب متاسانتریک
۴	۲۳	۵۰	۱	متاسانتریک
۵	۲۱	۴۶	۱/۱۶	متاسانتریک
۶	۲۰	۴۳	۲	متاسانتریک
۷	۲۰	۴۱	۱/۴۰	متاسانتریک
۸	۱۸	۴۵	۱/۲۰	متاسانتریک
۹	۱۳	۵۰	۱	متاسانتریک



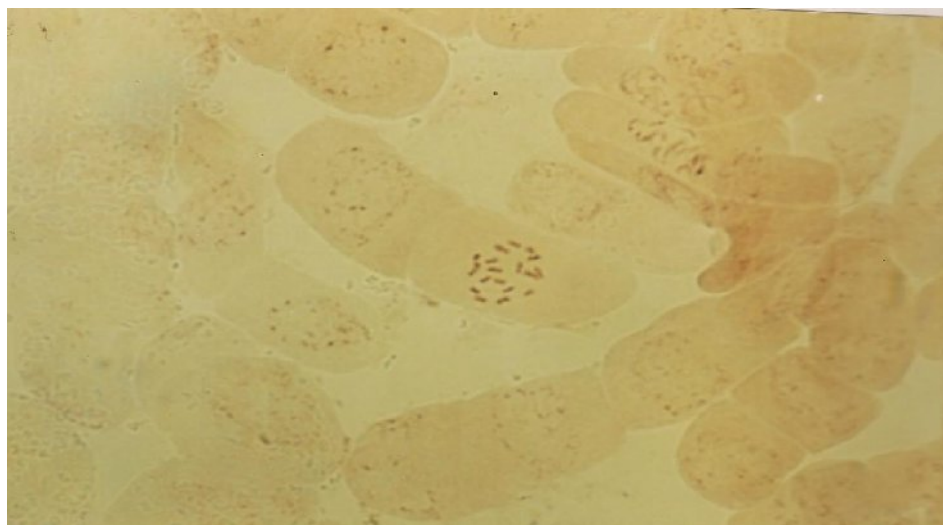
شکل ۳- پلاک متافازی دورگ کترا ۹

مطالعات سیتولوژیکی بر روی دورگ شماره ۱۱ نشان داد که سطح پلوئییدی این دورگ دیپلوئید است. از مجموع ۹ کروموزوم پایه، ۶ کروموزوم آن متاسانتریک و ۳ کروموزوم متاسانتریک بوده و هیچ کروموزوم دیگری مشاهده نگردید ( جدول ۶).

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

جدول ۵: تجزیه کاریوتیپ دورگ شماره ۱۰

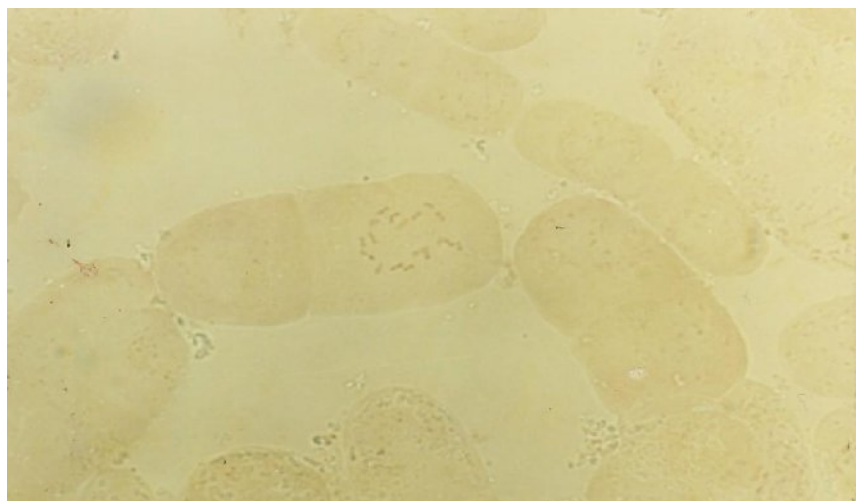
شماره کروموزوم	طول نسبی (درصد)	شاخص سانترومری (درصد)	نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه	نوع کروموزوم
۱	۱۱۳	۱۵۰	۱	متاسانتریک
۲	۱۲	۳۸	۱/۶۰	متاسانتریک
۳	۷	۴۰	۱/۵۰	ساب متاسانتریک
۴	۱۰	۵۰	۱	متاسانتریک
۵	۱۲	۴۵	۱/۲۰	متاسانتریک
۶	۱۵	۴۰	۱/۵۰	متاسانتریک
۷	۹	۵۰	۱	متاسانتریک
۸	۱۱	۴۴	۱/۲۵	متاسانتریک
۹	۱۰	۵۰	۱	متاسانتریک



