

# Crossing between diploid and tetraploid parents for breeding of acid citrus

## ABSTRACT

The aim of this research was to obtain triploid acid citrus genotypes. Stability of polyploidy level for two genotypes of key lime labeled as A and B and three genotypes of sweet lime labeled as C, D and E were investigated. The results showed that in tree A, four of five main branches (A1, A2, A3 and A4) were diploid ( $2n=2X$ ) and only one main branch (A5) was mix-ploid ( $2X+4X$ ). In tree B, all of seven main branches were equally triploid ( $2n=3X$ ). All branches of C and D trees of sweet lime were tetraploid and those of E tree were diploid. Controlled crossing was made between clementine mandarin and B tree of key lime and between each of three female parents of lemon ('Eureka', 'Cook Eureka' and 'Lisbon') and two sweet lime tetraploids (C and D trees). From crossing between clementine mandarin and Mexican lime (B tree) no fruit as well as no seed was obtained. However, from crosses of three female lemons ('Eureka', 'Cook Eureka' and 'Lisbon') with tetraploid sweet limes fruits and seeds were obtained. Only very small seeds with high monoembryony were cultured on B<sub>5</sub> medium. Fifteen interploid hybrids were analyzed for ploidy level by flowcytometry of which ten seedlings were diploid (nucellar) and five seedlings were triploid ( $2n=3X$ ), four from 'Eureka' × sweet lime and one from 'Cook Eureka' × sweet lime. The triploid genotypes obtained for the first time here are supposed to be seedless, therefore should be more evaluated for phenotypic characteristics.

**Keywords:** *Breeding, lemon, lime, seedlessness, triploid*

## دورگ گیری بین والدین دیپلوئید و تتراپلوئید برای بهنژادی مرکبات اسیدی (ترش)

هدف این پژوهش دستیابی به ژنوتیپ‌های مرکبات اسیدی تریپلوئید بود. ثبات پلی‌پلوئیدی در نهال‌های لیمو ترش شیرازی، درخت A و درخت B، و لیمو شیرین (درخت‌های C، D و E) بررسی شد. نتایج نشان داد که از پنج شاخه اصلی درخت A، شاخه‌های A1، A2، A3 و A4 دیپلوئید ( $2X$ ) و شاخه A5 میکس‌پلوئید ( $2X+4X$ ) بود. در درخت B هر هفت شاخه دارای سطح پلوئیدی یکسان و تریپلوئید ( $3X$ ) بودند. لیمو شیرین‌های C و D تتراپلوئید و لیمو شیرین E دیپلوئید تعیین شد. تلاقی‌ها بین نارنگی کلماتین (مادر) و لیمو ترش B (پدر) و بین لیمون‌های 'اورکا'، 'کوک اورکا' و 'لیسبون' (مادر) با لیمو شیرین‌های تتراپلوئید C و D (پدر) انجام پذیرفت. در تلاقی بین نارنگی کلماتین با لیمو ترش (درخت B) همه میوه‌ها ریزش نموده و هیچ بذری به دست نیامد. اما در تلاقی‌های بین لیمون‌های 'اورکا'، 'کوک اورکا' و 'لیسبون' با لیمو شیرین‌های تتراپلوئید میوه‌ها به مرحله برداشت رسیدند و بذره‌های آنها مورد استفاده قرار گرفتند. بذره‌های خیلی ریز که از تک‌جینی بیشتری برخوردار بودند در محیط B<sub>5</sub> کشت شدند. از بین ۱۵ اصله نهال دورگ که با فلوسیتومتری مورد سنجش سطح پلوئیدی قرار گرفتند، ۱۰ اصله نهال دیپلوئید و پنج اصله تریپلوئید به دست آمد. از این پنج اصله چهار اصله به تلاقی 'اورکا' و یک اصله به تلاقی 'کوک اورکا' با لیمو شیرین تعلق داشتند. ژنوتیپ‌های تریپلوئید که برای اولین بار در این پژوهش به دست آمدند انتظار می‌رود صفت بی‌بذری میوه را از خود نشان دهند. بنابراین ویژگی‌های فنوتیپی این ژنوتیپ‌های تریپلوئید باید بیشتر مورد بررسی قرار گیرند.

**کلیدواژه‌ها:** بهنژادی، بی‌بذری، تریپلوئید، لایم، لیمون

مرکبات از مهمترین میوه‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا محسوب می‌شوند که اهمیت اقتصادی قابل توجه‌ای در بازار مصرف تازه‌خوری و صنایع غذایی-تبدیلی دارند. جنس *سیروس*<sup>۱</sup>، گونه‌های اصلی مرکبات شامل انواع پرتقال، نارنگی، گریپ‌فروت، لیموهای ترش و شیرین، شادوک، نارنج، بالنگ (یا بادرنگ) و انواع دورگ‌های آنها را شامل می‌شود (Barry et al., 2020). در بین گونه‌های مرکبات انواع لیمو ترش دو گروه عمده<sup>۲</sup> لایم‌ها و لمون‌ها<sup>۳</sup> را در بر می‌گیرد. به استثنای 'تاهیتی' ('پرشین') لایم<sup>۴</sup> که میوه‌های متوسط تا کمی درشت دارد، لایم‌ها دارای میوه‌های کوچک تا متوسط با پوست نازک و بیشتر سبز رنگ (در زمان برداشت تجاری) می‌باشند. لمون‌ها که به گونه *C. limon* [L.] Burm. f. تعلق دارند دارای میوه‌های درشت‌تر، با پوست کلفت‌تر و زرد رنگ می‌باشند. از مهم‌ترین ارقام لمون می‌توان به 'اورکا'<sup>۵</sup>، 'لیسون'<sup>۶</sup>، 'ورنا'<sup>۷</sup>، 'مسینا'<sup>۸</sup> و 'فینو'<sup>۹</sup> اشاره نمود. هر دو گروه به دلیل داشتن میوه‌های پر آب، عمدتاً اسیدی (ترش) و با ویتامین C بالا اهمیت قابل توجهی در بازار مصرف تازه‌خوری و صنایع غذایی-تبدیلی از جمله تولید آبلیمو، انواع سس‌ها و چاشنی‌ها دارند. طبق آمار سازمان غذا و خوار و بار جهانی<sup>۱۰</sup> میزان تولید لایم‌ها و لمون‌ها در ایران در سال ۲۰۲۱ حدود ۴۷۸۹۷۲ تن بوده است. لیمو ترش معمولی با نام علمی *Citrus aurantifolia* Swingle از گروه لایم‌ها بوده و در ایران با نام‌های عمومی و تجاری لیموی آب، لیموی شیرازی و لیموی عمانی شناخته می‌شود. این نوع لیمو ترش به زبان انگلیسی با عنوان‌های مکزیکن لایم یا کی لایم<sup>۱۱</sup> معروف است. لیمو شیرین<sup>۱۱</sup>، گونه<sup>۱۱</sup> دیگری از لیموها با نام علمی *C. limettioides* Tan. می‌باشد که میوه‌های درشت و شیرین تولید می‌کند و در ایران به خصوص در استان‌های فارس (در جهرم، قیر و کارزین) و کرمانشاه (در قصر شیرین) به مقدار زیاد تولید شده و از اهمیت اقتصادی قابل توجه‌ای برخوردار است. وجود تنوع بیشتر در ارقام تجاری لیمو ترش تولید و میزان سرانه مصرف میوه تازه<sup>۱۲</sup> و فرآورده‌های طبیعی آنها را بالا خواهد برد و چرخه‌های اقتصادی بیشتری را به گردش در خواهد آورد. در این راستا میوه‌های بی‌بذر و یا کم بذر مرکبات، به خصوص در لایم‌ها و لمون‌ها چه در بازار تازه‌خوری و چه در صنایع غذایی-تبدیلی از بازارپسندی و قیمت بسیار بیشتری برخوردارند. به همین خاطر است که در بهنژادی انواع مرکبات از جمله لیموها دست‌یابی به ارقامی که میوه‌های بی‌بذر تولید می‌کنند و از نظر سطح پلوئیدی بیشتر تریپلوئید (3X) می‌باشند، مورد توجه ویژه قرار گرفته است (Aleza et al., 2012; Roverssi et al., 2022; Narukulla et al., 2024). برای دست‌یابی به ارقام تریپلوئید مرکبات ابتدا باید ارقام تتراپلوئید (4X) تولید نمود و سپس آنها را در تلاقی‌ها با ارقام دیپلوئید (2X) مورد استفاده قرار داد. تا به امروز در ایران در بهنژادی مرکبات از تلاقی‌های بین دو والد با سطح کروموزومی متفاوت (تلاقی‌های اینترپلوئید<sup>۱۲</sup>) استفاده نشده است. هدف از اجرای این پژوهش، انجام تلاقی بین ژنوتیپ‌های دیپلوئید و تتراپلوئید در تعدادی از لیموهای ترش و شیرین برای دست‌یابی به شبه لیموهای تریپلوئید می‌باشد.

