کشت تعلیق سلولی، جدا سازی و امتزاج پروتوپلاست دوگونه بی بذر پرتقال واشنگتن ناول و نارنگی انشو

رضا فتوحی قزوینی و یوسف حمید اوغلی
بترتیب استادیار گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

تاریخ پذیرش مقاله ۷۶/۱۲/۶

خلاصه

سلولهای جنین زای حاصل از تخمکهای تلقیح نشده پرتقال واشنگتن ناول به محیط کشت مایع MT+ ۱۵۵۰ میلی گرم در لیتر گلوتامین +۵۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره جو انتقال یافت. از یک میلی لیتر کشت تعلیق سلولی (سلولهای ۴-۱۲ روزه از دوره های ۱۴ روزه بازکاشت) عادت یافته، و نیز از ۵۰۰ میلی گرم برگ نارنگی انشو در مواجهه با مخلوط آنزیمی سلولاز و پکتیناز در محلول CPW محتوی ۱۳% مانیتول ، نسبت کافی پروتوپلاست جدا گردید. درصد بالای پروتوپلاست زنده با استفاده از محلول دی استات فلوروسیین و بوسیله میکروسکپ وارونه مجهز به نور آبی تایید گردید. پروتوپلاستها در غلظت 4×10^5 در میلی لیتر در محلول CPW باکمک پلی اتیلن گلایکول استریل ممزوج و ۱۵ دقیقه بعد از رقیق نمودن پروتوپلاستهای تلاقی داده شده، صحت امتزاج بر اساس اختلاف رنگ بین دو نوع پروتوپلاست، مورد تایید قرار گرفت. پروتوپلاستهاپس از انجام عمل امتزاج درمحیط مایع محتوی یک قسمت حجمی MT و یک قسمت حجمی BH3 کشت و پس از ۱۰ روز شروع به تقسیم کردند. جنین زایی و تولید گیاهچه به ترتیب در محیط های کشت MT+ جیبرلین و MT+ جیبرلین+ آدنین + عصاره جو انجام گرفت.

واژه های کلیدی : امتزاج پروتوپلاست ها ، مرکبات ، سلولهای جنین زا و جنین زایی

مقدمه

مرکبات از مهمترین گیاهان درختی بوده که میوه تولیدی آنها در جهان حائز اهمیت است (۱۷). بهنژادی مرکبات به روش جنسی ، به لحاظ چند جنینی بودن بسیاری از این گیاهان و عقیم بودن تعدادی دیگر از آنها ، دشوار می باشد. چنانچه رقم مورد استفاده از ارقامی با قابلیت چند جنینی باشد، در این صورت نهال حاصل از رشد سلول تخم به راحتی از نهالهای غیر جنسی بافت خورش (جنین های نوسلار) قابل تشخیص نمی باشد. در مواردی هم رشد جنین های نوسلار [1] به حدی توسعه می نماید که از نمو جنین های حاصل از تخم جلوگیری می کند (۹). از طرف دیگر تعدادی از ارقام مرکبات بعلل مختلف میوه های پارتنوکارپ (بی بذر) تولید می‌نماید که در اینصورت دارای تخمک های تلقیح نشده و یا نمو نیافته می باشند. بعلاوه، استفاده از روشهای قدیمی بهنژادی برای ایجاد ارقام پایه و پیوندک جدید و نیز امکان انتخاب لاینهای مناسب، به لحاظ چرخه‌زایشی طولانی، آپومیکسی، درصد بالای هتروزیگوتی و سیستم‌های پیچیده بهنژادی، بسیار کند خواهد بود.

سیستمهای کشت بافت گیاهی، بویژه کشت پروتوپلاست و دورگ های رویشی [2] فرصتهایی را برای تولید گیاه مطلوب فراهم می‌سازد. پروتوپلاستهای ممزوج شده در بین گیاهان درختی که از لحاظ جنسی ناسازگار می‌باشند گیاهان خاصی تولید می‌کند که با روشهای قدیمی بهنژادی تولید آنها امکان پذیر نمی‌باشد(۱۳). بنابراین کاربرد این تکنیک برای مرکبات بی‌بذر ارزش فوق‌العاده‌ای دارد.

1 - Nucellar

2- Somatic Hybrids

اولین دورگ های رویشی در مرکبات و در واقع از گیاهان درختی با امتزاج [1] پروتوپلاست پرتقال ترووینا[2] و نارنج سه برگ[3] گزارش گردید(۳،۱۴). تاکنون معدودی دورگ رویشی در مرکبات مثل دورگ رویشی اتوتتراپلوئید بین نواتانجلو[4] و پرتقال‌های سوکاری[5] و هاملین[6]،دورگ نواتانجلو و نارنگی‌دنسی[7](۵) و دو رگ رویشی بین جنس پرتقال و *Atalantia ceylanica* (۱۱) با استفاده از سلولهای جنین‌زای حاصل از تخمک تلقیح نشده، تولید شده است. برای موفقیت در گیاهزایی پروتوپلاست‌های ممزوج شده و تولید دورگ های رویشی، ضروری است که حداقل پروتوپلاست یکی از والدین دارای قابلیت جنین‌زایی باشد(۶،۷،۱۴). تولید کالوس جنین‌زا از بافت خورش تخمکهای تلقیح نشده توسط تعدادی از پژوهشگران در مرکبات گزارش شده است (۴،۸) که امروزه از آن روشها جهت تولید کالوس از پروتوپلاست های جداشده استفاده می‌گردد.

