The University of Tehran Press

Iranian Journal of Horticultural Science

Online ISNN: 2008-482X

Homepage: http:// ijhs.ut.ac.ir/

Hybridization between diploid and tetraploid parents in sour citrus breeding

Elham Jalilzadeh [1], Asad Asadi Abkenar [2]✉, Parisa Jonoubi[3], Sahar Bohlouli Zanjani [4], Reza Fifaei [5], Abuzar Hashempour [6]

1. Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail: elham.jaliazadeh.62@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Molecular Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of North Region, Rasht, Iran. E-mail: asadiabkenarasad@gmail.com
3. Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail: jonoubi@khu.ac.ir
4. Department of Molecular Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of North Region, Rasht, Iran. E-mail: bohlouli.sz@gmail.com
5. Department of Genetics and Breeding, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran. E-mail: rezafifaei@gmail.com
6. Department of Physiology and Post-harvest Technology, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran. a.hashempour@areeo.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 18 September 2024

Received in revised form: 29 January 2025

Accepted: 13 February 2025

Published online: Summer 2025

Keywords:

Breeding,

lemon,

lime,

seedlessness,

triploid.

ABSTRACT

This study aimed to develop triploid acid citrus genotypes. To this end, we evaluated the ploidy stability of two key lime genotypes (A and B) and three sweet lime genotypes (C, D, and E). The results showed that in tree A, four of the five main branches (A1–A4) were diploid (2n = 2x), whereas one branch (A5) was mixoploid (2x + 4x). In contrast, all seven main branches of tree B were uniformly triploid (2n = 3x). Among the sweet lime genotypes, trees C and D were tetraploid, while tree E was diploid. Controlled crosses were then carried out between clementine mandarin and the triploid key lime (tree B), as well as between three lemon female parents (‘Eureka’, ‘Cook Eureka’, and ‘Lisbon’) and two tetraploid sweet lime genotypes (trees C and D). Crosses between clementine mandarin and the Mexican lime (tree B) produced neither fruit nor seeds. In contrast, crosses involving the three lemon cultivars and the tetraploid sweet limes successfully produced both fruit and seeds. The resulting seeds, which were small in size and highly monoembryonic, were cultured on B5 medium. Flow cytometric analysis of fifteen interploid hybrids identified ten diploid seedlings of nucellar origin and five triploid seedlings (2n = 3x). Of the triploid seedlings, four were derived from the ‘Eureka’ × sweet lime cross and one from the ‘Cook Eureka’ × sweet lime cross. These triploid seedlings represent a novel outcome. They are expected to be seedless and should be further evaluated for their phenotypic traits.

Cite this article: Jalilzadeh, E., Asadi Abkenar, A., Jonoubi, P., Bohlouli Zanjani, S., Fifaei, R. & Hashempour, A. (2025). Hybridization between diploid and tetraploid parents in sour citrus breeding. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 56 (2), 303-322. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2025.382082.2210

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2025.382082.2210

Extended Abstract

Introduction

Acid limes and lemons belong to a group of citruses known as acid citrus. Fruits of this group are highly juicy, acidic, rich in vitamin C, and usually seeded. One of the most important goals in citrus breeding is to develop cultivars that produce seedless fruits. Like other citrus fruits, seedless lime and lemon cultivars are highly valuable in both the fresh fruit market and the processing industry. In citrus, fruits of diploid and tetraploid genotypes are generally seeded, whereas only triploid genotypes are seedless. To obtain triploids, tetraploid cultivars must first be produced, and then triploid cultivars can be generated through crosses between diploid and tetraploid plants, or vice versa. The aim of this research was to obtain triploid acid citrus genotypes through controlled crossings between diploid and tetraploid citrus cultivars.

Materials and Methods

In the Agricultural Biotechnology Research Institute of Northern Iran (Rasht), polyploid genotypes of 'Mexican' or key lime (Citrus aurantifolia Swingle) and sweet lime (Citrus limettioides Tan.) were previously developed by colchicine treatments and were well preserved. In the present study, these genotypes were used to produce triploid plants. In the first step, the polyploidy level stability of two key lime genotypes (A and B) and three sweet lime genotypes (C, D, and E) was evaluated using flow cytometry. Additionally, several vegetative and reproductive traits of trees A and B were assessed, including leaf characteristics (blade length, width, and diameter, petiole length, and stomatal density) and fruit traits (fruit weight, length, and width, total soluble solids, total acidity, peel thickness, seed number, juice content, and seed polyembryony). In the second stage of the study, controlled crosses were performed at the citrus research station in Ramsar between clementine mandarin and 'Mexican' lime (genotype B). Furthermore, at the Kotra citrus station (Mazandaran Province), controlled crosses were carried out between three female lemon parents ('Eureka', 'Cook Eureka', and 'Lisbon') and two sweet lime tetraploids (C and D). For rescue of triploid embryos, seeds were extracted from the fruits of the crosses, washed, and sorted based on their size and weight. Only seeds weighing less than 0.09 g (very small seeds, presumed to be highly monoembryonic) were cultured on B5 medium supplemented with 3% sucrose, 0.7% agar, 0.5 g/L malt extract, and 1 mg/L GA_3.

Results and Dicussion

In tree A, four of the five main branches (A1, A2, A3, and A4), each with a primary flow cytometric peak, were diploid (2n=2X). Only one main branch (A5) exhibited two distinct peaks, indicating a mixoploid (2X+4X) status. In tree B, all seven main branches were uniformly triploid (2n=3X). The leaves of tree B (triploid) were larger and thicker compared to those of tree A (mainly diploid, except A5), with shorter petioles and more scattered stomata. Fruits from one of the branches in tree B (B4) contained an average of two seeds. Since tree B is triploid and its seedlessness holds commercial value, it is essential to propagate each of its branches vegetatively for maintenance, further study, and use in breeding programs. Crosses between clementine mandarin and 'Mexican' lime produced no fruit or seeds. However, crosses involving three lemon female parents ('Eureka,' 'Cook Eureka,' and 'Lisbon') with tetraploid sweet limes resulted in fruit production. The embryos derived from these crosses, cultured in B5 medium supplemented with 1.5 mg/l GA3, showed the highest germination percentage and shortest germination time. Thirty-five days after in vitro germination, the seedlings were transferred to ex vitro conditions. Of the 15 seedlings analyzed for ploidy via flow cytometry, ten were diploid (nucellar), and five were triploid (2n=3X). Specifically, four seedlings originated from the 'Eureka' × sweet lime cross, and one from the 'Cook Eureka' × sweet lime cross. Future efforts should focus on further studying these triploid seedlings, especially their fruit characteristics, to evaluate their potential as new citrus cultivars for commercial production.

Conclusion

From crosses between diploid lemon cultivars 'Eureka' and 'Cook Eureka' (female parents) and tetraploid sweet lime (male parent), a total of five triploid genotypes were obtained. These genotypes should be further evaluated for their phenotypic characteristics in future studies. For this purpose, we suggeste that the triploid genotypes from this study be propagated onto sour orange or citrumelo rootstocks to ensure their preservation and to produce sufficient plant material for further research

Author Contributions

E. Jalilzadeh and A. Asadi Abkenar conceived and planned the experiments. S. Bohlouli Zanjani, A. Hashempour, E. Jalilzadeh and A. Asadi Abkenar carried out the experiments. E. Jalilzadeh and A. Asadi Abkenar analyzed data. Elham Jalilzadeh and Asad Asadi Abkenar wrote the first manuscript. Parisa Jonoubi and Reza Fifaei contributed to the interpretation of the results. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis and manuscript.

Data Availability Statement
Data available on request from the authors.

Acknowledgements
The authors would like to thank the members of postharvest laboratory of Citrus and Subropical Research Institute of Iran (Ramsar), especially K. Najafi Hir (Retiried) and E. Seyedghasemi.

Ethical considerations
The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest
The author declares no conflict of interest.