## پیشینه پژوهش

در مرکبات، عقیمی ژنتیکی، دوره<sup>۱۲</sup> نونهالی طولانی، ناسازگاری بین گونه‌ها و درصد بالای چند جنینی از جمله موانع بیولوژیکی

1. Citrus

2. Limes and Lemons

3. 'Tahiti' ('Persian') lime

4. 'Eureka'

5. 'Lisbon'

6. 'Verna'

7. 'Messina'

8. 'Fino'

9. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)

10. Mexican or Key lime

11. Indian or Palestine Sweet lime

12. Interploid hybridization

بهنژادی این گیاهان، شناخته شده‌اند (Caruso *et al.*, 2020; Perez-Tornero & Porras, 2008). دورگ‌گیری که تلاقی کنترل شده بین دو والد متفاوت از نظر ژنتیکی می‌باشد، یکی از روش‌های اصلی بهنژادی مرکبات است که با هدف دستیابی به رقم یا پایه مطلوب صورت می‌گیرد. برنامه‌هایی از بهنژادی مرکبات که دورگ‌گیری را شامل می‌شوند، مراحل متوالی انتخاب والدین، انجام تلاقی و در نهایت انتخاب (گزینش) فنوتیپ<sup>۱</sup> مطلوب را به دنبال دارند. در دورگ‌گیری مرکبات، والدینی که توانایی ترکیب‌پذیری و توارث‌پذیری بالایی برای صفات مطلوب دارند انتخاب شده و والدی که به میزان زیاد بذره‌های تک‌جنین و جنسی تولید می‌کند، به عنوان والد مادر به کار می‌رود (Ray, 2002; Gmitter *et al.*, 2007). از ارقام تجاری مرکبات که با روش دورگ‌گیری و گزینش به دست آمده‌اند می‌توان به نارنگی 'Encore' حاصل از تلاقی بین دو رقم نارنگی 'King' و 'Willow Leaf' در کالیفرنیا، رقمی از شادوک به نام 'Hayasaki' از تلاقی 'Matou Buntan' و 'Hirado Buntan'، رقمی از تانگور به نام 'Ariake' از تلاقی پرتقال 'Seike Navel' و نارنگی کلمانتین، و دورگی به نام 'Tsunokaori' از تلاقی 'Kiyomi' (نوعی دورگ) و 'Okitsu' (رقمی از نارنگی انشو) اشاره نمود (Gmitter *et al.*, 2007). برنامه‌های دورگ‌گیری مرکبات در ایران از سال ۱۳۴۷ توسط یونس ابراهیمی و همکارانش در ایستگاه‌های ستادی موسسه تحقیقات مرکبات کشور آغاز شد و ترکیب‌های مختلفی از تلاقی‌ها به منظور رسیدن به رقم و یا پایه مناسب برای شمال ایران انجام پذیرفت. از ارقام مرکبات به دست آمده در داخل کشور می‌توان به نارنگی‌های 'یاشار'، 'نوشین'، 'شاهین'، 'پرنا'، 'ورا'، 'خرم' و 'جهانگیر' اشاره کرد (گل‌عین، ۱۳۹۴ الف؛ گل‌عین، ۱۳۹۴ ب). در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور (رشت) نیز رقمی از لیمو ترش از تلاقی بین 'ناگامی' کامکوات (مادر) و لیمو ترش 'مکزیکن' (پدر) به دست آمده که میوه‌های آن پر آب، اسیدی، گرد و زرد رنگ بوده و ماندگاری زیادی روی درخت دارند. این رقم تحمل زیادی به بیماری جاروک لیمو ترش نشان داده است.

پلی‌پلوئیدی<sup>۲</sup> عبارت است از وجود سه سری (3X) یا بیشتر از کروموزوم‌ها در هسته سلول‌های رویشی<sup>۳</sup> (غیر جنسی). آن دسته از گیاهان پلی‌پلوئید که سری‌های کروموزومی یکسان دارند، اتوپلی‌پلوئید<sup>۴</sup> و پلی‌پلوئیدهایی که از راه دورگ‌گیری بین گونه‌ای به دست آمده‌اند، آللوپلی‌پلوئید<sup>۵</sup> نامیده می‌شوند. بیشتر گونه‌های جنس سیتروس دیپلوئید ( $2n=2X=18$ ) با تعداد ۹ عدد کروموزوم پایه ( $X=9$ ) می‌باشند. در مرکبات در حالت طبیعی، پلی‌پلوئیدهای با منشأ جنسی از تلاقی یک گامت کاهش نیافته با یک گامت نرمال هاپلوئید و یا تلاقی دو گامت کاهش نیافته با هم، و پلی‌پلوئیدهای با منشأ غیر جنسی یا به اصطلاح پلی‌پلوئیدهای خود بخودی، از فرایندهای جهش طبیعی و به دنبال آن دو برابر شدن کروموزوم‌ها در سلول‌های نوسلار<sup>۶</sup> (خورشی) و عدم کاهش طی میتوز به وجود می‌آیند (Guerra *et al.*, 2016). در مرکبات ژنوتیپ‌های دیپلوئید (2X) و تتراپلوئید (4X) دارای بذر بوده در حالی که ژنوتیپ‌های تریپلوئید بی‌بذر هستند. میوه‌های ارقام تریپلوئید ویژگی‌های قابل توجه دیگری نیز دارند. از جمله این‌که، اندازه بزرگ داشته و زمان رسیدن آنها در دامنه وسیع‌تری صورت می‌گیرد. همچنین، در بعضی موارد، رنگدانه‌های قرمز بیشتری دارند (Reforgiato *et al.*, 2005). در دستیابی به ارقام تریپلوئید مرکبات، ارقام تتراپلوئید (4X) در تلاقی‌های دوجانبه با ارقام دیپلوئید (2X) مورد استفاده بوده‌اند. با استفاده از این تلاقی‌ها ارقام بی‌بذر و تجاری زیادی به دست آمده‌اند که می‌توان به ارقام 'تاکله'<sup>۷</sup>، 'کلارا'<sup>۸</sup>، 'ماندارد'<sup>۹</sup>، 'ریاله'<sup>۱۰</sup>، 'آلکانتارا'<sup>۱۱</sup>، 'سوئیت سیسیلی'<sup>۱۲</sup> و 'ارلی سیسیلی'<sup>۱۳</sup> اشاره نمود (Reforgiato *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2015).

1. Phenotype

2. Polyploidy

3. Somatic

4. Autopolyploid

5. Allopolyploid

6. Nucellar

7. 'Tacle'

8. 'Clara'

9. 'Mandared'

10. 'Reale'

11. 'Alkantara'

12. 'Sweet Sicily'

13. 'Early Sicily'

در بهنژادی مرکبات، ارقام تتراپلوئید برای دست‌یابی به پایه‌های جدید نیز بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. زیرا، می‌توانند به طور مستقیم به عنوان پایه‌های پاکوتاه کننده مورد استفاده قرار گیرند و نسبت به پایه‌های دیپلوئید به شرایط محدود کننده محیطی مقاومت بیشتری نشان دهند (Ruiz *et al.*, 2015; Grosser *et al.*, 2015). از آن جا که در بهنژادی مرکبات، گیاهان تتراپلوئید بسیار با ارزش می‌باشند، به طور مصنوعی با استفاده از تیمارهای کلشیسین توسط پژوهشگران مختلف تولید شده و مورد بررسی قرار گرفته اند (Aleza *et al.*, 2009). در پژوهشی با به کارگیری تیمارهای مختلف کلشیسین فرم‌های تتراپلوئید در ارقام اسیدی (ترش) مرکبات تولید شد که در مقایسه با ارقام دیپلوئید اصلی دارای میوه‌های با پوست ضخیم‌تر و گره‌های روغنی بزرگ‌تر و همچنین گل‌ها و بذرها بزرگ‌تر بودند (Wakana *et al.*, 2005). در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور (رشت)، پژوهش‌هایی انجام شد که در آنها تیمارهای کلشیسین روی مرستم انتهایی نهال‌های بذری برای تولید ژنوتیپ‌های تتراپلوئید در لیمو ترش و لیمو شیرین به کار رفت و تعدادی نهال پلی‌پلوئید به دست آمد که حفظ و نگهداری شده‌اند (Afshar Mohammadian *et al.*, 2013; Afshar Mohammadian *et al.*, 2012). معمولاً دانه‌های گرده ارقام تتراپلوئید مرکبات نسبت به ارقام دیپلوئید نیز بزرگ‌تر بوده ولی از زنده‌مانی و جوانه‌زنی کمتری برخوردارند (Lora *et al.*, 2022). توصیه شده است که پیش از استفاده از گیاهان تتراپلوئید در تلاقی‌ها، ثبات سطح پلوئیدی و قابلیت آنها به عنوان والدین مناسب مورد بررسی قرار گیرد (Aleza *et al.*, 2009).

## روشن‌شناسی پژوهش

### بررسی پایداری پلی‌پلوئیدی، ویژگی‌های رویشی و زایشی در لیموهای ترش و شیرین

ثبات پلی‌پلوئیدی در دو اصله از نهال‌های لیمو ترش شیرازی، درخت‌های A و B، و سه اصله از نهال‌های لیمو شیرین (درخت‌های C، D، E) که در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور (رشت) حفظ و نگهداری شده‌اند مورد بررسی قرار گرفت. پنج شاخه اصلی از درخت A، هفت شاخه اصلی از درخت B و چهار شاخه اصلی از هر یک از درخت‌های C، D، E انتخاب و از پائین به بالا در جهت حرکت عقربه‌های ساعت کدگذاری شدند و از آنها نمونه‌های برگ بالغ (نه خیلی جوان و نه خیلی مسن) به تعداد چهار تا پنج عدد جمع‌آوری و برچسب گذاری به عمل آمد. برگ‌ها پس از پاکسازی سطحی توسط دستمال کاغذی آغشته به اتانول ۷۰ درصد و خشک شدن، لای کاغذهای مرطوب درون کیسه فریزر همراه با برچسب هر نمونه (کد اختصاصی شاخه مربوطه) قرار گرفتند. این نمونه‌ها درون ظرف درب بسته محتوی چندین لایه یخ خشک به آزمایشگاه کشت بافت و انتقال ژن پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج منتقل شدند. در آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها برای آنالیز فلوسیتومتری از مواد شیمیایی کیت تجاری Cystain PI Absolute P, Sysmex-Partec استفاده شد. تکه‌ای از برگ هر نمونه در ظرف پتری کوچکی محتوی ۴۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج با استفاده از یک نصفه تیغ با تقه تقه زدن ممتد به خرده‌های بسیار ریز تبدیل شد. به این مخلوط ۱۶۰۰ میکرولیتر از بافر رنگ‌آمیزی PI و ۱۲ میکرولیتر از محلول آنزیم RNase اضافه شد. پس از یک تا دو دقیقه قرارگیری روی سکوی آزمایشگاه مخلوط فوق با عبور از صافی‌های بسیار ریز صاف شده و برای مکش اتومات به دستگاه فلوسیتومتر متصل گردید. پس از استارت دستگاه، داده‌برداری انجام گرفت. یعنی نمودار فلوسیتومتری (هیستوگرام) پس از شمارش حداقل ده هزار سلول (بین ۱۰۰۰ تا ۳۰۰۰) به دست آمد. این مرحله از کار با دستگاه فلوسیتومتر به مرحله گین<sup>۱</sup> معروف است. برای هر پیک اصلی (پیک مربوط به هر نمونه) مقدار قابل قبول CV یعنی کمتر از ۱۰ به دست آمد و در صورت بالا بودن مقدار CV، آزمایش دوباره تکرار شد. نمونه‌های شاهد دیپلوئید و تریپلوئید به ترتیب از 'مکزیکن' لایم و 'پرشین' لایم<sup>۲</sup> نیز مورد تعیین سطح پلوئیدی قرار گرفتند. اندازه‌گیری‌های مرفولوژیک مربوط به برگ (طول، عرض، ضخامت پهنک و طول دم‌برگ) با استفاده از دستگاه کولیس دیجیتال (Mitotoyu, Japan) با دقت یکصدم میلی‌متر انجام شد. برای بررسی تراکم روزنه‌ها از روش قالب‌گیری، بیان شده توسط Mathur & Koncz (1997) با کمی تغییرات استفاده شد. به این معنی که به جای قالب پارافین از چسب سلوفان استفاده شد. صفات کمی و کیفی میوه

<sup>1</sup>. Gain

<sup>2</sup>. 'Persian' lime (*Citrus latifolia* Tan.)