در این مطالعه بمنظور ایجاد دورگ رویشی از دو رقم بی‌بذر از گونه‌های نارنگی و پرتقال (پروتوپلاست حاصل از کالوس پرتقال واشنگتن ناول با قابلیت جنین زایی و پروتوپلاست حاصل از برگ نارنگی انشو) استفاده گردید. بخشی از این آزمایش در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان و بخش دیگری از آن در خارج از کشور اجرا گردید.

مواد و روشها

۱ - مواد گیاهی:کالوس جنین‌زای مورد استفاده در این‌مطالعه از کاشت تخمکهای تلقیح نشده حاصل از میوه‌های ۲۴ هفته‌ای پرتقال واشنگتن ناول، روی محیط های مناسب تولید گردید(۱). قطعات ۵۰۰ میلی‌گرمی از کالوس تازه ده ماهه، در ۴۰ میلی‌لیتر از محیط کاشت مایع شامل ترکیبات پایه MT (۱۱)همراه با ۱۵۵۰ میلی‌گرم گلوتامین و ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره جو مطابق روش(۴)کشت گردید.

فلاسکهای محتوی سلول در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی(۱۸۰۰ لوکس)روی تکان دهنده افقی با ۱۴۰rpm و در دمای ۱°C ± ۲۶قرار گرفت. برای جداسازی سلولهای مرده و مواد اضافی، محلول معلق سلولی از صافی ۷۵ μm عبور داده شد. بمنظور تهیه پروتوپلاست از نارنگی انشو،برگهای جوان نارنگی انشو با محلول هیپوکلریت سدیم (دومستوز[9]) ۲۰% ضدعفونی گردید و سپس سه مرتبه با آب استریل شستشو داده شد و در نهایت تیمارهای جداسازی پروتوپلاست انجام گرفت.

۲ - جداسازی پروتوپلاست:برای جداسازی‌پروتوپلاست یک میلی‌لیتر کشت تعلیق سلولی حاصل از تخمک تلقیح شده پرتقال واشنگتن ناول[10] و ۵۰۰ میلی‌گرم برگ نارنگی انشو[11] جداگانه به پتری دیشهایی با ۱۰ سانتیمتر قطر انتقال یافتند. قبل از افزودن محلول آنزیمی،برگها در نوارهای ۱-۲ میلی‌متر عرض بریده شدند و سپس بمنظور تسریع در پلاسمولیزشدن بعدی در پتری دیش‌های ۳/۵ سانتیمتری در محلول شستشوی CPW (۱۵) محتوی ۱۳% مانیتول[12]بمدت ۱ ساعت غوطه‌ور شدند.

سه میلی‌لیتر از مخلوط آنزیمی شامل ۱/۴% پکتیناز(مسروزایم[13])و ۰/۴% سلولاز(سلیولایزین[14]) (۱۵) با منشأ *Trichoderma viride* در CPW ۱۳% مانیتول استریل شده(۲)، به هر پتری دیش افزوده شد و برای ۱۶-۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد در تاریکی روی تکان دهنده ۴۰rpm قرار گرفت. سپس با عبور دادن محتویات هر پتری از صافی ۴۵μm و شستشو با CPWمحتوی ۱۳% مانیتول و استفاده از سانتریفیوژ (۸۰ g) برای جداسازی مواد زاید همراه پروتوپلاست استفاده شد. برای جداسازی پروتوپلاست ها از مواد زاید دیگر از CPW محتوی ۱۳% مانیتول استفاده گردید. به این علت که مخلوط آنریمی در CPW محتوی ۱۳% مانیتول دارای پتانسیل اسمزی مناسب، جهت جداسازی پروتوپلاست از سلولهای جنین‌زای واشنگتن ناول(شکل ۲)و سلولهای برگ نارنگی انشو می‌باشد(شکل ۳).

بمنظور خالص‌سازی پروتوپلاست، ۳ میلی‌لیتر محلول CPW محتوی ۱۳% مانیتول به پروتوپلاست عبور داده شده از صافی،افزوده‌شد و برای مدت ۶ دقیقه با دور ۸۰g سانتریفوژ گردید. با دور ریختن بخش روشناور[15] بوسیله پیپت،پروتوپلاست ته‌مانده[16]