نشریه علوم باغبانی ایران، دوره ۵۶، شماره ۲

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۷۹۳۰

Homepage: http://ijhs.ut.ac.ir//

دورگ‌گیری بین والدین دیپلوئید و تتراپلوئید برای به‌نژادی مرکبات اسیدی (ترش)

الهام جلیل‌زاده[۱] | اسد اسدی آبکنار[۲] ✉ | پریسا جنوبی[۳] | سحر بهلولی زنجانی[۴] | رضا فیفائی[۵] | ابوذر هاشم‌پور[۶]

۱. گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. elham.jalilzadeh@gmail.com

۲. نوسینده مسئول، گروه بیولوژی مولکولی، پژوهشکده تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، رشت، ایران. **نویسنده مسئول.** asadiabkenarasad@gmail.com

۳. گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. jonoubi@khu.ac.ir

۴. گروه بیولوژی مولکولی، پژوهشکده تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، رشت، ایران. bohlouli.sz@gmail.com

۵. گروه ژنتیک و بهنژادی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران. رایانامه: rezafifaei@gmail.com

۶. گروه فیزیولوژی و فن‌آوری پس از برداشت، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران. رایانامه: a.hashempour@areeo.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۵

تاریخ انتشار: تابستان ۱۴۰۴

کلیدواژه‌ها:

به‌نژادی، بی‌بذری، تریپلوئید، لایم، لمون.

چکیده

هدف پژوهش دست‌یابی به ژنوتیپ‌های مرکبات اسیدی تریپلوئید بود. ثبات پلی‌پلوئیدی در نهال‌های لیموترش شیرازی، درخت A و درخت B، و لیموشیرین (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. لیموشیرین‌های C و D تتراپلوئید و لیمو شیرین E دیپلوئید تعیین شد. تلاقی‌ها بین نارنگی کِلمانتین (مادر) و لیموترش B (پدر) و بین لمون‌های «اورِکا»، «کوک‌اورِکا» و «لیسبون» (مادر) با لیموشیرین‌های تتراپلوئید C و D (پدر) انجام پذیرفت. در تلاقی بین نارنگی کلمانتین با لیمو ترش (درخت B) همه میوه‌ها ریزش نموده و هیچ بذری به‌دست نیامد؛ اما در تلاقی‌های بین لمون‌های «اورِکا»، «کوک‌اورکا» و «لیسبون» با لیموشیرین‌های تتراپلوئید میوه‌ها به‌مرحله برداشت رسیدند و بذرهای آنها مورداستفاده قرار گرفتند. بذرهای خیلی‌ریز که از تک‌جنینی بیشتری برخوردار بودند در محیط B_5 کشت شدند. از بین پانزده اصله نهال دورگ که با فلوسیتومتری موردسنجش سطح پلوئیدی قرار گرفتند، ده اصله نهال دیپلوئید و پنج اصله تریپلوئید به‌دست آمد. از این پنج اصله، چهار عدد به‌تلاقی اورکا و یک عدد به‌تلاقی کوک‌اورکا با لیموشیرین تعلق داشتند. انتظار می‌رود ژنوتیپ‌های تریپلوئید که برای اولین‌بار در این پژوهش به‌دست آمدند، صفت بی‌بذری میوه را از خود نشان دهند. بنابراین ویژگی‌های فنوتیپی این ژنوتیپ‌های تریپلوئید باید موردبررسی دقیق‌تر قرار گیرند.

استناد: *جلیل زاده، الهام؛ اسدی آبکنار، اسد؛ جنوبی، پریسا؛ بهلولی زنجانی، سحر؛ فیفائی، رضا و هاشم پور، ابوذر* (۱۴۰۴). دورگ‌گیری بین والدین دیپلوئید و تتراپلوئید برای به‌نژادی مرکبات اسیدی (ترش). *نشریه علوم باغبانی ایران*، ۵۶ (۲)، ۳۲۲-۳۰۳. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2025.382082.2210

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2025.382082.2210

مقدمه

مرکبات از مهم‌ترین میوه‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا محسوب می‌شوند که اهمیت اقتصادی قابل‌توجهی در بازار مصرف تازه‌خوری و صنایع غذایی–تبدیلی دارند. جنس *سیتروس*[1] 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 لیموترش در دو گروه عمده لایم‌ها و لمون‌ها[2]را شناسایی شده‌اند. به‌استثنای «تاهیتی» (پرشین) لایم[3]که میوه‌های متوسط تا کمی درشت دارد، سایر لایم‌ها دارای میوه‌های کوچک تا متوسط با پوست نازک و بیشتر سبزرنگ (در زمان برداشت تجاری) می‌باشند. لمون‌ها که به‌گونه *C. limon* [L.] Burm. f تعلق دارند دارای میوه‌های درشت‌تر، با پوست کلفت‌تر و زردرنگ می‌باشند. از مهم‌ترین ارقام لمون می‌توان به «اورِکا»[4]، «لیسبون»[5]، «وِرنا»[6]، «مِسینا»[7] و «فینو»[8] اشاره نمود. هر دو گروه به‌دلیل داشتن میوه‌های پرآب، عمدتاً اسیدی (ترش) و با ویتامین ث بالا، اهمیت قابل‌توجهی در بازار مصرف تازه‌خوری و صنایع غذایی–تبدیلی ازجمله تولید آبلیمو، انواع سس‌ها و چاشنی‌ها دارند. طبق آمار سازمان غذا و خواروبار جهانی[9]میزان تولید لایم و لمون 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 لیموترش به زبان انگلیسی با عنوان‌های مکزیکن‌لایم یا کی‌لایم[10]معروف است. لیموشیرین[11] گونه دیگری از لیموها با نام علمی *C. limettioides* Tan. می‌باشد که میوه‌های درشت و شیرین تولید می‌کند و در ایران به‌خصوص در استان‌های فارس (جهرم، قیر و کارزین) و کرمانشاه (قصرشیرین) به‌مقدار زیاد تولید شده و از اهمیت اقتصادی قابل‌توجهی برخوردار است. وجود تنوع بیشتر در ارقام تجاری لیموترش، تولید و سرانه مصرف میوه تازه و فرآورده‌های طبیعی آن را بالا خواهد برد و چرخه‌های اقتصادی بیشتری را به گردش در خواهد آورد. در این راستا، میوه‌های بی‌بذر یا کم‌بذر مرکبات به‌خصوص در لایم‌ها و لمون‌ها، خواه در بازار تازه‌خوری خواه در صنایع غذایی–تبدیلی از بازارپسندی و قیمت بیشتری برخوردارند. به‌همین‌خاطر در به‌نژادی انواع مرکبات ازجمله لیموها، دست‌یابی به ارقامی که میوه‌های بی‌بذر تولید می‌کنند و ازنظر سطح پلوئیدی بیشتر تریپلوئید (3X) می‌باشند، موردتوجه ویژه قرار گرفته است (Narukulla *et al.*, 2024; Roverssi *et al.*, 2022; Aleza *et al.*, 2012). برای دست‌یابی به ارقام تریپلوئید مرکبات ابتدا باید ارقام تتراپلوئید (4X) تولید نمود و سپس آنها را در تلاقی‌ها با ارقام دیپلوئید (2X) مورداستفاده قرار داد. به‌نژادی مرکبات تا امروز در ایران از تلاقی‌های بین دو والد با سطح کروموزومی متفاوت (تلاقی‌های اینترپلوئید)[12]استفاده نشده است. هدف از این پژوهش، انجام تلاقی بین ژنوتیپ‌های دیپلوئید و تتراپلوئید در تعدادی از لیموهای ترش و شیرین برای دست‌یابی به شبه‌لیموهای تریپلوئید می‌باشد.