ها در آزمایشگاه بخش فیزیولوژی پس از برداشت در پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری در شهر رامسر اندازه‌گیری شدند. اندازه میوه یعنی طول استوایی و قطبی میوه (با کولیس دیجیتال)، اسیدیتیه یا میزان ترشی عصاره (با تیتراسیون سود ۰/۱ نرمال)، تعداد بذر (با شمارش بذرهای کامل و ناقص)، درصد تک‌جنینی بذر (با پوست کندن بذر و شمارش تعداد جنین زیر بینوکولار)، کل مواد جامد محلول<sup>۱</sup> عصاره (با دستگاه رفراکتومتر<sup>۲</sup>)، ضخامت پوست میوه (با کولیس دیجیتال) و درصد آب میوه پس از آگیری از کسر نمودن وزن کل میوه از وزن تفاله و وزن بذرها به دست آمد (Asadi Abkenar, 2014). تجزیه داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون  $t$  و توسط نرم افزار SPSS16 انجام پذیرفت.

### تلاقی بین ژنوتیپ‌های با سطوح کروموزومی متفاوت و تعیین سطح پلوئیدی نهال‌های دورگ

از لیموهای ترش و شیرین که در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور (رشت) با اعمال تیمارهای کلشیسین به دست آمده و حفظ و نگهداری شده بودند، به عنوان والد نر استفاده شد. دانه<sup>۳</sup> گرده<sup>۴</sup> ژنوتیپ‌های نر مورد نظر با جداسازی بساک‌ها از گل‌هایی که در مرحله نزدیک به باز شدن بودند (شکل ۱-الف)، یعنی یک روز قبل از باز شدن کامل، در داخل ظرف‌های پتری و در یک اتاق خشک با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری شدند. رنگ‌آمیزی با محلول آستوکارمین یک درصد برای تعیین درصد دانه‌های گرده زنده انجام پذیرفت (شکل ۱-ب). میزان جوانه‌زنی دانه‌های گرده با کشت آنها روی محیطی حاوی ۱۲ درصد ساکارز، ۰/۷ درصد آگار و املاح بور، منیزیم، پتاسیم و کلسیم مورد بررسی قرار گرفت (Brewbaker & Kwack, 1963). گل‌های گونه‌های دیپلوئید مرکبات شامل نارنگی 'کلمانتین' در ایستگاه رامسر، لیموهای 'اورکا'، 'کوک اورکا' و 'لیسیون' در ایستگاه کنتر در مرحله نزدیک به باز شدن (یک روز قبل از بازشدگی کامل) با جداسازی پرچم‌ها توسط پنس اخته شده و پاکت‌گذاری شدند. یک تا دو روز بعد و پس از ظهور شیره سفید رنگ و چسبنده روی سطح کلاله، پاکت‌ها برداشته شدند و دانه‌های گرده<sup>۴</sup> جمع‌آوری شده با استفاده از قلم‌موهای ظریف و بسیار نرم روی کلاله گل‌های اخته شده، مالیده شدند. گل‌های گرده‌افشانی شده دوباره با گذاشتن پاکت روی آنها از بازدید حشرات محافظت شدند (شکل ۱-ت). روی برچسب مربوط به هر شاخه تاریخ و تعداد گل‌های گرده‌افشانی شده یادداشت شد. میوه‌های حاصل از گرده‌افشانی‌های کنترل شده پس از رسیدن (بلوغ میوه‌ها) (شکل ۱-ث) برداشت و برحسب شماره ردیف درختان در قطعه باغ و شماره درخت در ردیف مربوطه کدگذاری شدند. در آزمایشگاه، هر میوه با برش عرضی تا نیمه و کمی چرخاندن به دو نیمه مساوی تبدیل شد و بذرهای هر نیمه با استفاده از نوک قاشق استخراج و پس از شستشو و کمی خشک شدن وزن شدند. جنین بذرهایی که کمتر از ۰/۰۹ گرم وزن داشتند، در شرایط ضد عفونی شده در محیط B<sub>5</sub> به همراه ۳ درصد ساکارز، ۰/۷ درصد آگار و ۱ میلی‌گرم در لیتر GA<sub>3</sub> کشت شدند (شکل ۱-ج). گیاهچه‌هایی که با این روش به دست آمدند (شکل ۱-چ)، به گلدان‌های کوچک حاوی پیت و پرلایت اتوکلاو شده برای سازگاری منتقل شدند. پس از گذشت یک ماه گیاهان سازگار شده به گلدان‌های بزرگتر منتقل و در گلخانه مرکز رشت حفظ و نگهداری شدند. سطح پلوئیدی گیاهان به دست آمده از تلاقی‌ها نیز طبق شرح فوق تعیین شد؛ با این تفاوت که هر نمونه همراه با یک نمونه شاهد، یعنی 'پرشین' لایم که تریپلوئید طبیعی است، همزمان مورد سنجش قرار گرفت. دورگ‌های تریپلوئید جداسازی، حفظ و نگهداری شدند.

## ب

<sup>3</sup>. Total Soluble Solid (TSS)

<sup>4</sup>. Refractometer



شکل ۱. الف) وضعیت بساک‌ها در اولین روز پس از باز شدن گل‌ها در لیمو شیرین تتراپلوئید، ب) رنگ‌آمیزی دانه‌های گرده با محلول آستوکارمین یک درصد، پ) نمونه‌ای از گل فاقد مادگی در لیمو شیرین تتراپلوئید (پرچم‌ها جدا شده‌اند)، ت) پاکت‌گذاری گل‌ها در ارقام لمون (مادر) پس از گرده افشانی، ث) میوه‌های رشد یافته در لمون 'Eureka'، ج) کشت بذره‌های بسیار ریز در محیط B و C گیاهچه‌های به دست آمده (منبع: یافته‌های پژوهش).

## یافته‌های پژوهش

### سطح پلوئیدی شاخه‌های اصلی در درخت‌های A, B, C, D و E

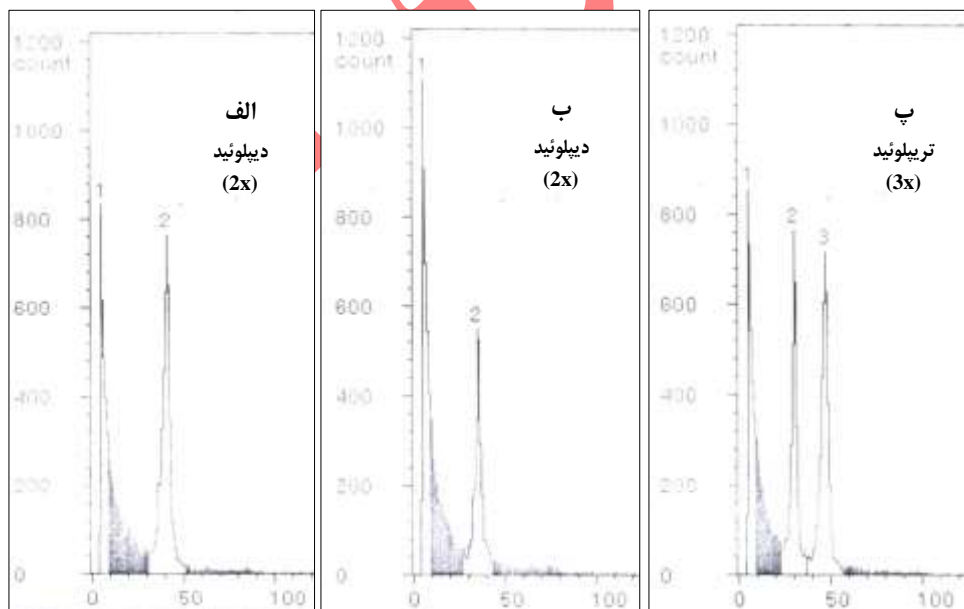
طبق جدول ۱ و شکل ۲ (الف و ب) نمونه‌های ۱ و ۲ که به عنوان شاهد دیپلوئید جداگانه از دو اصله نهال لیمو ترش شیرازی برداشت شدند، سطح کروموزومی مورد انتظار دیپلوئید و نمونه‌های شماره ۳ از 'پرشین' لایم، سطح کروموزومی تریپلوئید را نشان دادند (شکل ۲-پ). از پنج شاخه درخت A، چهار شاخه یعنی شاخه‌های A1, A2, A3 و A4 هر یک با نشان دادن یک پیک اصلی (پیک شماره ۲) سطح دیپلوئیدی (2X) را نشان دادند (شکل ۳-الف). تنها یک شاخه، یعنی شاخه شماره ۵؛ در هیستوگرام مربوطه دو پیک اصلی یعنی پیک‌های ۲ و ۳ را نشان داد که به ترتیب مربوط به سطح پلوئیدی دیپلوئید (2X) و تتراپلوئید (4X) بود (شکل ۳-ب). بنابراین، شاخه‌ی شماره ۵ در درخت A به عنوان شاخه میکس پلوئید یا پلوئیدی کایمرا<sup>۱</sup> با ژنوتیپ 2X+4X تعیین شد. در هر یک از این هیستوگرام‌ها، پیک یا قله شماره ۱، پیک اصلی نبوده و پیک ثابتی است که به احتمال زیاد مربوط به مرحله‌ی سلولی G<sub>1</sub> می باشد. در درخت B در هیستوگرام فلوسیتومتری مربوط به هر یک از هفت شاخه اصلی، دو پیک اصلی یعنی پیک‌های شماره ۲ و ۳ مشاهده شد که پیک شماره ۲ مربوط به شاهد (لیمو ترش دیپلوئید) و پیک شماره ۳ مربوط به نمونه شاخه اصلی درخت B می باشد. در درخت B هر هفت شاخه اصلی سطح پلوئیدی یکسان و تریپلوئید (3X) را نشان دادند (شکل ۳-پ). طبق جدول ۱، سطح پلوئیدی شاخه‌های درخت‌های لیمو شیرین C و D تتراپلوئید و شاخه‌های درخت E دیپلوئید تعیین شد.