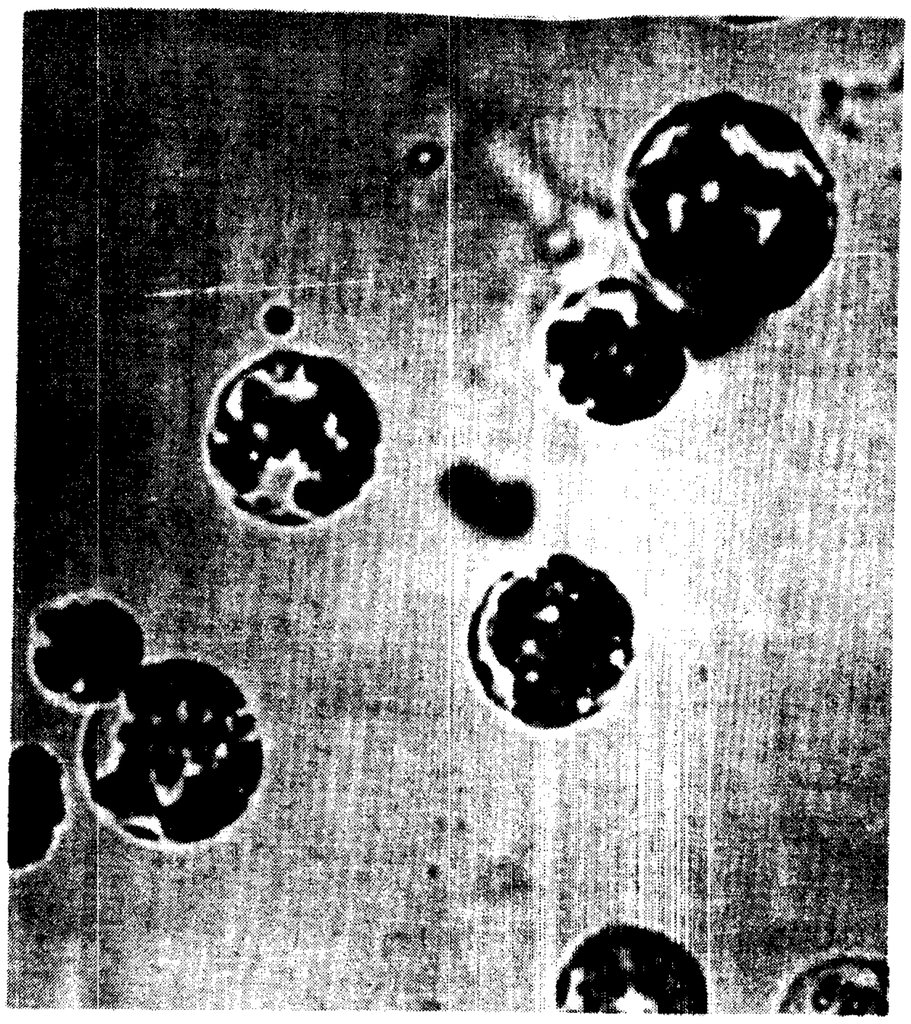
---

1 - Fusion 2 - Trovita 3 - *Poncirus trifoliate* 4 - Nova Tangelo 5 - Succari

6 - Hamlin 7 - Dancy 8 - Callus 9 - Domestos 10- Washington Navel

11- Citrus unshiu 12- Mannitol 13-Macerozyme 14-Cellulysin 15-Supernatant 16-Pellet

شکل ۱ - پروتوپلاست از سلولهای جنین زای پرتقال واشنگتن ناول (حاصل از تخمکهای تلقیح نشده)



شکل ۲ - پروتوپلاست حاصل از برگ نارنگی انشو

دوباره با ۳ میلیمتر CPW محتوی ۱۳% مانیتول بحالت تعلیق درآمد و در ۸۰g برای ۴ دقیقه سانتریفیوژ گردید. با جداسازی بخش محلول مجدداً عمل شستشو تکرار ولی برای ٦ دقیقه سانتریفیوژ شد. پروتوپلاست ته مانده با ۱/۵ میلی‌لیتر CPW محتوی ۱۳% مانیتول مخلوط و به آرامی روی ۲/۵ میلی‌لیتر پرکول[1] ۳۰% ریخته شد. محلول جدید در دور ۸۰g سانتریفیوژ گردید. پروتوپلاست بصورت یک لایه مشخص بین CPW و پرکول قرار گرفت که با دقت قابل جداسازی بود. بعد از خالص سازی پروتوپلاست،با استفاده از هموسایتومتر تعداد پروتوپلاستهای جداشده در هر نمونه تخمین زده شد. در نهایت پس از آغشته سازی پروتوپلاست هر نمونه با دی‌استات‌فلورسئین[2] ۰/۰۱% (w/v) به کمک میکروسکوپ وارونه مجهز به نورآبی[3] درصد پروتوپلاست‌های زنده مورد بررسی قرار گرفت.

۳ - امتزاج پروتوپلاست ها : برای امتزاج پروتوپلاستهای حاصل از سلولهای جنین‌زای پرتقال واشنگتن‌ناول و پروتوپلاست‌های حاصل از برگ،از محلول CPW (۱۵) همراه با پلی‌اتیلن‌گلیکول[4] (PEG) استفاده گردید. پلی‌اتیلن گلایکول بمیزان ۴۰% با وزن مولکولی ۱۵۰۰ همراه با ۷۵mM از بافر هپس[5] در pH=۸ بکار رفت.در این آزمایش غلظت پروتوپلاست هر والد به میزان $2x10^5$ پروتوپلاست در میلی‌لیتر تنظیم گردید. یک میلی لیتر از هر نوع پروتوپلاست با هم مخلوط شدند و به کمک یک میلی لیتر محلول PEG عمل امتزاج آنها صورت پذیرفت. بعد از ۱۵ دقیقه پس از امتزاج، مخلوط بدست آمده با دو برابر حجم از Ca(NO3)2 ۲۷۵mM بهمراه ۷۵ mM بافر هپس رقیق گردید. پس از آن هتروکاریون‌ها بعلت وجود رنگ سبز کلروپلاست در پروتوپلاستهای حاصل از برگ نارنگی انشو و فقدان رنگ در پروتوپلاستهای پرتقال واشینگتن ناول بخوبی در زیر میکروسکوپ وارونه قابل شناسایی بودند.