پیشینه پژوهش

در مرکبات، عقیمی ژنتیکی، دوره نونهالی طولانی، ناسازگاری بین گونه‌ها و درصد بالای چندجنینی ازجمله موانع بیولوژیک به‌نژادی این گیاهان شناخته شده‌اند (Caruso *et al.*, 2020; Perez-Tornero & Porras, 2008). دورگ‌گیری که تلاقی

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

کنترل‌شده بین دو والد متفاوت ازنظر 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 درنهایت، انتخاب (گزینش) فنوتیپ[1]مطلوب را به‌دنبال دارند. در دورگ‌گیری مرکبات، والدینی که توانایی ترکیب‌پذیری و توارث‌پذیری بالایی برای صفات مطلوب دارند، انتخاب شده و والدی که به‌میزان زیاد بذرهای تک‌جنین و جنسی تولید می‌کند، به‌عنوان والد مادر به‌کار می‌رود (Ray, 2002; Gmitter *et al.*, 2007). از ارقام تجاری مرکبات که به‌روش دورگ‌گیری و گزینش به‌دست آمده‌اند می‌توان به نارنگی «آنکور»[2] حاصل از تلاقی بین دو رقم نارنگی «کینگ»[3] و «ویلولیف»[4] در کالیفرنیا، رقمی از شادوک به‌نام «هایاساکی»[5] از تلاقی «ماتوبانتن»[6] و «هیرادوبانتن»[7]، رقمی از تانگور به‌نام «آریاکه»[8] از تلاقی پرتقال «سِیک‌ناوِل»[9] و نارنگی «کلمانتین»[10] و دورگی به‌نام «تسوناکائوری»[11] از تلاقی «کی‌ومی»[12] (نوعی دورگ) و «آکیتسو»[13] (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 مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور آغاز شد و ترکیب‌های مختلفی از تلاقی‌ها به‌منظور دست‌یابی به رقم و مطلوب برای شمال ایران انجام پذیرفت. از ارقام مرکبات به‌دست آمده داخل کشور می‌توان به نارنگی‌های «یاشار»، «نوشین»، «شاهین»، «پرنا»، «ورا»، «خرم» و «جهانگیر» اشاره کرد (گلعین، ۱۳۹۴الف؛ گلعین، ۱۳۹۴ب). در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور (رشت) نیز رقمی از لیموترش از تلاقی «ناگامی» کامکوآت (مادر) و لیموترش «مکزیکن» (پدر) به‌دست آمده که میوه‌های آن پرآب، اسیدی، گرد و زردرنگ بوده و ماندگاری زیادی روی درخت دارند. این رقم مقاومت بالایی به بیماری جاروک لیموترش نشان داده است.

پلی‌پلوئیدی[14]عبارت است از وجود سه سری (3X) یا بیشتر از کروموزوم‌ها در هسته سلول‌های رویشی[15](غیرجنسی). آن دسته از گیاهان پلی‌پلوئید که سری‌های کروموزومی یکسان دارند، اتوپلی‌پلوئید[16]و پلی‌پلوئیدهایی که از راه دورگ‌گیری بین گونه‌ای به‌دست آمده‌اند، آللوپلی‌پلوئید[17] نامیده می‌شوند. اغلب گونه‌های جنس *سیتروس* دیپلوئید (2n=2X=18) با تعداد نُه عدد کروموزوم پایه (X=9) می‌باشند. در حالت طبیعی مرکبات، پلی‌پلوئیدهای با منشاء جنسی از تلاقی یک گامت کاهش‌نیافته با یک گامت نرمال‌هاپلوئید، یا تلاقی دو گامت کاهش‌نیافته با هم و پلی‌پلوئیدهای با منشاء غیرجنسی؛ یا به‌اصطلاح پلی‌پلوئیدهای خودبه‌خودی، از فرآیندهای جهش طبیعی و به‌دنبال‌آن، دوبرابر شدن کروموزوم‌ها در سلول‌های نوسلار[18] (خورشی) و عدم‌کاهش طی میتوز به‌وجود می‌آیند (Guerra *et al.*, 2016). در مرکبات، ژنوتیپ‌های دیپلوئید[19]و تتراپلوئید[20]

1. Phenotype
2. Encore
3. King
4. Willow Leaf
5. Hayasaki
6. Matou Buntan
7. Hirado Buntan
8. Ariake
9. Seike Navel
1 . Clémentine 0
1 . Tsunokaori 1
1 . Kiyomi 2
1 . Okitsu 3
1 . Polyploidy 4
1 . Somatic 5
1 . Autopolyploid 6
1 . Allopolyploid 7
1 . Nucellar 8
1 . 2X 9
2 . 4X 0

دارای بذر بوده درحالی‌که ژنوتیپ‌های تریپلوئید بی‌بذر هستند. میوه‌های ارقام تریپلوئید[1]ویژگی‌های قابل‌توجه دیگری نیز دارند ازجمله اندازه بزرگ و دامنه وسیع‌تر زمان رسیدن و در بعضی موارد، رنگ‌دانه‌های قرمز بیشتر (Reforgiato *et al.*, 2005). در دست‌یابی به ارقام تریپلوئید مرکبات، ارقام تتراپلوئید در تلاقی‌های دوجانبه با ارقام دیپلوئید مورداستفاده بوده‌اند. بااستفاده‌از این تلاقی‌ها، ارقام بی‌بذر و تجاری متعددی حاصل شده که «تاکله»[2]، «کلارا»[3]، «ماندارد»[4]، «رئاله»[5]، «آلکانتارا»[6]، «سوئیت‌سیسیلی»[7] و «اِرلی‌سیسیلی»[8] ازجمله آنهاست (Reforgiato *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2015).

در به‌نژادی مرکبات، ارقام تتراپلوئید برای دست‌یابی به پایه‌های جدید نیز بسیار حائزاهمیتند زیرا می‌توانند مستقیماً به‌عنوان پایه‌های پاکوتاه‌کننده مورداستفاده قرار گیرند و نسبت به پایه‌های دیپلوئید، به شرایط محدودکننده محیطی مقاومت بیشتری نشان دهند (Ruiz *et al.*, 2015; Grosser *et al.*, 2015). این گونه‌ها همچنین به‌طورمصنوعی بااستفاده‌از تیمارهای کلشیسین توسط پژوهشگران مختلف تولید شده و موردبررسی قرار گرفته‌اند (Aleza *et al.*, 2009). در پژوهشی با به‌کارگیری تیمارهای مختلف کلشیسین، فرم‌های تتراپلوئید در ارقام اسیدی (ترش) مرکبات تولید شد که درمقایسه‌با ارقام دیپلوئید اصلی، دارای میوه‌های با پوست ضخیم‌تر و گره‌های روغنی بزرگ‌تر و گل‌ها و بذرهای بزرگ‌تر بودند (Wakana *et al.*, 2005). در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور (رشت)، پژوهش‌هایی در تیمارهای کلشیسین روی مریستم انتهایی نهال‌های بذری انجام شد باهدف تولید ژنوتیپ‌های تتراپلوئید در لیموترش و لیموشیرین که نهال‌های پلی‌پلوئید به‌دست آمد که حفظ و نگهداری شده‌اند (Afshar Mohammadian *et al.*, 2012; Afshar Mohammadian *et al.*, 2013). 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 که پیش‌ازاستفاده از گیاهان تتراپلوئید در تلاقی‌ها، ثبات سطح پلوئیدی و قابلیت آنها به‌عنوان والدین مناسب موردبررسی قرار گیرد (Aleza *et al.*, 2009).

روش‌شناسی پژوهش

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

ثبات پلی‌پلوئیدی در دو اصله از نهال‌های لیموترش شیرازی، درخت‌های A و B، و سه اصله از نهال‌های لیموشیرین (درخت‌های C، D و 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 و E انتخاب و از پائین به بالا درجهت حرکت عقربه‌های ساعت کدگذاری شدند و از آنها نمونه‌های برگ بالغ (نه خیلی‌جوان و نه خیلی‌مسن) به‌تعداد چهار تا پنج عدد جمع‌آوری و برچسب‌گذاری به‌عمل 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 (کد اختصاصی شاخه مربوطه) قرار گرفتند. این نمونه‌ها درون ظرف درب‌بسته 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

1. 3X
2. Tacle
3. Clara
4. Mandared
5. Reale
6. Alkantara
7. Sweet Sicily
8. Early Sicily