جدول ۱. سطح پلوئیدی در شاخه‌های درخت‌های شاهد، درخت‌های لیمو ترش A و B و لیمو شیرین‌های C, D و E

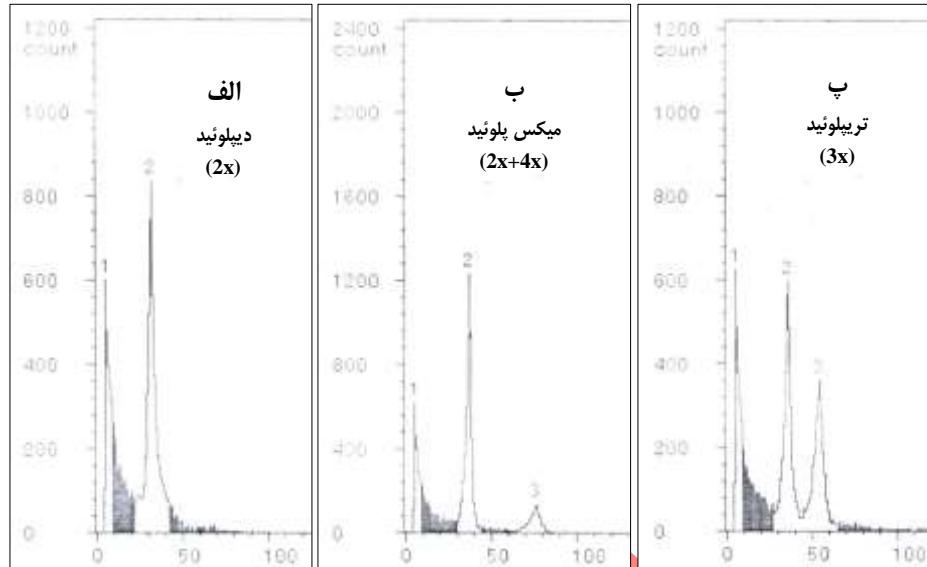
<sup>1</sup>. Mixploid or ploidy chimera

نوع درخت	کد شاخه	عدد مد مربوط		سطح پلوئیدی
		به پیک ۲	به پیک ۳	
لیمو ترش مکزیکن شماره ۱	شاهد ۱	۴۱	--	2X
لیمو ترش مکزیکن شماره ۲	شاهد ۲	۳۵	--	2X
پرشین لایم + شاهد ۱	شاهد ۳	۳۰	۴۷	3X = پرشین لایم, 2X = شاهد ۱
درخت A	شاخه ۱ (A1)	۳۲	--	2X
	شاخه ۲ (A2)	۴۲	--	2X
	شاخه ۳ (A3)	۴۰	--	2X
	شاخه ۴ (A4)	۴۰	--	2X
	شاخه ۵ (A5)	۳۷	۷۷	2X+4X
درخت B	شاهد ۱+۲ (B1)	۳۷	۵۶	2 شاهد ۲ = 2X, B1 = 3X
	شاهد ۲+۲ (B2)	۳۹	۵۹	2 شاهد ۲ = 2X, B2 = 3X
	شاهد ۲+۳ (B3)	۳۹	۵۹	2 شاهد ۲ = 2X, B3 = 3X
	شاهد ۲+۴ (B4)	۳۶	۵۴	2 شاهد ۲ = 2X, B4 = 3X
	شاهد ۲+۵ (B5)	۳۷	۵۶	2 شاهد ۲ = 2X, B5 = 3X
	شاهد ۲+۶ (B6)	۳۵	۵۳	2 شاهد ۲ = 2X, B6 = 3X
	شاهد ۲+۷ (B7)	۳۷	۵۶	2 شاهد ۲ = 2X, B7 = 3X
جعفری+درخت C	--	۴۲	۱۰۱	4X
جعفری+درخت D	--	۴۱	۹۹	4X
جعفری+درخت E	--	۲۱	۱۰۲	2X

(منبع: یافته‌های پژوهش).



**شکل ۲.** هیستوگرام سلول‌های رنگ‌آمیزی شده برگ برای اندازه‌گیری میزان DNA (هیستوگرام فلوسیتومتری)، شاهد ۱ (لیمو ترش مکزیکن، دیپلوئید، درخت شماره ۱)، شاهد ۲ (لیمو ترش مکزیکن، دیپلوئید، درخت شماره ۲) و شاهد ۳ (شاهد ۱ دیپلوئید دارای پیک ۲ + پرشین لایم تریپلوئید دارای پیک ۳). در همه هیستوگرام‌ها پیک شماره ۱ ثابت بوده و به احتمال زیاد مربوط به مرحله سلولی  $G_1$  می‌باشد. واحد محور عمودی سمت چپ تعداد هسته و واحد محور افقی میزان فلورسنس می‌باشد. (منبع: یافته‌های پژوهش).



شکل ۳. هیستوگرام سلول‌های رنگ‌آمیزی شده برگ برای اندازه‌گیری میزان DNA (هیستوگرام فلوسیتومتری)، الف) شاخه A1، ب) شاخه A5 و پ) شاهد ۲ (بیک ۲) + نمونه شاخه B4 (بیک ۳) (منبع: یافته‌های پژوهش).

### مقایسه صفات برگ در درخت‌های A و B

در جدول ۲، صفات اصلی برگ در دو درخت A و B با یکدیگر مقایسه شده‌اند. طبق داده‌های این جدول بین برگ‌های درخت A و B از نظر طول، عرض، ضخامت پهنک و طول دم‌برگ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. درخت B در مقایسه با درخت A (به جز شاخه میکس پلوئید A5) از برگ‌های بزرگتر و ضخیمتر با دم‌برگ کوتاهتر برخوردار بود. پهنک برگ‌های درخت A که همه شاخه‌های آن دیپلوئید بود (به جز A5)، نسبت به برگ‌های درخت B با شاخه‌های تریپلوئید، تراکم روزنه‌ای و کیسه‌های ترش‌چی بیشتری نشان داد.

جدول ۲. مقایسه میانگین صفات برگ در دو درخت لیمو ترش مکزیکن A و B با استفاده از آزمون  $t$

صفات برگ	درخت A	درخت B	$t$	Sin. (2-tailed)
طول پهنک (mm)	۴۳/۵۱±۴/۶۳*	۵۵/۳۷±۴/۲۹	-۷/۲۷	./..**
عرض پهنک (mm)	۲۹/۰۹±۳/۷۰	۳۵/۷۲±۳/۶۳	-۴/۹۴	./..
ضخامت پهنک (mm)	۰/۲۷±۰/۰۳۵	۰/۳۰±۰/۰۲۸	-۲/۰۹	./۰۴۵
طول دم‌برگ (mm)	۹/۸۵±۲/۲۷	۶/۳۳±۱/۴۰	۵/۱۱	./..
تراکم روزنه‌ها***	۶۱/۱۹±۷/۳۸	۲۵/۸۵±۳/۴۰	-۳۸/۷۶	./..
تراکم کیسه‌های ترش‌چی	۴۰/۲۷±۶/۷۲	۲۶/۰۰±۷/۹۰	-۱۱/۱۷	./..

\*Mean±Standard deviation, \*\*P<۰/۰۵

\*\*\*شمارش تعداد روزنه‌ها و کیسه‌های ترش‌چی پهنک با بزرگنمایی ۴۰ و در اندازه ۱۸۰۰×۱۸۰۰ پیکسل انجام پذیرفت (منبع: یافته‌های پژوهش).

### صفات میوه مربوط به شاخه‌های درخت‌های A و B

در جدول ۳، تعدادی از مهمترین ویژگی‌های میوه مربوط به یکی از شاخه‌های درخت A و یکی از شاخه‌های درخت B آورده شده است. سطح پلوئیدی این شاخه از درخت A تعیین نشد. زیرا، این شاخه در سال ۱۳۹۷ به میوه‌دهی رسید و پس از برداشت میوه‌ها به دلیل خشک شدن از ته بریده شد. در حالی که، آنالیزهای فلوسیتومتری شاخه‌های اصلی این درخت در سال ۱۴۰۱ انجام پذیرفت. سطح پلوئیدی شاخه ذکر شده همان‌طور که داده‌های صفات میوه مربوط به این شاخه نشان می‌دهد، نمی‌تواند دیپلوئید باشد. در لیمو



ترش‌های دیپلوئید میوه‌ها کوچک‌تر، پوست نازک‌تر و پر آب‌تر هستند. در صورتی که، میوه‌های این شاخه درشت‌تر، پوست کلفت‌تر و کم آب‌تراند. این موارد از ویژگی‌های بارز تتراپلوئیدها در مرکبات می‌باشد (Nukaya et al., 2019). بنابراین، احتمال این که این شاخه تتراپلوئید و یا حتی میکس‌پلوئید بوده، بیشتر است.