۴ - کاشت پروتوپلاست و گیاهزایی : بعد از امتزاج،مخلوط ۱ میلی لیتر از پروتوپلاستهای ممزوج شده(بهمراه سایر پروتوپلاستها)درداخل‌پتریهایی حاوی ۱میلی‌لیترازمخلوط‌محیط‌کشت 1BH3:1MT(v/v)محتوی ۲۰۰ گرم درلیترسوکروز و۰/۵ گرم در لیتر عصاره جو(۴)بطور مستقیم کشت شد.پتریها با پارافیلم

1 - Percoll

2 - Fluorescien diacetate

3 - Blue light

4 - Polyethylen Glycol

5 - Hepes

6 - Heterokaryon

مسدود گردیدند و در تاریکی در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد در انکوباتور[1] نگهداری شدند. بعد از ۴ هفته به پتری‌دیش‌ها ۱۰-۱۲ قطره از محلول 1BH3:1MT(v/v) محتوی ۱۲۵ گرم در لیتر سوکروز و ۰/۵ گرم در لیتر عصاره جو افزوده شد.بعد از دو هفته مقدار ۲ میلی‌لیتر از مخلوط 1BH3:1MT محتوی ۵۰ گرم در لیتر سوکروز و ۰/۵ گرم در لیتر عصاره جو جهت کاهش فشار اسمزی محلول اضافه گردید.محیط کشت MTبهمراه EDTA و ۸ گرم در لیتر آگار برای رشدسلولها وظهور جنینها انتخاب شد. بمنظور رشد جنین‌هاو تولیدگیاهچه به ترتیب محیط کشت‌های

MT + 1mg/L GA_3 + 40mg ADE[5] +

500mg/L ME[4] و MT+1mg/L GA_3[2]

نتایج و بحث

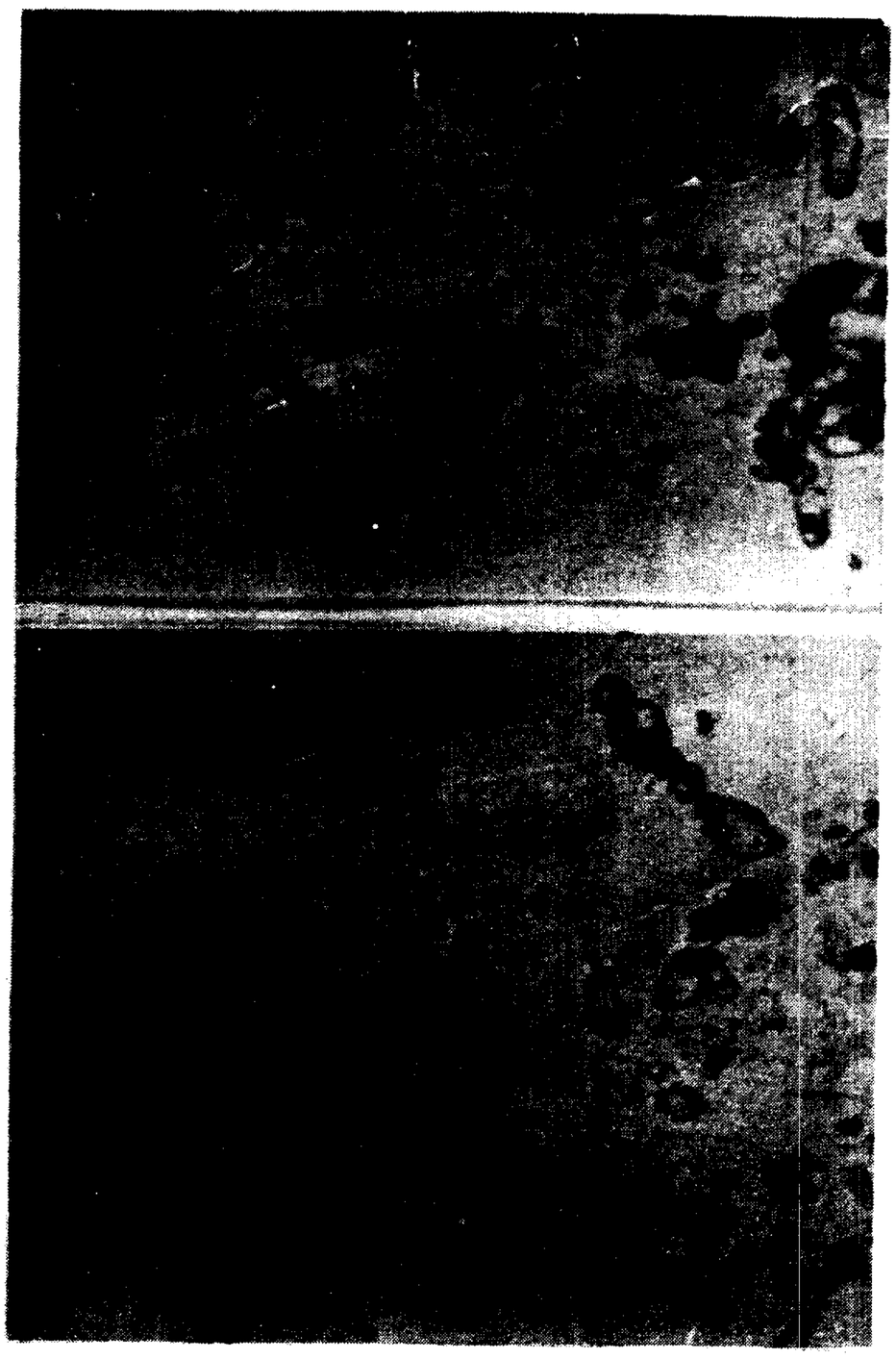
کشت تعلیق سلولی : سلولهای معلق با قابلیت جنین‌زایی از پرتقال و اشنگتن ناول پس از ۱۶ روز از پخش شدن کالوس در داخل محیط کشت مایع، دوباره در همان ترکیب محیط کشت، باز کشت گردید.بعلت توده‌ای بودن و جدا نبودن سلولها،در مرحله بازکشت چهارم، کشت تعلیق سلولی از صافی ۷۵μm عبور داده شد. فواصل بازکشت هر چهارده روز تنظیم و با ۸ نوبت‌بازکشت،دسترسی به سلولهای تعلیقی عادت یافته[4] میسر گردید.