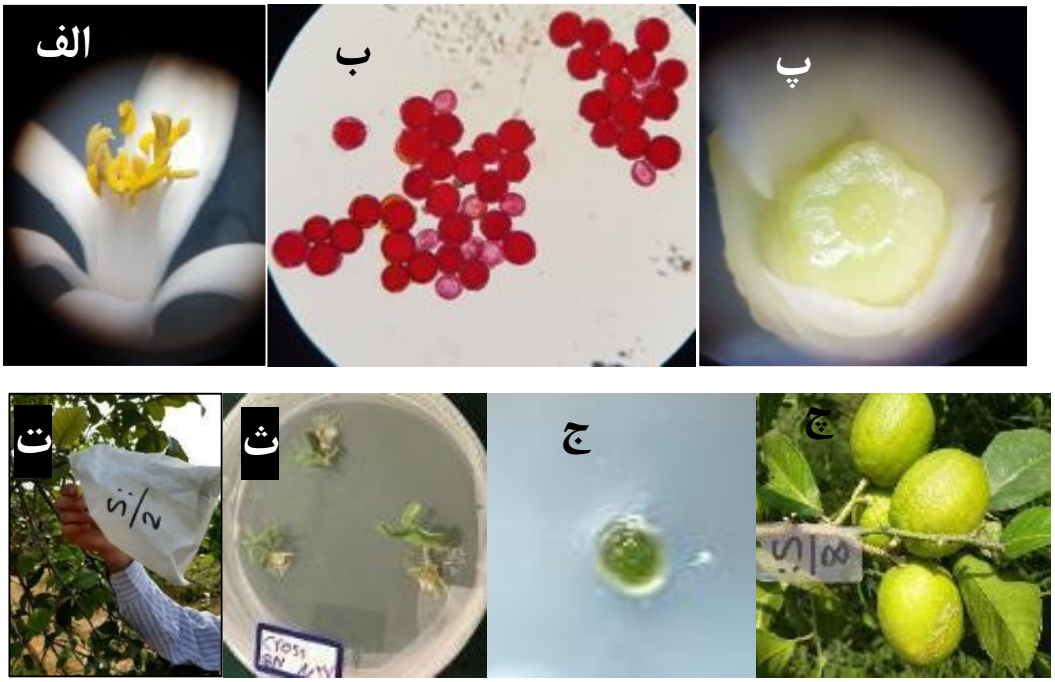
در ظرف پتری کوچک محتوی ۴۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج بااستفاده‌از یک نصفه تیغ با تقه‌تقه زدن ممتد به خرده‌های بسیارریز تبدیل شد. ۱۶۰۰ میکرولیتر از بافر رنگ‌آمیزی PI و ۱۲ میکرولیتر از محلول آنزیم RNAse به این مخلوط اضافه شد. مخلوط فوق پس از یک تا دو دقیقه قرارگیری روی سکوی آزمایشگاه، باعبوراز صافی‌های بسیارریز 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 ده‌هزار سلول (بین ده‌هزار تا سی‌هزار) به‌دست آمد. این مرحله از کار با دستگاه فلوسیتومتر به مرحله گین[1]معروف است. برای هر پیک اصلی (پیک مربوط به هر نمونه) مقدار قابل‌قبول CV یعنی کمتر از ده به‌دست آمد و در شرایط بالا بودن مقدار CV، آزمایش تکرار شد. نمونه‌های شاهد دیپلوئید و تریپلوئید به‌ترتیب از «مکزیکن‌لایم» و «پرشین‌لایم»[2] نیز مورد تعیین‌سطح پلوئیدی قرار گرفتند. اندازه‌گیری‌های مورفولوژیک مربوط به برگ (طول، عرض، ضخامت پهنک و طول دم‌برگ) بااستفاده‌از دستگاه کولیس دیجیتال Mitotoyu, Japan با دقت یک‌صدم میلی‌متر انجام شد. برای بررسی تراکم روزنه‌ها از روش قالب‌گیری، تبیین‌شده توسط Mathur & Koncz (۱۹۹۷) با کمی تغییرات مبنی‌بر جایگزینی چسب سلوفان به‌جای قالب پارافین استفاده شد. صفات کمی و کیفی میوه‌ها در آزمایشگاه بخش فیزیولوژی پس‌ازبرداشت در پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری در شهر رامسر اندازه‌گیری شدند. اندازه میوه شامل طول استوایی و قطبی میوه (با کولیس دیجیتال)، اسیدیته 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[3] عصاره (با دستگاه رفرکتومتر[4])، ضخامت پوست میوه (با کولیس دیجیتال) و درصد آب میوه پس از آب‌گیری از کسر نمودن وزن کل میوه از وزن تفاله و وزن بذرها به‌دست آمد (Asadi Abkenar, 2014). تجزیه داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها بااستفاده‌از آزمون t و توسط نرم‌افزار SPSS16 انجام پذیرفت.

تلاقی بین ژنوتیپ‌های با سطوح کروموزومی متفاوت و تعیین‌سطح پلوئیدی نهال‌های دورگ

از لیموهای ترش و شیرین که در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور (رشت) با اعمال تیمارهای کلشیسین به‌دست آمده و حفظ و نگهداری شده بودند، به‌عنوان والد نر استفاده شد. دانه گرده ژنوتیپ‌های نر موردنظر با جداسازی بساک‌ها از گل‌هایی که درمرحله نزدیک به باز شدن بودند (شکل ۱–الف)، یعنی یک روز قبل از باز شدن کامل، 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 داوزده درصد ساکارز، ۰/۷ درصد آگار و املاح بور، منیزیم، پتاسیم و کلسیم موردبررسی قرار گرفت (Brewbaker & Kwack, 1963). گل‌های گونه‌های دیپلوئید مرکبات شامل نارنگی «کلمانتین» در ایستگاه رامسر، لمون‌های «اورِکا»، «کوک‌اورِکا» و «لیسبون» در ایستگاه کترا 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 از ظهور شیره سفیدرنگ و چسبنده روی سطح کلاله، پاکت‌ها برداشته شدند و دانه‌های گرده جمع‌آوری‌شده بااستفاده‌از قلم‌موهای ظریف و بسیارنرم روی کلاله گل‌های اخته‌شده، مالیده شدند. گل‌های گرده‌افشانی‌شده دوباره با گذاشتن پاکت روی آنها از بازدید حشرات محافظت شدند (شکل ۱–ت). روی برچسب مربوط به هر شاخه، تاریخ و تعداد گل‌های گرده‌افشانی‌شده یادداشت شد. میوه‌های حاصل از گرده‌افشانی‌های کنترل‌شده 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 توسط نوک قاشق استخراج و پس از شستشو و کمی خشک شدن، وزن شدند. جنین بذرهایی که کمتر

1. Gain
2. Persian lime (*Citrus latifolia* Tan.)
3. Total Soluble Solid (TSS)
4. Refrectometer

از ۰/۰۹ گرم وزن داشتند، در شرایط ضدعفونی‌شده در محیط B_5 به‌همراه سه درصد ساکارز، ۰/۷ درصد آگار و یک میلی‌گرم‌درلیتر GA_3 کشت شدند (شکل ۱–ج). گیاه‌چه‌هایی که با این روش به‌دست آمدند (شکل ۱–چ)، به گلدان‌های کوچک حاوی پیت و پرلایت اتوکلاوشده برای سازگاری منتقل شدند. پس از گذشت یک ماه، گیاهان سازگارشده به گلدان‌های بزرگتر منتقل و در گل‌خانه مرکز رشت حفظ و نگهداری شدند. سطح پلوئیدی گیاهان به‌دست آمده از تلاقی‌ها نیز طبق شرح فوق تعیین شد؛ با این تفاوت که هر نمونه همراه با یک نمونه شاهد، یعنی «پرشین‌لایم» که تریپلوئید طبیعی است، هم‌زمان موردسنجش قرار گرفت. دورگ‌های تریپلوئید جداسازی، حفظ و نگهداری شدند.