شکل ۴- پلاک متافازی دورگ کترا ۱۰

جدول ۶: تجزیه کاریوتیپ دورگ شماره ۱۱

شماره کروموزوم	نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه	شاخص سانتومری (درصد)	طول نسبی (درصد)	نوع کروموزوم
۱	۱	۱۵۰	۱۳۰	متاسانتریک
۲	۱/۵۰	۴۰	۲۷	متاسانتریک
۳	۲	۳۳	۲۴	ساب متاسانتریک
۴	۱/۲۵	۴۴	۲۴	متاسانتریک
۵	۲/۷۵	۲۶	۲۰	متاسانتریک
۶	۱/۵۰	۴۰	۲۰	متاسانتریک
۷	۱	۵۰	۱۹	متاسانتریک
۸	۱	۵۰	۱۶	متاسانتریک
۹	۱/۷۵	۴۶	۱۵	متاسانتریک

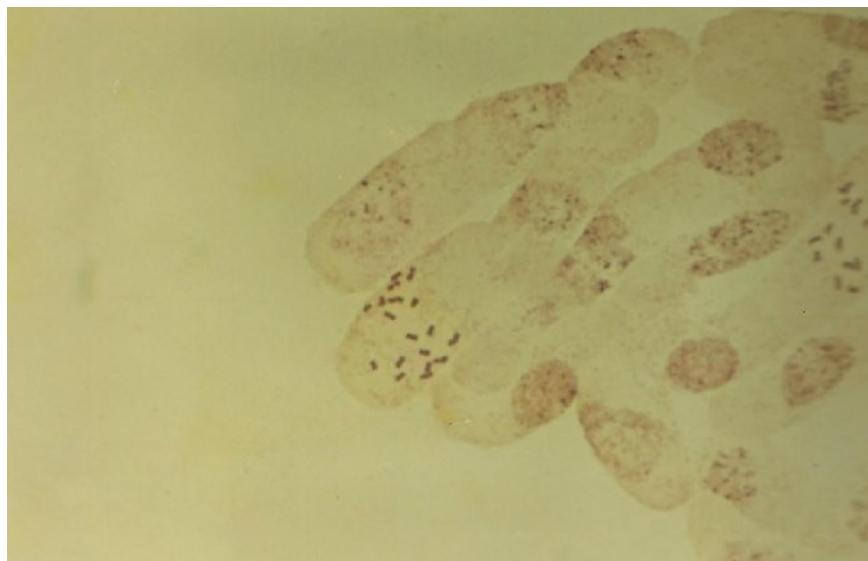


شکل ۵- پلاک متافازی دورگ کترا ۱۱

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 و این 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 کاربوتیپ دورگ شماره ۱۲

شماره کروموزوم	طول نسبی (درصد)	شاخص سانترومری (درصد)	نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه	نوع کروموزوم
۱	۱۳	۳۳	۲	متاسانتریک
۲	۱۳	۴۰	۱/۵۰	متاسانتریک
۳	۱۳	۴۶	۱/۱۴	ساب متاسانتریک
۴	۱۱	۳۸	۱/۶۰	متاسانتریک
۵	۱۱	۴۶	۱/۱۶	متاسانتریک
۶	۹	۴۰	۱/۵۰	متاسانتریک
۷	۹	۴۵	۱/۲۰	متاسانتریک
۸	۹	۵۰	۱	متاسانتریک
۹	۸	۴۴	۱/۲۵	متا سانتریک



شکل ۶- 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 کاربوتیپ 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. ۱۳۶۲. عملیات باغداری مرکبات در کنار 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 Teraploidtrifoliolate 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. Blanco . 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 Citrus 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 . Horticultural Society . ( 88 ) : 458 – 459 .
- 13-Jules, J. and More, J. N. 2006. Tree and tropical fruits breeding . ( 1 ) 257 – 313
- 14-Khuroshvili, 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 trifoliolate . Theoretical and applied genetcs . 71 ( 1 ) : 1 – 4
- 17-Perez, R. M., Galina, A. M., Navarro, L. and Duran . N. 1998. Embryogenesis invitro of several citrus species and cultivars , Journal of horticulturl science and biotechnology . 73 ( 6 ) : 796 - 802
- 18-Rose, M. L., Swarzacher, 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