باکمک میکروسکوپ شکل و اندازه‌های متنوعی از سلولها بصورت دراز،گرد،گلابی تا میله‌ای شکل مشاهده شد(شکل ۱).

با شمارش سلولها به کمک هموسایتومتر[5] مشخص گردید که جمعیت سلولها از ۰/۰۰۲ ± ۰/۴x۱۰[4] در روز اول کشت به ۰/۰۰۹ ± ۱/۷۳x۱۰[5] در چهارمین بازکاشت افزایش یافته است. همچنین‌زنده‌بودن سلولهابوسیله‌محلول ۰/۱% فنوسافرانین[6] حدود ۹۰% تخمین‌زده‌شد. کشت معلق سلولی برای مطالعات فیزیولوژیک ویاژنتیکی‌درمرکبات‌حائزاهمیت‌است.دراین‌مطالعه مشابه گروسر[7] وگ‌میتر[8] (۴)ازمتحرک‌با۱۴۰rpmدر ۱۸۰۰لوکس‌روشنایی (۱۶ ساعت) در ۲۶ ± ۱°C استفاده شد در حالیکه اوگاوارا[9] و همکاران (۱۳) ۲۰۰۰ لوکس روشنایی و ۱۱۰rpm را پیشنهاد نمودند.

جداسازی پروتوپلاست : غلظت پروتوپلاست‌های جداشده از سلولهای جنین‌زای پرتقال واشنگتن ناول ۱۰[5] x ۰/۲۱۱ ± ۲/۳و از برگ نارنگی ۱۰[5] x ۰/۳۲ ± ۳/۵ بود که بوسیله هموسایتومتر شمارش گردید.بااستفاده‌از دی‌استات فلوئورسئین و به کمک میکروسکوپ مجهز به نورآبی درصد پروتوپلاست زنده از سلولهای جنین‌زا و سلولهای برگ بیش از ۹۰% تخمین زده شد.

علیرغم آنکه برای بهنژادی مرکبات به روش جدید جداسازی پروتوپلاست حائز اهمیت است ولی معدود روش‌هایی برای جداسازی و نگهداری پروتوپلاست مرکبات گزارش شده است. بر خلاف سایر پژوهشگران،در این مطالعه CPW محتوی ۱۳% مانیتول همراه با سلولاز دارای منشأ *Tricoderma viridi* و پکتیناز استفاده شد و این روش موجب گردید نسبت بسیار بالایی از