شکل ۱. الف) وضعیت بساک‌ها در اولین روز پس از باز شدن گل‌ها در لیموشیرین تتراپلوئید، ب) رنگ‌آمیزی دانه‌های گرده با محلول آستوکارمین یک درصد، پ) نمونه‌ای از گل فاقدمادگی در لیموشیرین تتراپلوئید (پرچم‌ها جدا شده‌اند)، ت) پاکت‌گذاری گل‌ها در ارقام لمون (مادر) پس از گرده‌افشانی، ث) میوه‌های رشدیافته در لمون «اورِکا»، ج) کشت بذرهای بسیارریز در محیط B_5، چ) گیاه‌چه‌های به‌دست 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 به‌عنوان شاهد دیپلوئید جداگانه از دو اصله نهال لیموترش شیرازی برداشت شدند، سطح کروموزومی موردانتظار دیپلوئید و نمونه شاهد شماره ۳ از «پرشین‌لایم»، سطح کروموزومی تریپلوئید را نشان دادند (شکل ۲–پ). از پنج شاخه درخت A، چهار شاخه یعنی شاخه‌های A1 ، A2 ، A3 و A4 با نشان دادن یک پیک اصلی (پیک شماره ۲) سطح دیپلوئیدی را نشان دادند (شکل ۳–الف). تنها، شاخه A5، در هیستوگرام مربوطه دو پیک اصلی یعنی پیک‌های ۲ و ۳ را نشان داد که به‌ترتیب مربوط به سطح پلوئیدی دیپلوئید و تتراپلوئید بود (شکل ۳–ب). بنابراین، شاخه شماره ۵ در درخت A به‌عنوان شاخه میکس‌پلوئید یا پلوئیدی کایمرا[1] 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 به‌احتمال‌زیاد مربوط به مرحله‌ی سلولی G_1 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 (لیموترش دیپلوئید) و پیک شماره ۳ مربوط به نمونه شاخه اصلی درخت

1. Mixploid or ploidy chimera

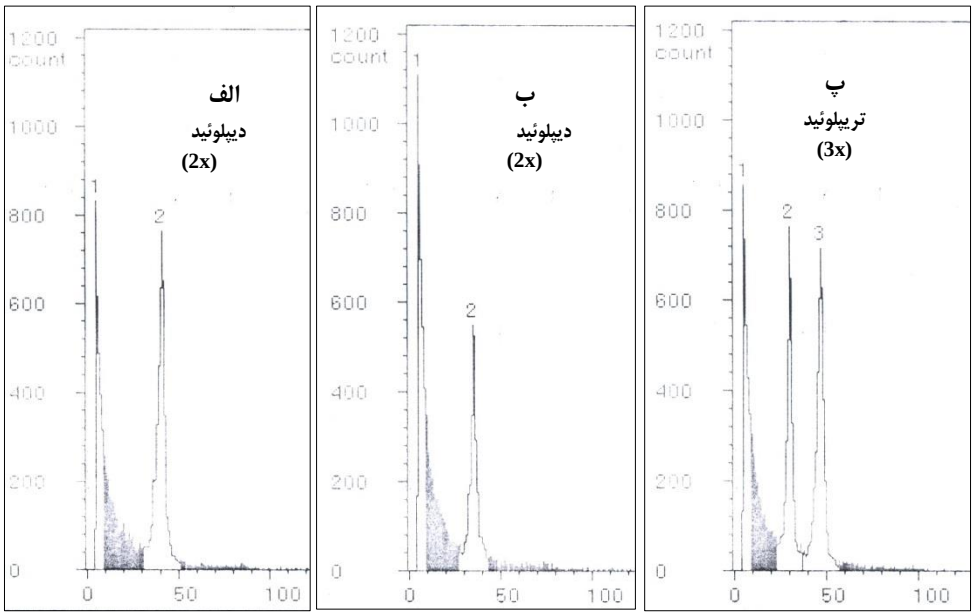
B می‌باشد. در درخت B، هر هفت شاخه اصلی سطح پلوئیدی یکسان و تریپلوئید را نشان دادند (شکل ۳-پ). طبق جدول ۱، سطح پلوئیدی شاخه‌های درخت‌های لیموشیرین C و D تتراپلوئید و شاخه‌های درخت E دیپلوئید تعیین شد.

جدول ۱. سطح پلوئیدی در شاخه‌های درخت‌های شاهد، درخت‌های لیموترش A و B و لیموشیرین‌های C، D و E

نوع درخت	کد شاخه	عدد مد مربوط به پیک ۲	عدد مد مربوط به پیک ۳	سطح پلوئیدی
لیموترش مکزیکن شماره ۱	شاهد۱	۴۱	--	۲X
لیموترش مکزیکن شماره ۲	شاهد۲	۳۵	--	۲X
پرشین‌لایم + شاهد۱	شاهد۳	۳۰	۴۷	۳X = پرشین‌لایم، ۲X = شاهد۱
درخت A	شاخه۱ (A۱)	۳۲	--	۲X
	شاخه۲ (A۲)	۴۲	--	۲X
	شاخه۳ (A۳)	۴۰	--	۲X
	شاخه۴ (A۴)	۴۰	--	۲X
	شاخه۵ (A۵)	۳۷	۷۷	۲X +۴X
درخت B	شاهد۲+(B۱) شاخه۱	۳۷	۵۶	۲X = شاهد۲, B۱ = ۳X
	شاهد۲+(B۲) شاخه۲	۳۹	۵۹	۲X = شاهد۲, B۲ = ۳X
	شاهد۲+(B۳) شاخه۳	۳۹	۵۹	۲X = شاهد۲, B۳ = ۳X
	شاهد۲+(B۴) شاخه۴	۳۶	۵۴	۲X = شاهد۲, B۴ = ۳X
	شاهد۲+(B۵) شاخه۵	۳۷	۵۶	۲X = شاهد۲, B۵ = ۳X
	شاهد۲+(B۶) شاخه۶	۳۵	۵۳	۲X = شاهد۲, B۶ = ۳X
	شاهد۲+(B۷) شاخه۷	۳۷	۵۶	۲X = شاهد۲, B۷ = ۳X
جعفری+درخت C	--	۴۲	۱۰۱	۴X
جعفری+درخت D	--	۴۱	۹۹	۴X
جعفری+درخت E	--	۲۱	۱۰۲	۲X

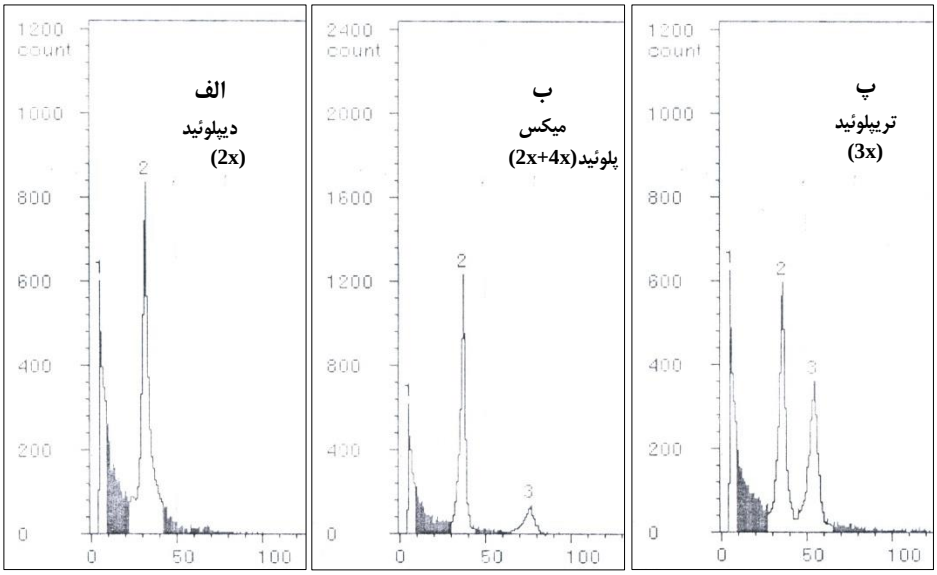
(منبع: یافته‌های پژوهش)

(منبع: یافته‌های پژوهش)



شکل ۲. هیستوگرام سلول‌های رنگ‌آمیزی‌شده برگ برای اندازه‌گیری میزان DNA (هیستوگرام فلوسیتومتری)، الف) شاهد ۱ (لیموترش مکزیکن، دیپلوئید، درخت شماره ۱)، ب) شاهد ۲ (لیموترش مکزیکن، دیپلوئید، درخت شماره ۲) و پ) شاهد ۳ (شاهد۱ دیپلوئید دارای پیک ۲ + پرشین‌لایم تریپلوئید دارای

پیک ۳). در همه هیستوگرام‌ها پیک شماره ۱ ثابت بوده و به‌احتمال‌زیاد 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 رنگ‌آمیزی‌شده برگ برای اندازه‌گیری میزان DNA (هیستوگرام فلوسیتومتری)، الف) شاخه A1، ب) شاخه A5 و پ) شاهد ۲ (پیک ۲) + نمونه شاخه B4 (پیک ۳) (منبع: یافته‌های پژوهش)

مقایسه صفات برگ در درخت‌های A و B

در جدول ۲، صفات اصلی برگ در دو درخت A و B مقایسه شده‌اند: بین برگ‌های درخت‌های A و B از نظر طول، عرض، ضخامت پهنک و طول دم‌برگ، اختلاف معنی‌دار وجود دارد. درخت B در مقایسه با درخت A (به‌جز شاخه میکس‌پلوئید 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 ترشحی بیشتری نشان داد.