جدول ۳. ویژگی‌های میوه مربوط به یکی از شاخه‌های درخت A در سال ۱۳۹۷ و یکی از شاخه‌های درخت B (شاخه B4) در سال ۱۴۰۱

درخت	وزن (g)	طول (mm)	عرض (mm)	عرض/طول	ضخامت پوست (mm)	تعداد پره	تعداد بذر	درصد چند جینی*	درصد آب میوه	TSS (°Brix)	TA (%)	TSS/TA	ویتامین C (mg/100ml)
درخت A													
۱	۳۴	۴۲/۵۴	۳۹/۰۲	۱/۰۹	۱/۷۹	۹	۱	--	۳۵/۶۶	۹/۲	۹/۴۳	۰/۹۸	۴۲/۶
۲	۳۰/۵	۴۲/۳۳	۳۸/۳۰	۱/۱	۱/۴۲	۱۰	۱۳	--	۴۳/۹۵	۹	۸/۲۴	۱/۱	۴۳/۸۴
۳	۳۷/۲	۴۳/۷۲	۴۰/۸۴	۱/۰۷	۱/۶۳	۱۰	۷	--	۴۱/۰۶	۹/۲	۸/۰۷	۱/۱	۴۱/۶۱
۴	۴۲/۹	۴۷/۴۸	۴۱/۹۸	۱/۱۳	۱/۸۸	۱۰	۱۴	--	--**	--	--	--	--
۵	۲۶/۱	۳۹/۷۸	۳۵/۵۴	۱/۱۲	۱/۲۲	۹	۴	--	--	--	--	--	--
۶	۲۶/۵	۴۳/۰۷	۳۴/۸۷	۱/۲۴	۱/۹۶	۹	۷	--	--	--	--	--	--
میانگین	۳۲/۶۴	۴۳/۲۸	۳۸/۳۰	۱/۱۳	۱/۶۳	۹/۶	۷/۶۷	۵۲/۳۸	۴۰/۲۳	۹/۱۴	۸/۵۸	۱/۰۶	۴۲/۶۸
±SD	±۶/۵۲	±۲/۵۱	±۲/۸۲	±۰/۶۰	±۰/۲۹	±۰/۵۵	±۵/۰۵	--	±۴/۲۱	±۰/۱۲	±۰/۷۴	±۰/۰۷	±۱/۱۲
درخت B													
۱	۲۶	۳۹/۹۹	۳۵/۴۸	۱/۱۳	۱/۷۷	۷	۱	۰/۰۰	۹/۸	۸/۲۰	۷/۲۱	۱/۱۴	۳۱/۴۴
۲	۴۲	۴۳/۰۰	۴۲/۸۴	۱/۰۰	۲/۲۵	۱۰	۳	۰/۰۰	۱۸/۹	۸/۲۰	۷/۲۱	۱/۱۴	۳۱/۴۴
۳	۲۸	۴۰/۰۴	۳۶/۱۲	۱/۱۱	۱/۷۶	۱۰	۲	۰/۰۰	۱۱/۶	۸/۴۰	۷/۲۱	۱/۱۶	۳۱/۴۴
میانگین	۳۲	۴۱/۰۱	۳۸/۱۵	۱/۰۸	۱/۹۳	۹	۲	۰/۰۰	۱۳/۴۳	۸/۲۷	۷/۲۱	۱/۱۵	۳۱/۴۴
±SD	±۸/۷۲	±۱/۷۲	±۴/۰۸	±۰/۰۷	±۰/۲۸	±۱/۷۳	±۱/۰	±۰/۰۰	±۴/۸۲	±۰/۱۱	±۰/۰۰	±۰/۰۱	±۰/۰۰

\* در محاسبه درصد چندجینی بذر، همه بذرهای مربوط به ۶ عدد میوه (۴۶ عدد) پوست کنده شده و جنین‌های هر بذر شمارش و سپس درصد گرفته شد.  
 \*\* برای اندازه‌گیری درصد آب میوه، TSS، TA و ویتامین C از سه نمونه حاصل از مخلوط عصاره میوه‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ با ۶ استفاده شد (منبع: یافته‌های پژوهش).

در جدول ۳، ویژگی‌های میوه مربوط به یکی از شاخه‌های درخت B (B4) نیز آورده شده است. سطح پلوئیدی این شاخه تریپلوئید بود (شکل ۳-پ). همان‌طور که داده‌های این جدول نشان می‌دهد، میوه‌های این شاخه از اندازه متوسط و پوست نازک برخوردارند. از ویژگی‌های بارز مرکبات تریپلوئید بی‌بذری میوه می‌باشد. اما داده‌های جدول ۳ نشان می‌دهد که هر سه میوه این شاخه به طور متوسط دارای دو عدد بذر بودند. از سه میوه شاخه B4، هشت عدد بذر استخراج شد. دو عدد از این بذرها فاقد جنین رشد یافته بودند و شش بذر باقی مانده تک‌جنین بوده و جوانه‌زنی خوبی داشتند. این یافته نشان می‌دهد که درخت B بذرهای بسیار کم ولی به شدت تک‌جنین تولید می‌کند. تولید بذر تک‌جنین در بهنژادی مرکبات بسیار حائز اهمیت بوده و در دورگ‌گیری‌ها و تولید هیبریدها ویژگی مثبت به شمار می‌رود.

### دورگ‌های به دست آمده از تلاقی‌ها و سطح پلوئیدی آنها

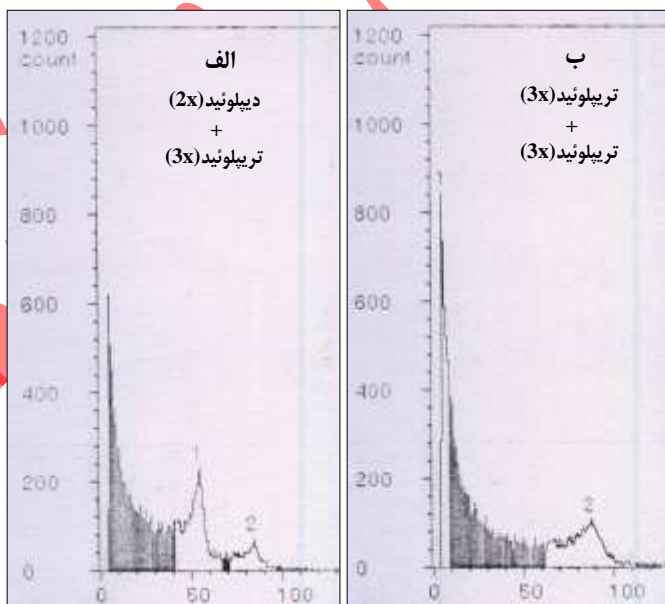
طبق جدول ۴، میزان دانه‌های گرده زنده و جوانه‌زنی آنها در لیمو ترش 'مکزیکن' (کی لایم)، درخت B، که به عنوان والد پدر به کار رفت، صفر بود. بنابراین، از تلاقی بین نارنگی کلماتین به عنوان مادر و لیمو ترش 'مکزیکن' به عنوان والد پدر هیچ میوه و هیچ بذری به دست نیامد. در لیموهای شیرین به کار رفته به عنوان والد پدر تقریباً همه گل‌ها ناقص و فاقد مادگی بودند (شکل ۱-پ). دانه‌های گرده جمع‌آوری شده از این گل‌ها با رنگ‌آمیزی توسط محلول آستوکارمین یک درصد از رنگ‌گیری بسیار خوبی برخوردار

بوده (بین ۷۰ تا ۸۰ درصد) و بیش از ۱۰ درصد (۱۲ درصد) جوانه‌زنی نشان دادند (جدول ۴). با استفاده از این دانه‌های گرده همه تالاقی‌های انجام شده روی درختان مادری سه رقم لیمون در ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا تشکیل میوه و بذر دادند (جدول ۴). بررسی سطح پلوئیدی نهال‌های دورگ به دست آمده از تالاقی‌ها نشان داد که طبق جدول‌های ۵ و ۶، از ۱۵ اصله نهال ارزیابی شده پنج اصله نهال (کدهای ۲، ۴، ۵، ۸ و ۱۲) (۳۳٪ از نهال‌ها) سطح پلوئیدی تریپلوئید را نشان دادند (شکل ۴). ارتفاع این پنج اصله نهال تریپلوئید (با میانگین ۲۷/۶ سانتی‌متر در سن یک سالگی) در مقایسه با ۱۰ اصله نهال هم‌سن دیگر که دیپلوئید بودند (با میانگین ارتفاع ۵۷/۲ سانتی‌متر) بسیار کوتاه‌تر بود (جدول ۶).

**جدول ۴.** در صد دانه‌های گرده زنده و جوانه زده در لیمو ترش و شیرین به کار رفته به عنوان والد پدر، تعداد گل گرده افشانی شده، تعداد میوه و تعداد بذر به دست آمده از تالاقی‌های انجام شده در ایستگاه کترا

والد پدر	درصد دانه های گرده زنده	درصد جوانه زنی دانه گرده	تالاقی	تعداد گل تالاقی یافته	تعداد میوه	تعداد بذر	تعداد بذر ریز	تعداد* بذر دارای جنین	تعداد بذر فاقد جنین
Sweet lime 4X	۷۰ تا ۸۰	۱۲	'Eureka' × Sweet lime 4X	۲۰	۱۲	۳۵۶	۸۷	۳۹	۴۸
Mexican lime (B)	۰/۰	۰/۰	'Cook Eureka' × Sweet lime 4X	۱۱	۱۰	۲۳۸	۴۶	۱۸	۲۸
--	--	--	'Lisbon' × Sweet lime 4X	۳	۲	۶۲	۱۰	۴	۶
مجموع	--	--	--	۳۴	۲۴	۶۵۶	۱۴۳	۶۱	۸۲

\*کشت شده در شرایط *In vitro* (منبع: یافته‌های پژوهش).



**شکل ۴.** هیستوگرام‌های فلوسیتومتری: الف) پیک ۱ مربوط به هیبرید شماره ۱ (دیپلوئید) و پیک ۲ مربوط به 'پرشین' لایم (تریپلوئید) به عنوان شاهد می‌باشد، ب) پیک ۲ شامل دو پیک روی هم مربوط به هیبرید شماره ۲ (تریپلوئید) و 'پرشین' لایم (تریپلوئید و شاهد) می‌باشد (منبع: یافته‌های پژوهش).