شکل ۳ - اشکال مختلف سلولهای درشت معلق سلولی

1 - Incubator 2 - Murashigė & 3 - Murashige & 4 - Habituated 5 - Haemocytometer

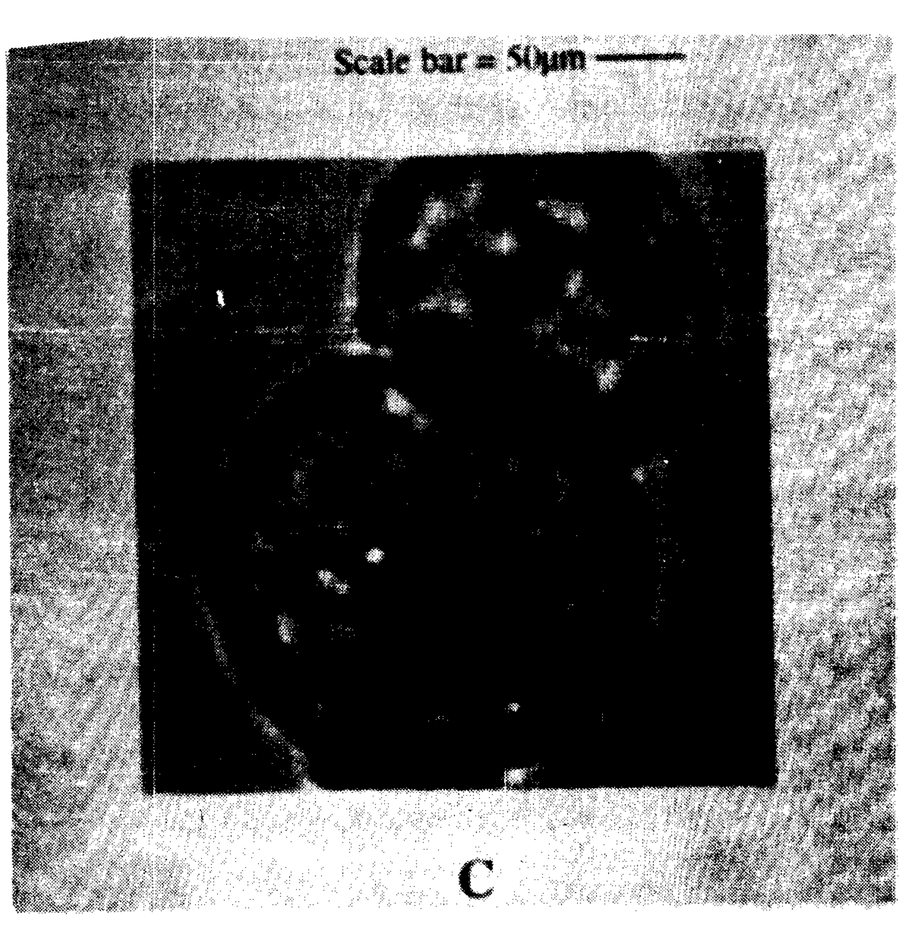
6 - Phenosafranine 7 - Grosser 8 - Gmitter 9 - Ohgawara

پروتوپلاست از برگ و کشت تعلیق سلولی حاصل گردد.خالص سازی با کمک CPW محتوی ۱۳% مانیتول و پرکول انجام گرفت در صورتیکه گروسر و گمیتر (۴)از CPW محتوی ۱۳% مانیتول و CPW محتوی ۲۵% سوکروز استفاده کردند. اوگاوارا و همکاران (۱۳)محیط کشت پایه MT محتوی ۰/۷M مانیتول را بکار بردند، در حالیکه لینگ[1] و همکاران (۱۰) ۰/۷M سوربیتول +MT را ترجیح دادند. در این پژوهش بدون آنکه مطابق روش بعضی از پژوهشگران (۱۰)۴-۵ روز قبل از جداسازی پروتوپلاست، سلولهای معلق در محیط کشت مایع محتوی لاکتوز پیش کشت گردد وپروتوپلاست قابل ملاحظه‌ای جدا گردید.مقادیر بالایی از پروتوپلاست $3/5x10^5$ ازبرگهای نارنگی انشو بدست آمد و این با گزارش گروسر و چندلر[2] (۳)مبنی بر جداسازی $2x10^7$-۷ پروتوپلاست از هر گرم برگ تازه ۵ رقم پایه،مطابقت دارد.

امتزاج پروتوپلاست : دانش فنی امتزاج پروتوپلاست برای‌تهیه ارقام جدید در مرکبات اهمیت بسیار دارد. ارقام تجارتی و بی بذر پرتقال واشنگتن ناول و نارنگی انشو با توانایی چند جنینی را براساس روشهای قدیمی و متداول بمنظور مطالعات دستیابی به لاین‌های مقاوم مثلاً به استرس‌های محیطی و یا صفات دیگر نمی‌توان تلاقی داد. در حالیکه از طریق امتزاج پروتوپلاست آنها،دسترسی به دورگ های رویشی میسر می‌گردد.در این آزمایش غلظت پروتوپلاست هر والد به میزان $2x10^5$ پروتوپلاست.در میلی لیتر،غلظت مناسبی جهت امتزاج پروتوپلاست ها را فراهم آورد. دو رنگ بودن پروتوپلاستهای جداشده(سبز -بدون رنگ)شرایطی بوجود آورد تا به راحتی بتوان تشکیل هتروکاریون ها را در زیر میکروسکوپ وارونه مشاهده نمود(شکل ۴). همزمان باتشکیل هتروکاریون‌هابه نسبت حدود ۲ درصد تعدادی هموکاریون[3] (شکل ۵)که حاصل تلاقی پروتوپلاستهای یک والد بود(پروتوپلاستهای نارنگی با هم یا پروتوپلاستهای پرتقال واشنگتن ناول با هم)و نیز پروتوپلاستهای ممزوج نشده مشاهده گردید.

اهداف متعددی در امتزاج پروتوپلاست مطرح می‌باشد.این روش می‌تواند برای دستیابی به ارقام آلوتتراپلوئید[4] (آمفی دیپلوئید[5])بعنوان پیوندک که مقاوم به برخی استرس ها باشد یا استفاده برای ایجاد تلاقی بین دیپلوئید و تتراپلویید بمنظور تهیه رقم

شکل ۴ - امتزاج پروتوپلاست هاس سلولهای جنین زا از پرتقال واشنگتن ناول و سلولهای برگ نارنگی انشو