جدول ۲. مقایسه میانگین صفات برگ در دو درخت لیموترش مکزیکن A و B بااستفاده‌از آزمون *t*

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

*Mean±Standard deviation, **P<۰/۰۵

***شمارش تعداد روزنه‌ها و کیسه‌های ترشحی 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. باتوجه‌به این‌که این شاخه از درخت A در سال ۱۳۹۷ به میوه‌دهی رسید و پس از برداشت میوه‌ها به‌دلیل

خشک‌شدن، از ته بریده شد، سطح پلوئیدی آن تعیین نگشت؛ درحالی‌که، آنالیزهای فلوسیتومتری شاخه‌های اصلی این درخت در سال ۱۴۰۱ انجام پذیرفت. همان‌طور که داده‌های صفات میوه مربوط به این شاخه نشان می‌دهد، سطح پلوئیدی آن نمی‌تواند دیپلوئید باشد. در لیموترش‌های دیپلوئید، میوه‌ها کوچک‌تر و پرآب‌تر با پوست نازک‌تر هستند؛ درصورتی‌که میوه‌های این شاخه درشت‌تر و کم‌اب‌تر با پوست کلفت‌ترند. این موارد از ویژگی‌های بارز تتراپلوئیدها در مرکبات می‌باشد (Nukaya *et al.*, 2019). بنابراین، احتمال آن‌که شاخه موردبحث، تتراپلوئید و یا حتی میکس‌پلوئید بوده باشد، 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 /نمونه (میوه)	وزن (g)	طول (mm)	عرض (mm)	عرض/طول	ضخامت پوست (mm)	تعداد پره	تعداد بذر	درصد چندجنینی*	درصد آب میوه	TSS (°Brix)	TA (%)	TSS/TA	ویتامین ث (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	±/۰۷	±۰/۲۸	±۱/۷۳	±۱/۰	±۰/۰۰	±۴/۸۲	±۰/۱۱	±۰/۰۰	±۰/۰۱	±۰/۰۰

*در محاسبه درصد چندجنینی بذر، همه بذرهای مربوط به ۶ عدد میوه (۴۶ عدد) پوست‌کنده‌شده و جنین‌های هر بذر شمارش و سپس درصد گرفته شد. SD: Standard deviation

**برای اندازه‌گیری درصد آب میوه، TSS، TA و ویتامین ث از سه نمونه حاصل از مخلوط عصاره میوه‌های ۱ با ۲، ۳ با 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 (شکل۳-پ). همان‌طور که داده‌های این جدول نشان می‌دهد، میوه‌های این شاخه از اندازه متوسط و پوست نازک برخوردارند. علی‌رغم آن‌که از ویژگی‌های بارز مرکبات تریپلوئید بی‌بذری میوه است، داده‌های جدول ۳ نشان می‌دهد که هر سه میوه این شاخه به‌طورمتوسط دارای دو بذر هستند. از سه میوه شاخه B4، هشت عدد بذر استخراج شد که دو عدد از آن‌ها فاقدجنین رشدیافته بودند و شش بذر باقی‌مانده، تک‌جنینی بوده و جوانه‌زنی خوبی داشتند. این یافته حاکی از آن است که درخت B بذرهای کم‌تعداد اما به‌شدت تک‌جنین تولید می‌کند. تولید بذر تک‌جنین در به‌نژادی مرکبات بسیار حائزاهمیت بوده و در دورگ‌گیری‌ها و تولید هیبریدها ویژگی مثبتی به‌شمار می‌رود.

دورگ‌های به‌دست‌آمده از تلاقی‌ها و سطح پلوئیدی آنها

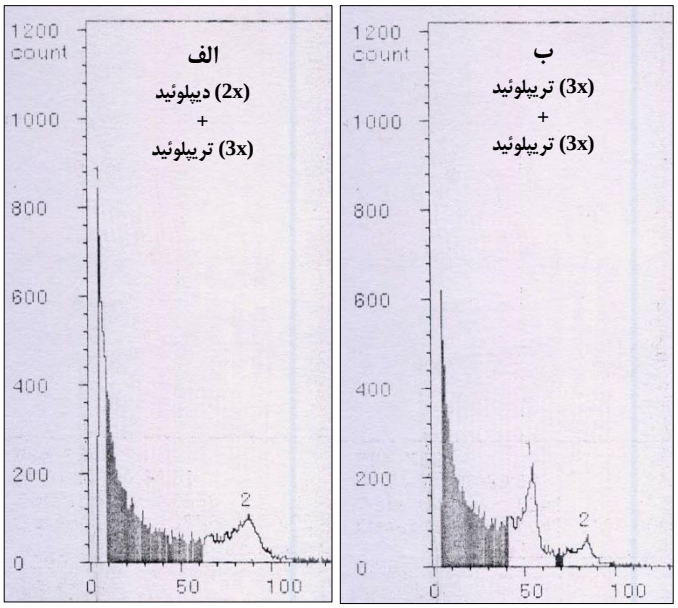
طبق جدول ۴، میزان دانه‌های گرده زنده و جوانه‌زنی آنها در لیموترش مکزیکن (کی‌لایم) درخت B که به‌عنوان والد پدر به‌کار رفت، صفر بود. بنابراین، از تلاقی نارنگی کلمانتین به‌عنوان مادر و لیموترش مکزیکن به‌عنوان پدر، هیچ میوه و بذری حاصل نشد. در لیموشیرین‌های به‌کاررفته به‌عنوان والد پدر، تقریباً همه گل‌ها ناقص و فاقدمادگی بودند (شکل۱-پ). دانه‌های گرده جمع‌آوری‌شده از این گل‌ها با رنگ‌آمیزی توسط محلول آستوکارمین یک درصد از رنگ‌گیری بسیار خوبی برخوردار بوده (بین هفتاد تا هشتاد درصد) و بیش از ده درصد (دقیقاً دوازده درصد) جوانه‌زنی نشان دادند (جدول ۴). بااستفاده‌از این دانه‌های گرده، همه تلاقی‌های انجام‌شده روی درختان مادری سه رقم لمون، در ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا تشکیل میوه و بذر دادند

(جدول ۴). بررسی سطح پلوئیدی نهال‌های دورگ حاصل از تلاقی‌ها نشان داد که طبق جدول‌های ۵ و ۶، از پانزده اصله نهال ارزیابی‌شده، پنج اصله (کدهای ۲، ۴، ۵، ۸ و ۱۲ معادل ۳۳ درصد از نهال‌ها) سطح پلوئیدی تریپلوئید نشان دادند (شکل ۴). ارتفاع این پنج اصله نهال تریپلوئید (با میانگین ۲۷/۶ سانتی‌متر در سن یک‌سالگی) درمقایسه‌با ده اصله نهال هم‌سن دیگر که دیپلوئید بودند (با میانگین ارتفاع ۵۷/۲ سانتی‌متر) بسیار کوتاه‌تر بود (جدول ۶).

جدول ٤. درصد دانه‌های گرده زنده و جوانه‌زده در لیموترش و لیموشیرین به‌کاررفته به‌عنوان والد پدر، تعداد گل گرده‌افشانی‌شده، تعداد میوه و تعداد بذر حاصل از تلاقی‌های انجام‌شده در ایستگاه کترا

تعداد بذر فاقدجنین	*تعداد بذر دارای‌جنین	تعداد بذر ریز	تعداد بذر	تعداد میوه	تعداد گل تلاقی‌یافته	تلاقی	درصد جوانه‌زنی دانه گرده	درصد دانه‌های گرده زنده	والد پدر
۴۸	۳۹	۸۷	۳۵۶	۱۲	۲۰	“Eureka” × Sweet lime 4X	۱۲	۷۰ تا ۸۰	Sweet lime 4X
۲۸	۱۸	۴۶	۲۳۸	۱۰	۱۱	“Cook Eureka” × Sweet lime 4X	۰/۰	۰/۰	Mexican lime (B)
۶	۴	۱۰	۶۲	۲	۳	“Lisbon” × Sweet lime 4X	--	--	--
۸۲	۶۱	۱۴۳	۶۵۶	۲۴	۳۴	--	--	--	مجموع

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



شکل ٤. هیستوگرام‌های فلوسیتومتری: الف) پیک ۱ مربوط به هیبرید شماره ۱ (دیپلوئید) و پیک ۲ مربوط به «پرشین‌لایم» (تریپلوئید) به‌عنوان شاهد می‌باشد.