جدول ۵. سطح پلوئیدی نهال‌های به دست آمده از تلاقی‌های بین والدین دارای سطوح کروموزومی متفاوت (2X×4X)

شماره هیبرید	نوع تلاقی	تعداد پیک در هیستوگرام [نمونه + شاهد (تریپلوئید)]	عدد مد مربوط به پیک ۲	عدد مد مربوط به پیک ۳	سطح پلوئیدی
۱	Eureka × Sweet lime 4X	۲	۵۵	۸۵	(2X) دیپلوئید
۲	Eureka × Sweet lime 4X	۱	۸۷	--	(3X) تریپلوئید
۳	Lisbon × Sweet lime 4X	۲	۵۵	۸۲	(2X) دیپلوئید
۴	Eureka × Sweet lime 4X	۱	۸۸	--	(3X) تریپلوئید
۵	Eureka × Sweet lime 4X	۱	۸۱	--	(3X) تریپلوئید
۶	Eureka × Sweet lime 4X	۲	۵۵	۸۱	(2X) دیپلوئید
۷	Eureka × Sweet lime 4X	۲	۵۹	۸۵	(2X) دیپلوئید
۸	Eureka × Sweet lime 4X	۱	۸۲	--	(3X) تریپلوئید
۹	Eureka × Sweet lime 4X	۲	۵۳	۸۱	(2X) دیپلوئید
۱۰	Eureka × Sweet lime 4X	۲	۵۶	۸۳	(2X) دیپلوئید
۱۱	Eureka × Sweet lime 4X	۲	۵۶	۸۲	(2X) دیپلوئید
۱۲	Cook Eureka × Sweet lime 4X	۱	۸۲	--	(3X) تریپلوئید
۱۳	Cook Eureka × Sweet lime 4X	۲	۵۴	۷۹	(2X) دیپلوئید
۱۴	Cook Eureka × Sweet lime 4X	۲	۵۱	۷۶	(2X) دیپلوئید
۱۵	Cook Eureka × Sweet lime 4X	۲	۵۲	۸۰	(2X) دیپلوئید

(منبع: یافته‌های پژوهش).

جدول ۶. تعداد نهال به دست آمده از تلاقی‌ها و مقایسه میانگین ارتفاع در دو گروه از نهال‌های یک ساله دیپلوئید و تریپلوئید به دست آمده در این پژوهش

تلاقی	تعداد نهال	تعداد نهال تریپلوئید	کد نهال‌ها در گروه دیپلوئید	کد نهال‌ها در گروه تریپلوئید
Eureka × Sweet lime 4X	۱۰	۴	۱۱، ۱۰، ۹، ۷، ۶، ۵، ۴، ۳	۸، ۵، ۴، ۲
Cook Eureka × Sweet lime 4X	۴	۱	۱۵، ۱۴، ۱۳	۱۲
Lisbon × Sweet lime 4X	۱	۰	۳	--
مجموع	۱۵	۵	--	--
میانگین ارتفاع (M±SD)	--	--	۵۷/۲±۱۶/۸۵	۲۷/۶±۸/۵۳

(منبع: یافته‌های پژوهش).

## بحث

در این پژوهش نمونه‌های شاهد ۱ و ۲ که جداگانه از دو اصله نهال لیمو ترش 'مکزیکن' (درخت ۱ و درخت ۲) پیوند شده روی پایه نارنج برداشت شدند، سطح کروموزومی معمول و مورد انتظار دیپلوئید (2x) در جنس سیتروس را نشان دادند. 'پرشین' لایم که به طور طبیعی گیاهی تریپلوئید است (Bacchi, 1940; Moore, 2001) به عنوان شاهد ۳ آن‌طور که انتظار می‌رفت نیز سطح کروموزومی تریپلوئید (3x) را نشان داد. بنابراین، نتایجی که از آنالیز سطح پلوئیدی گیاهان شاهد به دست آمد، درستی روش به کار رفته در این پژوهش را برای تعیین سطح پلوئیدی شاخه‌های درخت‌های A, B, C, D و E به اثبات رساند. نهال‌های A, B, C, D و E با به کارگیری تیمارهای کلشیسین روی مریستم انتهایی نهال‌های بذری در مرحله دوبرگی به دست آمده بودند (Afshar

Mohammadian *et al.*, 2012; Afshar Mohammadian *et al.*, 2013) این پنج اصله نهال که پس از گذشت حدود ده سال در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند همگی به مرحله بلوغ رسیده و شاخه‌های اصلی آنها از تقسیم متوالی سلول‌های مریستم انتهایی نهال بذری اولیه حاصل شده بود. در مرکبات مریستم‌های انتهایی از سه لایه سلولی شامل L1، L2 و L3 تشکیل شده‌اند. لایه L1 لایه اپیدرم و همچنین بخش اصلی گوشت میوه (پالپ<sup>۱</sup>) یعنی کیسه‌های محتوی عصاره را به وجود می‌آورد. لایه L2 سلول‌های جنسی (گامت‌ها)، بافت‌های زیر اپیدرم و بافت خورش (نوسلوس) را تولید می‌کند و لایه L3 دسته‌جات آوندی را می‌سازد (Caruso *et al.*, 2020). بسته به این که کلشیسین تا کدام لایه سلولی از سه لایه ذکر شده نفوذ کرده باشد و همچنین در هر لایه چه موقعیت و چه تعداد از سلول‌ها را تحت تاثیر قرار داده باشد، نتایج آن روی ژنوتیپ (نتیجه فلوسیتومتری) و فنوتیپ (ویژگی‌های مرفولوژیک) شاخه‌ها متفاوت بوده است. نتایج این پژوهش نشان داد که درخت A دارای یک شاخه میکس‌پلوئید بود و دیگر شاخه‌های آن در سطح دیپلوئیدی باقی ماندند. این پدیده ممکن است به علت تاثیر اندک کلشیسین یعنی تاثیر کلشیسین روی تعداد اندکی از سلول‌های مریستم انتهایی بروز کرده باشد (Aleza *et al.*, 209).

در درخت B، شاخه‌های بررسی شده سطح پلوئیدی یکسان و تریپلوئید (3X) را نشان دادند. انتظار نمی‌رود که این درخت از تاثیر کلشیسین به وجود آمده باشد، چرا که در گیاهان دیپلوئید مثل مرکبات با تیمار کلشیسین روی مریستم‌ها یا بذرها، بسته به غلظت و مدت زمان به کارگیری کلشیسین یا سطح پلوئیدی اصلی دیپلوئیدی (2X) حفظ می‌شود و یا این که ژنوتیپ‌های تتریپلوئید (4X) یا بیشتر و یا میکس‌پلوئید (2X+4X و 4X+8X) به وجود می‌آیند (Wakana *et al.*, 2005; Yasuda *et al.*, 2022) و تاکنون گزارشی مبنی بر به وجود آمدن گیاهان تریپلوئید پس از اعمال تیمار کلشیسین وجود ندارد. منشاء درخت B یکی از دو حالت نوسلار و یا جنسی می‌تواند باشد. در حالت اول از جنین نوسلار، یعنی جنین تولید شده در بافت نوسلوس (خورش) در خارج از کیسه جنینی به وجود آمده و در حالت دوم از لقاح سلول تخم در داخل کیسه جنینی. در صورتی که منشاء جنسی داشته باشد دو احتمال دیگر نیز وجود دارد: یا از ترکیب سلول تخم‌زای هاپلوئید (n) با دانه<sup>۲</sup> گرده دیپلوئید (2n) حاصل شده و یا از سلول تخم‌زای دیپلوئید (2n) لقاح یافته با دانه<sup>۲</sup> گرده هاپلوئید (n) به وجود آمده است. اثبات هر یک از این سه احتمال نیازمند بررسی‌های دقیق‌تر به روش‌های مولکولی و پیش‌رفته از جمله نشانگرهای مولکولی SNP و یا تعیین توالی DNA می‌باشد (Xia *et al.*, 2021). هر چند که مطالعات سیتولوژیک نشان داده‌اند که بیشتر جنین‌های تریپلوئید در حالت طبیعی از تلاقی تخمک کاهش نیافته (2n) با دانه گرده هاپلوئید (n) به وجود می‌آیند. در این حالت به دلیل آنکه آندوسپرم پنتاپلوئید (5n) خواهد شد، در مراحل اولیه رشد از بین می‌رود و به دلیل رشد زیاد جنین، قدرت آن در تولید نهال افزایش می‌یابد. پدیده‌ای که در بذرهای ریز اکثر مرکبات دیده می‌شود (Esen *et al.*, 1979; Wakana, 1981).

درخت B به دلیل تریپلوئیدی در مقایسه با درخت A که دیپلوئید بود برگ‌هایی تولید نمود که از پهنک بزرگتر، ضخیم‌تر و دمبرگ کوتاه‌تر برخوردار بودند. پهنک برگ‌های درخت B نسبت به درخت A از تراکم خیلی کمتر کیسه‌های ترش‌چی و روزنه‌ها نیز برخوردار بود. چنین نتیجه‌ای با یافته‌های دیگر پژوهشگران نیز هم‌خوانی دارد (Jiang *et al.*, 2022; Kiran *et al.*, 2024). درختان مرکبات تریپلوئید و تتریپلوئید نسبت به دیپلوئیدها از برگ‌های بزرگ‌تر و ضخیم‌تری برخوردارند (Nukaya *et al.*, 2019; Wakana *et al.*, 2005). بنابراین در این پژوهش بررسی صفات برگ نشان داد که تفاوت درخت A و B به احتمال زیاد مربوط به سطح پلوئیدی متفاوت آنها بوده است.

وجود بذر در میوه‌های شاخه B4 نشان دهنده آن است که گل‌های آن در شرایط گرده‌افشانی آزاد توسط دانه‌های گرده با قوه نامیه زیاد گرده افشانی شده‌اند چرا که دانه‌های گرده گل‌های این درخت قدرت جوانه‌زنی نداشتند. چنین پدیده‌ای حتی در 'پرشین' لایم نیز دیده می‌شود. 'پرشین' لایم که تریپلوئید بوده و بی‌بذر می‌باشد گاهی میوه‌هایی تولید می‌کند که تعداد بسیار کمی بذر دارند و این بذرها به شدت منوامبریون<sup>۲</sup> (تک‌جنین) هستند (Santos *et al.*, 2013). وجود یک تا دو عدد بذر در میوه‌های دیگر ارقام تریپلوئید مرکبات نیز گزارش شده است (Roverssi *et al.*, 2022). میوه‌های مرکبات اگر به طور متوسط دارای یک تا سه عدد بذر باشند از نظر تجاری بی‌بذر محسوب می‌شوند.