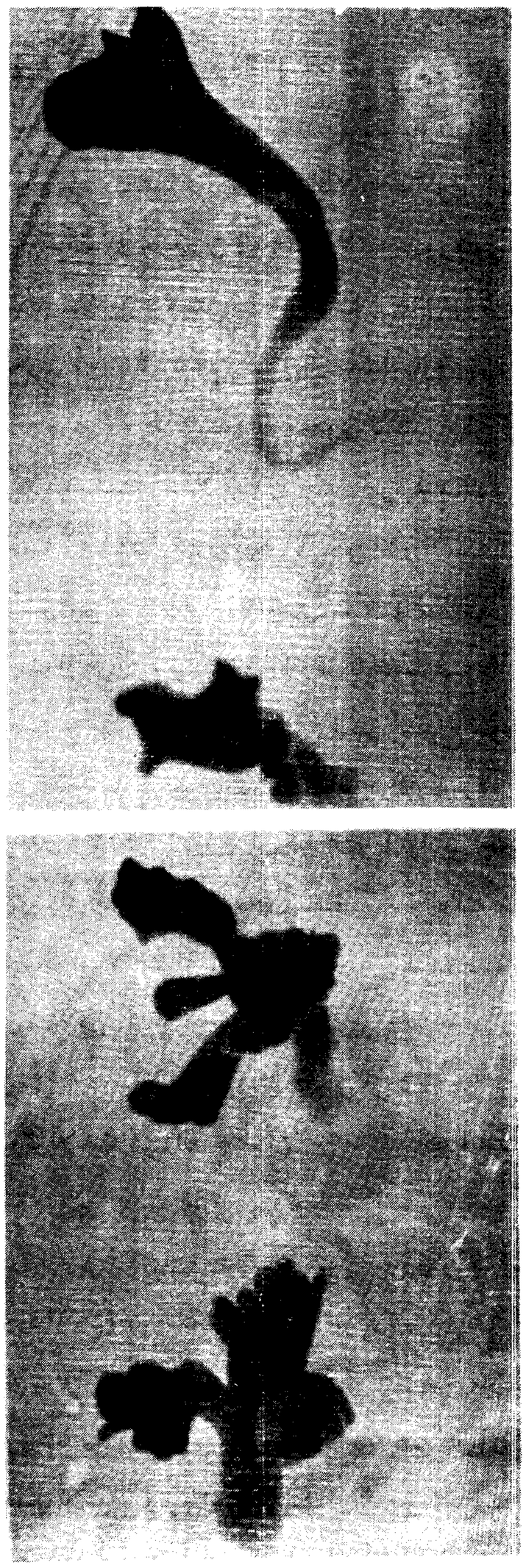
شکل ۵ - امتزاج پروتوپلاست های یکسان (هموکاریون) از هر والد

1 - Ling
2 - Chandler
3 - Homokaryon
4 - Allotetraploid
5 - Amphiploid

ترپیلوئید بی‌بذر استفاده شود. در این مطالعه PEG ۴۰ % با وزن مولکولی ۱۵۰۰ بهمراه ۷۵mM بافرهپس در pH=۸استفاده شد. در صورتیکه کوبایاشی و اوگاوارا(۹) روش اوکیمیا[1](۱۵)را دنبال کردند و از PEG ۴۰ % با وزن مولکولی ۶۰۰۰ بهمراه ۱۰۰mM CaCl2و ۳mM / ۰ گلوکز استفاده نمودند.

علیرغم همه تمهیدات بعمل آمده جهت جداسازی هتروکاریون های احتمالی توسط میکرومانیپولیتور، عمل جداسازی این سلولها امکان پذیر نبود. زیرا اولاً با برداشت هر سلول تعداد زیادی سلول دیگر نیز همراه آن برداشت می‌گردید. ثانیاً رشد سلولهای جدا شده در محیط‌های غذایی با موفقیت همراه نبوده است.

به همین دلیل هتروکاریون های احتمالی بهمراه سایر سلولها در محلول غذایی 1BH3:1MTBکشت گردید. تداوم رشد و تقسیم پروتوپلاست ها باید همراه باکاهش فشار اسمزی باشد. به همین دلیل فشار اسمزی محیط پس از ۴ هفته بتدریج تقلیل یافت. در این آزمایش اینگار با انتقال توده‌های سلولی کوچک به محیط تغییریافته MT(براساس مواد و روشها)انجام شد. پس از چهار هفته جنین های رویشی‌درتوده سلولی‌ظاهرگردید.بمنظورتولید گیاهچه، جنین ها ابتدا به محیط کشتMT+1mg/L GA3 و سپس به MT+1mg/L GA3+ 40mg/L Ade+500mg/L ME (۲) انتقال یافتند. درصورت‌عدم‌بازگشت درمحیط‌های جدید رشد وتقسیم جنین مختل می‌گردید. در نهایت با توجه به قابلیت جنین زایی سلولها، ۹۲ گیاه بدست آمد که بعضی از آنها از نظر شکل برگها،کلفتی آنها و اندازه گیاهچه‌هاباگیاهان والدتفاوت داشتند (شکل ۶). با اینحال بدلیل عدم امکان کروموزوم شماری و تست پروتئین و DNA تاکنون منشاء تنوع بوجود آمده‌و این که آیاناشی از امتزاج پروتوپلاست ها بوده و یا در اثر تغییرات ژنتیکی پروتوپلاستها(تنوع سوماکلونال [1])،اثبات نشده است. اما بی تردید دستیابی به چگونگی امتزاج پروتوپلاستهای دو گونهٔ بی بذر پرتقال واشنگتن ناول و نارنگی انشو و موفقیت در گیاهزایی پروتوپلاستهای حاصله، حائز اهمیت و گام مهمی برای مطالعات اساسی در بهنژادی مرکبات در ایران محسوب می‌گردد.