ب) پیک ۲ شامل دو پیک روی‌هم مربوط به هیبرید شماره ۲ (تریپلوئید) و «پرشین‌لایم» (تریپلوئید و شاهد) می‌باشد. (منبع: یافته‌های پژوهش)

جدول ۵. سطح پلوئیدی نهال‌های حاصل از تلاقی‌های بین والدین دارای سطوح کروموزمی متفاوت (2X×4X)

شماره هیبرید	نوع تلاقی	تعداد پیک در هیستوگرام [نمونه + شاهد (تریپلوئید)]	عدد مد مربوط به پیک ۲	عدد مد مربوط به پیک۳	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 ٦. تعداد نهال حاصل از تلاقی‌ها و مقایسه میانگین ارتفاع در دو گروه از نهال‌های یک‌ساله دیپلوئید و تریپلوئید به‌دست 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	۱، ۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱	۲، ۴، ۵، ۸
Cook Eureka × Sweet lime 4X	۴	۱	۱۳، ۱۴، ۱۵	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 لیموترش مکزیکن (درخت ۱ و درخت ۲) پیوندشده روی پایه نارنج برداشت شدند، سطح کروموزومی معمول و موردانتظار دیپلوئید در جنس *سیتروس* را نشان دادند. پرشین‌لایم که به‌طورطبیعی گیاهی تریپلوئید است (Bacchi, 1940; Moore, 2001) به‌عنوان شاهد ۳ آن‌طورکه انتظار می‌رفت نیز سطح کروموزومی تریپلوئید را نشان داد. بنابراین، نتایجی که از آنالیز سطح پلوئیدی گیاهان شاهد حاصل گشت، مُصَدِقِ روش به‌کاررفته در پژوهش را برای تعیین‌سطح پلوئیدی شاخه‌های درخت‌های A، B، C، D و E به‌اثبات رساند. نهال‌های A، B، C، D و E با به‌کارگیری تیمارهای کلشیسین روی مریستم انتهایی نهال‌های بذری در مرحله دوبرگی به‌دست 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 موردبررسی قرار گرفتند، 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، اِپیدرم و بخش اصلی گوشت میوه (پالپ[1])، یعنی کیسه‌های محتوی عصاره را به‌وجود 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 به‌این‌که کلشیسین تا کدام لایه سلولی از سه لایه ذکرشده نفوذ کرده باشد و آن‌که در هر لایه چه موقعیت و چه تعداد از سلول‌ها را تحت‌تأثیر قرار داده باشد، اثرگذاری بر 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 شاخه‌ها در سطح دیپلوئیدی باقی ماندند؛ پدیده‌ای که ممکن است به‌علت تأثیر اندک کلشیسین یعنی تأثیر کلشیسین روی تعداد اندکی از سلول های مریستم انتهایی بروز کرده باشد (Aleza *et al.*, 209).

در درخت B، شاخه‌های بررسی‌شده سطح پلوئیدی یکسان و تریپلوئید را نشان دادند. انتظار نمی‌رود که این درخت حاصل از تأثیر کلشیسین باشد، چراکه در گیاهان دیپلوئید مثل مرکبات، با تیمار کلشیسین روی مریستم‌ها یا بذرها، بسته به غلظت و مدت‌زمان به‌کارگیری کلشیسین، یا سطح پلوئیدی اصلی دیپلوئیدی حفظ می‌شود یا ژنوتیپ‌های تتراپلوئید یا بیشتر یا میکس-پلوئید (2X+4X و 4X+8X) به‌وجود می‌آیند (Wakana *et al.*, 2005; Yasuda *et al.*, 2022) و تاکنون، گزارشی مبنی‌بر حصول گیاهان تریپلوئید پس از اعمال تیمار کلشیسین در دست نبوده است. لذا منشأ درخت B می‌تواند یکی از دو حالت نوسلار و یا جنسی باشد که در حالت اول، از جنین نوسلار یا جنین تولیدشده در بافت نوسلوس (خورش) در خارج از کیسه جنینی به‌وجود آمده و در حالت دوم، محصول لقاح سلول تخم داخل کیسه جنینی است. درصورتی‌که منشأ، جنسی باشد، دو احتمال دیگر نیز قابل‌ارزیابی است: تولید از ترکیب سلول تخم‌زای هاپلوئید (n) با دانه گرده دیپلوئید (2n) و یا تولید از سلول تخم‌زای دیپلوئید (2n) لقاح‌یافته با دانه گرده هاپلوئید (n). اثبات هر کدام از این سه احتمال نیازمند بررسی‌های دقیق‌تر به روش‌های مولکولی و پیش‌رفته ازجمله نشان‌گرهای مولکولی SNP و یا تعیین‌توالی DNA می‌باشد (Xia *et al.*, 2021)؛ هرچندکه مطالعات سیتولوژیک نشان داده‌اند که اغلب جنین‌های تریپلوئید در حالت طبیعی از تلاقی تخمک کاهش‌نیافته (2n) با دانه گرده هاپلوئید (n) به‌وجود می‌آیند. دراین‌حالت، به‌دلیل آن‌که آندوسپرم پنتاپلوئید (5n) خواهد شد، در مراحل اولیه رشد از بین می‌رود و به‌خاطر رشد زیاد جنین، قدرت آن در تولید نهال افزایش می‌یابد؛ پدیده‌ای که در بذرهای ریز اکثر مرکبات قابلپ مشاهده است (Esen *et al.*, 1979; Wakana, 1981).

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

وجود بذر در میوه‌های شاخه B4 حاکی از این است که گل‌های آن در شرایط گرده‌افشانی آزاد توسط دانه‌های گرده با قوه نامیه زیاد گرده‌افشانی شده‌اند چرا که دانه‌های گرده گل‌های این درخت قدرت جوانه‌زنی نداشتند. چنین پدیده‌ای حتی در پرشین‌لایم نیز که تریپلوئید بوده و بی‌بذر می‌باشد دیده می‌شود که گاهی میوه‌هایی تولید می‌کند که تعداد بسیار کمی بذر دارند و این بذرها به‌شدت منوامبریون[2](تک‌جنین) هستند (Santos *et al.*, 2013). وجود یک تا دو عدد بذر در میوه‌های دیگر ارقام

1. Pulp
2. Monoembryon

تریپلوئید مرکبات نیز گزارش شده است (Roverssi *et al.*, 2022) که البته میوه‌های مرکبات اگر به‌طورمتوسط دارای یک تا سه عدد بذر باشند، از نظر تجاری بی‌بذر محسوب می‌شوند.

در این پژوهش، در دسته‌ای از تلاقی‌ها از نارنگی کلمانتین به‌عنوان والد مادر استفاده شد زیرا این رقم خودناسازگار بوده، بذر زیاد و صددرصد تک‌جنین تولید می‌کند. لذا این رقم در تلاقی‌ها و برنامه‌های به‌نژادی مرکبات همیشه به‌عنوان والد مادر مورداستفاده قرار گرفته است (Starrantino & Recupero, 1981; Oiyama *et al.*, 1981). با انجام تلاقی‌ها روی نارنگی کلمانتین، همه میوه‌ها در تیرماه شروع به ریزش نموده و هیچ میوه‌ای برای برداشت به مرحله نهایی نرسید. اگر چه در تیرماه، اصلی‌ترین دوره ریزش میوه‌ها در اکثر درختان میوه ازجمله مرکبات اتفاق می‌افتد که به جون دراپ[1]یا «ریزش تیرماه» موسوم بوده و درصد زیادی از میوه‌چه‌ها در این دوره ریزش می‌نمایند (Iglesias *et al.*, 2006)؛ اما در این پژوهش عدم‌تشکیل میوه (به‌طورمطلق) در نارنگی کلمانتین به فقدان کامل قدرت جوانه‌زنی در دانه‌های گرده لیموترش (والد پدر) درخت B، به‌کاررفته مربوط می‌شود. دانه‌های گرده به‌کاررفته که قدرت جوانه‌زنی نداشتند از گیاه دیپلوئید و یا تتراپلوئید منشأ نیافته بودند و نتایج پژوهش نشان داد که این دانه‌ها، از درختی جمع‌آوری شده بود که اگرچه احتمال می‌رفت تتراپلوئید باشد اما آنالیز فلوسیتومتری شاخه‌های آن، ثابت کرد که تریپلوئید بوده است.