<sup>1</sup>. Pulp

<sup>1</sup>. Monoembryon

در این پژوهش، در یک سری از تلاقی‌ها از نارنگی کلمانتین به عنوان والد مادر استفاده شد، زیرا این رقم خودناسازگار بوده، بذریه زیاد و صد در صد تک‌جنین تولید می‌کند. به این دلایل نیز این رقم در تلاقی‌ها و برنامه‌های به‌نژادی مرکبات همیشه به عنوان والد مادر مورد استفاده قرار گرفته است (Starrantino & Recuperero, 1981; Oiyama *et al.*, 1981). با انجام تلاقی‌ها روی نارنگی کلمانتین، همه میوه‌ها در تیر ماه شروع به ریزش نموده و هیچ تعداد میوه برای برداشت به مرحله نهایی نرسید. اگر چه در تیر ماه اصلی‌ترین دوره ریزش میوه‌ها در اکثر درختان میوه از جمله مرکبات اتفاق می‌افتد که به جون دراپ<sup>۱</sup> یا ریزش تیر ماه موسوم بوده و درصد زیادی از میوه چه‌ها در این دوره ریزش می‌نمایند (Iglesias *et al.*, 2006)، اما در این پژوهش عدم تشکیل میوه (به طور مطلق) در نارنگی کلمانتین به فقدان کامل قدرت جوانه‌زنی در دانه‌های گرده لیمو ترش (والد پدر)، درخت B، به کار رفته مربوط می‌شود. دانه‌های گرده به کار رفته که قدرت جوانه‌زنی نداشتند از گیاه دیپلوئید و یا تتراپلوئید منشاء نیافته بودند و نتایج این پژوهش نشان داد که این دانه‌های گرده از درختی جمع‌آوری شده بود که اگرچه احتمال می‌رفت تتراپلوئید باشد اما آنالیز فلوسیتومتری شاخه‌های آن نشان داد که تریپلوئید بوده است.

در مرکبات در صورتی که دسترسی به والد مادر با بذریه‌های صد در صد تک‌جنین فراهم نباشد، بسته به هدف به‌نژادی باید از دیگر ارقام که از بیشترین درصد تک‌جنینی برخوردارند استفاده کرد. به همین دلیل در این پژوهش چون هدف تولید ژنوتیپ‌های اسیدی (ترش) و تریپلوئید بود، سه رقم لیمو ترش از گروه لمون شامل 'اورکا'، 'کوک اورکا' و 'لیسون' با بیش از ۵۰ درصد بذریه تک‌جنین (Porras & Perez-Tornero, 2008) به عنوان والد مادر در تلاقی با لیمو شیرین‌های تتراپلوئید مورد استفاده قرار گرفتند و همه تلاقی‌های انجام شده روی درختان مادری سه رقم فوق تشکیل میوه و بذریه دادند.

در تلاقی‌های این پژوهش از والدین دیپلوئید به عنوان والد مادر استفاده شد ( $\text{♀}2X \times \text{♂}4X$ ). طبق نتایج پژوهش‌های دیگر، چنین تلاقی‌هایی در مقایسه با تلاقی‌های برعکس یعنی تلاقی‌های دارای والد ماده تتراپلوئید ( $\text{♀}4X \times \text{♂}2X$ )، نتایج تریپلوئید کم‌تری تولید می‌کنند و به علت آمیزش گامت‌های غیر طبیعی و کاهش نیافته دیپلوئید والد مادر (دیپلوئید) با گامت‌های طبیعی و دیپلوئید والد پدر (تتراپلوئید) فراوانی نتایج تتراپلوئید بیشتر است (Aleza *et al.*, 2010; Khan & Kender, 2007). اگرچه به علت کمی تعداد نتایج آنالیز شده در این پروژه نتایج تتراپلوئید به دست نیامد ولی تعداد نتایج تریپلوئید در مقایسه با دیپلوئیدها که احتمالاً نوسلار بوده‌اند نیز کمتر بود (۵ به ۱۰). از طرفی موقعی می‌توان در تلاقی‌ها از والد مادر تتراپلوئید استفاده کرد که بذریه والد مادر صد در صد و یا با درصد زیاد تک‌جنین باشند. در این پژوهش چون گل‌های لیمو شیرین‌های به کار رفته فاقد مادگی بودند، بنابراین از آنها فقط امکان استفاده به عنوان والد پدر فراهم بود.

گزارش‌های زیادی وجود دارد مبنی بر این که در درختان میوه ژنوتیپ‌های تریپلوئید و تتراپلوئید نسبت به دیپلوئیدهای مشابه به طور معنی‌دار از ارتفاع کمتری برخوردار می‌باشند (Guerra *et al.*, 2014; 2016) که با نتایج این پژوهش در یک راستا می‌باشد.

## نتیجه‌گیری و پیشنهادها

در این پژوهش از تلاقی دو رقم لمون ('اورکا' و 'کوک اورکا') به عنوان مادر با لیمو شیرین‌های تتراپلوئید به عنوان پدر، در مجموع پنج نوع ژنوتیپ تریپلوئید دورگ به دست آمد که باید از نظر فنوتیپی در آینده مورد بررسی‌های بیشتر قرار گیرند. برای این منظور پیشنهاد می‌شود که این ژنوتیپ‌ها روی پایه نارنج (*C. aurantium* L.) و یا پایه سوئینگل سیتروملو (*C. paradisi* Macfad. × *Poncirus*) *trifoliata* L. Raf. که از پایه‌های متداول در شمال کشور بوده و به راحتی فراهم می‌شوند، به تعداد کافی ازدیاد شده و حفظ و نگهداری شوند.

## قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت‌های پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (کرج) و پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری (رامسر و کترا) قدردانی می‌نمایند.

<sup>1</sup>. June drop

## منابع

- اسدی آبکنار، اسد. (۱۳۹۳). انتخاب از توده نهال‌های بذری با منشاء گرده‌افشانی آزاد در تعدادی از مرکبات اسیدی. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی. پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی. پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور- رشت.
- افشار محمدیان، منصور، پور اکبری، رقیه، امید، زینب و ترنگ، علیرضا. (۱۳۹۱). تاثیرات مورفولوژیک و فیزیولوژیک القای پلی‌پلوئیدی در گیاه لیمو ترش. زیست‌شناسی گیاهی. ۱۲-۱۳-۲۴.
- افشار محمدیان، منصور، امید، زینب، پور اکبری، رقیه و اسدی آبکنار، اسد. (۱۳۹۲). بررسی تاثیر پلی‌پلوئیدی بر برخی ویژگی‌های آناتومیکی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه لیمو ترش. مجله پژوهش‌های گیاهی. ۲۶ (۳). ۲۳۸-۲۴۶.
- گلغین، بهروز الف. (۱۳۹۴، بهمن). خرم، رقم جدید نارنگی برای مناطق مرکبات خیز شمال کشور. مقاله پوستری میوه‌کاری ارائه شده در نهمین کنگره علوم باغبانی، اهواز، ایران.
- گلغین، بهروز ب. (۱۳۹۴، بهمن). معرفی نارنگی زودرس جهانگیر. مقاله پوستری میوه‌کاری ارائه شده در نهمین کنگره علوم باغبانی، اهواز، ایران.
- Aleza, P., Juarez, J., Ollitrault, P., & Navarro, L. (2009). Production of tetraploid plants of non-apomictic citrus genotypes. *Plant Cell Reports*, 28(12), 1837-1846.
- Aleza, P., Juarez, J., Ollitrault, P. & Navarro, L. (2010). Polyembryony in non-apomictic citrus genotypes. *Annals of Botany*, 106(4), 533-545.
- Aleza, P., Juárez, J., Cuenca, J., Ollitrault, P., & Navarro, L. (2012). Extensive Citrus triploid hybrid production by 2x × 4x sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant Cell Reports*, 31(9), 1723-1735.
- Afshar Mohammadian, M., Pourakbari Kasmaei, R., Omidi, Z., Ghanati, F. & Tarang, A. (2012). Morphologic and physiologic effects on polyploidy induction in *Citrus aurantifolia*. *Journal of Plant Biology*, 12, 13-24. (In Persian).
- Afshar Mohammadian, M., Omidi, Z., Pourakbari, K. R. & Asadi Abkenar, A. (2013). The effect of polyploidy on some anatomical and antioxidant characteristics of *Citrus aurantifolia*. *Journal of Plant Research*, 26(3), 238-246. (In Persian).
- Asadi Abkenar, A. (2014). Selection in seedlings with open- pollination origin in some acid citrus accessions (For tolerance to Witches' Broom Disease of Lime). *Final report of project*. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII) – Branch of North Region – Rasht. (In Persian)
- Bacchi, O. (1940). Observacoes citológicas em Citrus. I. Número de cromossômios de algumas espécies e variedades. *Jornal de Agronomia Piracicaba*, 3, 249-258.
- Brewbaker, J. L. & Kwack, B. H. (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany*, 50(9), 859-865.
- Caruso, M., Smith, M. W., Froelicher, Y., Russo, G. & Gmitter Jr., F. G. (2020). Traditional breeding. In *The genus Citrus*. edited by Talon, M., Caruso, M. & Gmitter Jr., F. G. Woodhead Publishing, an imprint of Elsevier. United Kingdom. 129-148.
- Esen, A., Soost, R. K. & Geraci, G. (1979). Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in Citrus. *Journal of Heredity*, 70, 5-8.
- FAO. (2021). Citrus fruit fresh and processed statistical bulletin 2020. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome.
- Gmitter, F. G., Grosser, J. W., Castle, W. S. & Moore, G. A. (2007). Comprehensive citrus genetic improvement programme. In *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. edited by Khan, I. A. Oxford, CAB International, 9-19.
- Golein, B. (2016a, January). Khoram, new mandarine cultivar for citrus growing region of north of Iran. Poster paper of fruit culture, presented in the 9<sup>th</sup> congress of Iranian Horticultural Science, Ahvaz, Iran. (In Persian).
- Golein, B. (2016b, January). Introduction of early ripening mandarin, Jahangir. Poster paper of fruit culture, presented in the 9<sup>th</sup> congress of Iranian Horticultural Science, Ahvaz, Iran. (In Persian).
- Grosser, J. W., Barthe, G. A., Castle, B., Gmitter, F. G., & Lee, O. (2015). The development of improved tetraploid citrus rootstocks to facilitate advanced production systems and sustainable citriculture in Florida. *Acta Horticulturae*, 1065, 319-327.
- Guerra, D., Wittmann, M. T. S., Schwarz, S. F., de Souza, P. V. D., Gonzatto, M. P., & Weiler, R. L. (2014). Comparison between diploid and tetraploid citrus rootstocks: morphological characterization and growth evaluation. *Bragantia Campinas*, 73(1), 1-7.