شکل ۶ - تنوع در شکل برگهای نونهالهای حاصل از پروتوپلاست های ممزوج شده

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

1- Fotouhi Ghazvini, R., and Villiers, T.A. 1995a. Factors affecting the formation of embryogenesis from

1 - Somaclonal vaiation

undeveloped ovules of Valencia and Washington Navel orange. Congeress on *In Vitro* Biology, May 20-24, Denver, Co. USA.

2- Fotouhi Ghazvini, R., and Villiers, T.A. 1995b. Protoplast isolation and fusion in two seedless orange cultivars. Congress On *In Vitro* Biology, May 20-24, Denver, Co. USA.

3- Grosser, J.W. and Chandler, J.L. 1987. Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus*, *Poncirus*, *Citrus* x *Poncirus* hybrids and Severinia for use in somatic hybridization experiments. Sci. Hort.

4- Grosser, J.W., and Gmitter, Jr., F.G. 1990. Protoplast fusion and *Citrus* improvement. pp. 340-374. In: Janick, J. (ed) Plant Breeding Reviews. Volume 8. Timber Press., Inc. Portland, Oregon.

5- Grosssr, J.W., Gmitter, Jr., F.G. and Chandler, J.L. 1992. Production of somatic hybrids and autotetraploid breeding parents for seedless *Citrus* development. Hort. Sci. 27: 1125-1127.

6- Grosser, J.W., Gmitter, Jr., F.G. and Chandler, J.L. 1988 a. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. Plant Cell Rep. 7:5-8.

7- Grosser, J.W., Gmitter, Jr. F.G. and Chandler, J.L. 1988b. Intergeneric somsatic hybrid plants from sexualy incompatible woody species "*Citrus sinensis* and *Severina disticha*" Theor. Appl. Genet. 75: 397-401.

8- Hidaka, T., and Kajiura, I. 1988. Plantlet differentiation from callus protoplasts induced from *Citrus* embryos. Sci. Hort. 34: 85-92.

9- Kobayashi, S., and Ohgawara, T. 1988. Production of somatic hybrid plants through protoplast fusion in *Citrus*. Japan Agr. Res. Quarterly. 22:181-188.

10- Ling, Jing-T., Nobumasa, N., and Iwamasa, M. 1989. Plant regeneration from protoplasts of Calamondin (*Citrus madurensis* Lour.) Sci. Hort. 40-325-333.

11- Louzada, E.S., Grosser, J.W., and Gmitter, F.G. 1993. Intergeneric somatic hybridization of sexually incompatible parents: *Citrus sinensis* and *Atalantia ceylanica*. Plant Cell Reports. 12: 687-690.

12- Murashige, T., and Tucker, D.P.H. 1969. Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture Proc. 1st Int. *Citrus* Symp. 3: 1155-1161.

13- Ohgawara, T., and Kobayashi, S. 1991. Aplication of protoplast fusion to *Citrus* breeding. Food Biotech. 5: 169-184.

14- Ohgawara, T., Kobayashi, S., Ohgawara, E., Uchimiya, H., and Ishii, S. 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. Theor. Appl. Genet.71:1-4.

15- Power, J.B., and Chapman, L.V. 1987. Isolation, culture and genetic manipulation of plant protoplasts. In: Dixon, R.A. (ed.) Plant Cell Cultur. IRL. Press. Oxford.

16- Uchimiya, H. 1982. Somatic hybridization between male strile *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa* through protoplast fusion. Theor. Appl. Genet. 61: 69-72.

17- Vardi, A., and Galun, E. 1988. Recent advances in protoplasts culture of horticultural crops. *Citrus*. Sci. Hort. 37: 217-230.

Cell suspension culture, isolation and protoplasts fusion of two seedless species of *Citrus (Citrus sinesis* L. Obs. cv. Washington Navel organge and *C. unshiu* Marc.)

R. FOTOUHI-GHAZVINI AND Y. HAMID-OGHLY

Assistant Professors ,Department of Horticulture University of Guilan

Accepted 25 Feb. 1998

SUMMARY

Embryogenic cells of unfertilized ovules from 24-week-old fruits of washington Navel orange were transferred to liquid MT+1550 mg/L glutamine + 500 mg/L ME. Protoplasts were isolated from lml habituated cell suspension culture (4-12 days into the 14 days cycle) and also from 500 mg Satsuma mandarin leavs *(Citrus unshui)* were transferred to CPW nutrients, Supplemented with 13% (w/v) mannitol, and a suitable combination of Celluysin and Macerozyme solution. High density of alive protoplasts were recognized by fluorescien diacetate (FDA) and using blue light microscope. Approximately equal volumes of protoplasts (10^5 protopast /L) in CPW were fused using PEG. After 15 minutes of dilution, the fusions were approved according to difference color of protoplasts. After 10 days, divisions of fused protoplast were stated into liquid 1BH3: 1MT (Grosser *et al*, 1990). Embryogenesis and plantlet formation were followed onto MT+GA and MT+GA+ADE+ME media.

Key Words: Protoplast fusion, citrus Embryogenic cells & Embrogenesis