درصورتی‌که دسترسی به والد مادر در مرکبات با بذرهای صددرصد تک‌جنین فراهم نباشد، بسته به هدف به‌نژادی، باید از دیگر ارقام که از درصد تک‌جنینی حداکثری برخوردارند استفاده نمود. به‌همین‌دلیل، باتوجه‌به هدف پژوهش که تولید ژنوتیپ‌های اسیدی (ترش) و تریپلوئید بود، سه رقم لیموترش از گروه لمون شامل اورِکا، کوک‌اورِکا و لیسبون، با بیش‌از پنجاه درصد بذر تک‌جنین (Porras & Perez-Tornero, 2008) به‌عنوان والد مادر در تلاقی با لیموشیرین‌های تتراپلوئید استفاده شدند و همه تلاقی‌های انجام‌شده روی درختان مادری سه رقم فوق، تشکیل میوه و بذر دادند.

در تلاقی‌های این پژوهش، از والدین دیپلوئید به‌عنوان والد مادر استفاده شد(♀2X × 4X♂) و طبق نتایج سایر پژوهش‌ها، چنین تلاقی‌ها درمقایسه‌با تلاقی‌های برعکس، یعنی تلاقی‌های دارای والد ماده تتراپلوئید (♀4X × 2X♂)؛ نتاج تریپلوئید کم‌تری تولید می‌کنند و به‌علت آمیزش گامت‌های غیرطبیعی و کاهش‌نیافته دیپلوئید والد مادر (دیپلوئید) با گامت‌های طبیعی و دیپلوئید والد پدر (تتراپلوئید)، فراوانی نتاج تتراپلوئید بیشتر است (Aleza *et al.*, 2010; Khan & Kender, 2007). اگرچه به‌خاطر کمی تعداد نتاج آنالیزشده در این پروژه، نتاج تتراپلوئید حاصل نشد اما تعداد نتاج تریپلوئید درقیاس‌با دیپلوئیدها که احتمالاً نوسلار بوده‌اند نیز کمتر بود (۵ به ۱۰). ازطرفی، در شرایطی می‌توان در تلاقی‌ها از والد مادر تتراپلوئید استفاده نمود که بذور والد مادر، صددرصد یا با درصد بالا تک‌جنین باشند. ازآن‌جاکه در این پژوهش، گل‌های لیموشیرین‌های به‌کاررفته فاقدمادگی بودند، از آنها تنها به‌عنوان والد پدر امکان استفاده فراهم بود. گزارش‌های زیادی وجود دارد مبنی‌بر این‌که در درختان میوه، ژنوتیپ‌های تریپلوئید و تتراپلوئید نسبت به دیپلوئیدهای مشابه به‌طورمعنی‌دار کم‌ارتفاع‌ترند (Guerra *et al.*, 2014; 2016) که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

در این پژوهش از تلاقی دو رقم لمون «اورِکا» و «کوک‌اورِکا» به‌عنوان مادر با لیموشیرین‌های تتراپلوئید به‌عنوان پدر، در مجموع پنج نوع ژنوتیپ تریپلوئید دورگ حاصل شد که ضروری است در آینده، به‌لحاظ فنوتیپی موردبررسی‌های عمیق‌تر قرار گیرند. بدین‌منظور، پیشنهاد می‌شود این ژنوتیپ‌ها روی پایه نارنج[2]یا سوئینگل‌سیترومیلو[3]که از پایه‌های متداول در شمال کشور بوده و کاملاً دردسترس است، به‌تعداد کافی تکثیر شده و حفظ و نگهداری می‌شود.

1. June drop
2. L. *Caurantium*
3. *C. paradisi* Macfad. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.

قدردانی

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

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؛ پوراکبری، رقیه؛ امیدی، زینب و ترنگ، علیرضا. (۱۳۹۱). تأثیرات مورفولوژیک و فیزیولوژیک القای پلی‌پلوئیدی در گیاه لیموترش. *زیست‌شناسی گیاهی*، ۴(۱۲): ۱۳-۲۴.

افشار محمدیان، منصور؛ امیدی، زینب؛ پوراکبری، رقیه و اسدی آبکنار، اسد. (۱۳۹۲). بررسی تأثیر پلی‌پلوئیدی بر برخی ویژگی‌های آناتومیکی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه لیموترش. *پژوهش‌های گیاهی*، ۲۶(۳): ۲۳۸-۲۴۶.

گلعین، بهروز الف. (۱۳۹۴). خرم، رقم جدید نارنگی برای مناطق مرکبات‌خیز شمال کشور. مقاله پوستری میوه‌کاری ارائه‌شده در نهمین کنگره علوم باغبانی، اهواز، ایران.

گلعین، بهروز ب. (۱۳۹۴). معرفی نارنگی زودرس جهانگیر. مقاله پوستری میوه‌کاری ارائه‌شده در نهمین کنگره علوم باغبانی، اهواز، ایران.

REFERENCES

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. https://doi.org/10.1007/s00299-009-0783

Aleza, P.; Juarez, J.; Ollitrault, P. & Navarro, L. (2010). Polyembryony in non-apomictic citrus genotypes. *Annals of Botany*, 106(4): 533-545. https://doi.org/10.1078/0304-4238-106.4.533

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. https://doi.org/10.1007/s00299-012-1269-9

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(4): 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.

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.

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. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818742-4.00008-6

Esen, A.; Soost, R. K. & Geraci, G. (1979). Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in Citrus. *Journal of Heredity*, 70: 5-8. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a109213

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). Khoram, new mandarine cultivar for citrus growing region of north of Iran. Poster paper of fruit culture presented in the *9th Congress of Iranian Horticultural Science*, Ahvaz, Iran. *[In Persian]*.

Golein, B. (2016b). Introduction of early ripening mandarin, Jahangir. Poster paper of fruit culture, presented in the *9th 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. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.37

Guerra, D.; Wittmann, M. T. S.; Schwarz, S. F.; Souza (de), 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. https://doi.org/10.1590/S0006-87052014000100001

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. https://doi.org/10.1590/1984-70332016v16n1a6

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. https://doi.org/10.1007/s00468-005-0443-7

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. https://doi.org/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. https://doi.org/10.56093/ijas.v94i9.XXXXX

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. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02384-3

Narukulla, V.; Lahane, Y.; Uge, P.; Pandey, S.; Fiske, K.; Kawale, K.; Jagannadham & Ziogas, V. (2024). Production of triploid teedless tweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cv. Mosambi: A tuccess ttory. *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. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.010

Oiyama, I.; Okudai, N. & Takahara, T. (1981). Ploidy levels of seedlings obtained from 2x×4x crosses in citrus. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1: 32-34.

Perez -Tornero, 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. https://doi.org/10.1007/s11240-008-9414-5

Ray, P. K. (2002). Citrus. In: *Breeding Tropical and Subtropical Fruits*. Springer-Verlag Narosa Publishing House: 338.

Raza, H. & Khan, M. (2003). Seedlessness in citrus (A review). *International Journal of Agriculture and Biology*, 5: 388-391. https://doi.org/10.17582/journal.ijab/2003.5.3.388.391

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. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.3.516

Roverssi, F.; Cavichioli, 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 2019 Maria mandarin. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 44(1): 1-11. https://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. *12th International Citrus Congress*, Valencia, Spain.

Russo, G.; Reforgiato, G. R.; Recupero, S. & Paolo, D. P. (2015). 'Sweet Sicily' and 'Early Sicily', two new triploids from the program of CRA-research centre of citriculture and Mediterranean crops. *Proc. XIIth Intl. Citrus Congress. Acta Horticulturae*, 1065: 215-221. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.25

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. https://doi.org/10.4238/2013.December.12.14

Starrantino, A. & Recupero, G. R. (1981). Citrus hybrids obtained *in vitro* from 2x females × 4x males. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1: 31-32.

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. https://doi.org/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 Agriclture 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. https://doi.org/10.1016/j.frontiers.2020.12.008