- Guerra, D., Wittmann, M. T. S., Schwarz, S. F., Weiler, R. L., Dahmer, N., & de Souza, P. V. D. (2016). Tetraploidization in citrus rootstocks: effect of genetic constitution and environment in chromosome duplication. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16, 35-41.
- Iglesias, D. J., Tadeo, F. R., Primo-Millo, E., & Talon, M. (2006). Carbohydrate and ethylene levels related to fruitlet drop through abscission zone A in citrus. *Trees*, 20, 348-355.
- Jiang, J., Yang, N., Li, L., Qin, G., Ren, K., Wang, H., Deng, J. & Ding, D. (2022). Tetraploidy in *Citrus wilsonii* enhances drought tolerance via synergistic regulation of photosynthesis, phosphorylation, and hormonal changes. *Frontiers in Plant Science*, 13:875011. doi: 10.3389/fpls.2022.875011.
- Khan, I. A. & Kender, W. J. (2007). Citrus breeding: Introduction and objectives. In: *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. edited by Khan, I. A. CAB International, Oxford, 1-8.
- Kiran, K. N., Awater, S., Sanjay, K. S., Awasthi, O. P., Navinder, S. & Athmika, J. P. T. (2024). Characterization of second generation colchiploids in sweet orange (*Citrus sinensis*) cv. Mosambi with respect to morpho-physio-biochemical traits. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 94 (9), 971-976.
- Lora, J., Garcia-Lor, A., & Aleza, P. (2022). Pollen development and viability in diploid and doubled diploid citrus species. *Frontiers in Plant Science*, 13, 862813. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.862813>.
- Mathur, J. & Koncz, C. (1997). Method for preparation of epidermal imprints using agarose. *Bio Techniques*, 22(2), 280-282.
- Moore, G. A. (2001). Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetics*, 17, 536-540.
- Narukulla, V., Lahane, Y., Uge, P., Pandey, S., Fiske, K., Kawale, K., Jagannadham & Ziogas, V. (2024). Production of triploid seedless sweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cv. Mosambi: A success story. *Agronomy*, 14(4), 829.
- Nukaya, T., Sudo, M., Yahata, M., Nakajo, Y., Ohta, T., Yasuda, K., Tominaga, A., Mukai, H. & Kunitake, H. (2019). Characteristics in autotetraploid kumquats (*Fortunella* spp.) induced by colchicine treatment to nucellar embryos and their utilization for triploid breeding. *Scientia Horticulturae*, 245, 210-217.
- Oiyama, I., Okudai, N. & Takahara, T. (1981). Ploidy levels of seedlings obtained from  $2x \times 4x$  crosses in citrus. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1, 32-34.
- Perez -Torneró, O. & Porras, I. (2008). Assessment of polyembryony in lemon: rescue and in vitro culture of immature embryos. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 93, 173-180.
- Ray, P. K. (2002). Citrus. In: *Breeding Tropical and Subtropical Fruits*. Springer-Verlag Narosa Publishing House, P. 338.
- Raza, H. & Khan, M. (2003). Seedlessness in citrus (A review). *International Journal of Agriculture and Biology*, 5, 388-391.
- Reforgiato, G. R., Russo, G. & Recupero, S. (2005). New promising Citrus triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. *HortScience*, 40(3), 516-520.
- Roverssi, F., Cavicholi, T. M., Curtolo, M., Latado, R. R. & Yaly, M. C. (2022). Number of seeds in fruits and frequency of hybrids obtained in crossings with IAC 2019Maria mandarin. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 44(1), 1-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452022008>.
- Ruiz, M., Pina, J. A., Alcayde, E., Morillon, R., Navarro, L. & Primo-Millo, E. (2015). *Behavior of diploid and tetraploid genotypes of 'Carrizo' citrange under abiotic stress*. Paper presented at the twelfth international citrus congress, Valencia, Spain.
- Russo, G., Reforgiato, G. R., Recupero, S. & Paolo, D. P. (2015). 'Sweet Sicily' and 'Early Sicily', two new triploid from the program of CRA-research centre of citriculture and Mediterranean crops. *Proc. XIIIth Intl. Citrus Congress. Acta Horticulturae*, 1065, 215-221.
- Santos, M. G., Passos, O. S., Soares Filho, W. S., Girardi, E. A., Gesteira, A. S & Ferreira, C. F. (2013). Variability analysis of 'Persian' acid lime tree selections using agronomic and molecular markers. *Genetics and Molecular Research*. 12(4), 4604-4614.
- Starrantino, A. & Recupero, G. R. (1981). Citrus hybrids obtained *in vitro* from  $2x$  females  $\times$   $4x$  males. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1, 31-32.
- Barry, G. H., Caruso, M. & Gmitter Jr., F. G. (2020). Commercial scion varieties. In *The genus citrus*. edited by Talon, M., Caruso, M. & Gmitter Jr., F. G. Woodhead Publishing, an imprint of Elsevier. United Kingdom. 83-104.
- Tan, F. Q., Tu, H., Liang, W. J., Long, J., M., Wu, X. M., Zhang, H. Y. & Guo, W. W. (2015). Comparative metabolic and transcriptional analysis of a doubled diploid and its diploid citrus rootstock (*C. junos* cv. Ziyang xiangcheng) suggest its potential value for stress resistance improvement. *BMC plant Biology*, 15, 89, DOI 10:1186/s12870-015-0450-4.
- Wakana, A. (1981). Seed development in relation to ploidy of zygotic embryo and endosperm in polyembryonic Citrus. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1, 35-39.

- Wakana, A., Hanada, N., Park, S. M., Fukudome, I., & Kajiwara, K. (2005). Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicine. *Journal of Faculty of Agriculture of Kyushu University*, 50(1), 93-102.
- Xia, Q., Wang, W., Xie, K., Wu, X., Deng, X., Grosser, J. W. & Guo, W. (2021). Unreduced megagametophyte formation via second division restitution contributes to tetraploid production in interploidy crosses with 'Orah' mandarin (*Citrus reticulata*). *Frontiers of Agricultural Science and Engineerig*, 8(2), 302-313.

## Extended Abstract

### Introduction

Acid limes and lemons belong to a group of citrus known as acid citrus. Fruits of this group are highly juicy, acidic, containing high vitamin C and seeds. One of the most important aims in citrus breeding is to obtain cultivars producing seedless fruits. Like other citrus, fruits of seedless lime and lemon cultivars are highly valuable both in fresh consuming market and in processing industry. In citrus, fruits of diploid and tetraploid genotypes contain seeds and only triploid genotypes are seedless. To obtain triploids at first tetraploid cultivars should be produced and then by crossing between diploids and tetraploids or vice versa it is possible to get triploid cultivars. The aim of this research was obtaining acid citrus triploid genotypes by means of controlled crossings between diploid and tetraploid citrus cultivars.

### Materials and Methods

In Agricultural Biotechnology Research Institute of North of Iran (Rasht), by applying colchicine treatments some polyploidy genotypes of 'Mexican' or key lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) and sweet lime (*Citrus limettioides* Tan.) have been produced and well protected. In the present research these genotypes were used for production of triploid genotypes. In the first step using flowcytometry method polyploidy level stability for two genotypes of key lime labeled as A and B and three genotypes of sweet lime labeled as C, D and E were investigated. A number of vegetative and reproductive characteristics of A and B trees were also evaluated, including leaf (length, width and diameter of blade, length of petiole and stomatal density) and fruit characters (weight, length, width, total soluble solids, total acidity, peel thickness, seed number, juice content and polyembryony of seeds). In the second stage in citrus research station of Ramsar controlled crossing was made between clementine mandarin and 'Mexican' lime (B tree), and in Kotra citrus station (Mazandaran province) controlled crosses were made between three female parents of lemon ('Eureka', 'Cook Eureka' and 'Lisbon') and two sweet lime tetraploids (C and D trees). For rescue of triploid embryos, seed from fruits of the crosses were extracted, washed and grouped based on their size and weight. Only those seeds less than 0.09 g (very small seeds that supposed to be highly monoembryonic) were cultured in media B<sub>5</sub> medium supplemented with 3% sucrose, 0.7% Agar, 0.5g/l malt extract and 1mg/l GA<sub>3</sub>.

### Results and Discussion

The results showed that in tree A, four of five main branches (A1, A2, A3 and A4), each with one main flowcytometric peak, were diploid ( $2n=2X$ ). Only one main branch (A5) with two separate main flowcytometric peaks was mix-ploid ( $2X+4X$ ). In tree B, all of seven main branches were equally triploid ( $2n=3X$ ). Leaves of tree B (triploid) comparing to tree A (diploid excepting A5) were larger and thicker, with shorter petiole and more scattered stomata. Fruits of one branch of tree B (B4) included two seeds in average. As tree B is triploid and its commercial seedlessness is important it is necessary that each of its branches to be multiplied by vegetative propagation for maintenance also for more study and use in breeding improvement. From crossing between clementine mandarin and 'Mexican' lime no fruit as well as no seed was obtained. However, in crosses of three female parents of lemon ('Eureka', 'Cook Eureka' and 'Lisbon') with tetraploid sweet limes fruits were obtained. Embryos resulted from these female parents in B<sub>5</sub> medium supplemented with 1.5 mg/l of GA<sub>3</sub> showed highest percentage and shortest of germination. 35 days after *in vitro* germination seedlings were transferred to out of *in vitro* condition. From 15 seedlings which analyzed for ploidy level by flowcytometry, ten seedlings were diploid (nucellar) and five seedlings were triploid ( $2n=3X$ ), four from 'Eureka' × sweet lime and one from 'Cook Eureka' ×



sweet lime. In future these triploid seedlings should be more studied for their fruits characters to determine their potential as new citrus cultivars and commercial production.

### **Conclusion**

From crosses of 'Eureka' and 'Cook Eureka' diploid lemons (females) with tetraploid sweet lime (male), in total five triploid genotypes were obtained which should be more evaluated for phenotypic characteristics in future. For this purpose, we suggeste that triploid genotypes of this research must be propagated on sour orange or citromelo rootstocks for preservation and having enough plant materials.

فیلدیناواتی  
ولادت  
ولادت