استخراج پروتوپلاست از مرکبات چند جنین و نر عقیم

آصفی، مسعود، رضا فتوحی‌قزوینی و یوسف حمید اوغلی

دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه گیلان

لیمو آب شیراز دارای خاصیت چند جنینی و حساس به شانکر باکتریایی است در حالیکه نارنگی انشو با توانایی چند جنینی و مقاوم به شانکر باکتریایی است. همچنین در بین جنس مرکبات نارنگی انشو نر عقیم بوده و با تلاقی‌های جنسی تعیین ترتیب و نسبت‌های ژنتیکی مشخص نمی‌شود. از آنجاییکه ممکن است mt DNA نر عقیمی سیتوپلاسمی را کنترل کند،

احتمالاً امتزاج پروتوپلاست بین ارقام نر عقیم و بذری منجر به تولید میوه‌هایی بی بذرگردد که دارای مقاومت به شانکر باکتریایی هستند.

موفقیت درمطالعات با پروتوپلاست، بستگی به توانایی آزادسازی تعداد زیادی پروتوپلاست زنده دارد. غلظت مواد اسمزی و غلظت آنزیم‌های هضم کننده دیواره سلولی از پارامترهای مهم و موثر در میزان پروتوپلاست‌های آزاد شده و زیوایی آنها است.

در این مطالعه کالوس‌های جنین‌زای لیمو آب به محیط مایع MT (موراشیگ و توکر ۱۹۶۹) شامل ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره جو منتقل شدند. سوسپانسیون ها هر ۱۲ تا ۱۳ روز یکبار، و به تعداد ده بار قبل از استفاده برای آزادسازی پروتوپلاست واکشت شدند. میوه‌های نارنگی انشو تحت شرایط استریل با فروبری در الکل ۹۸٪ به مدت ۱ تا ۳ ثانیه و پس از شعله ور ساختن ضد عفونی شدند و بذرها پس از خارج سازی روی محیط ۱/۲ غلظت MS (موراشیگ و اسکوگ ۱۹۶۲) کشت شدند. از برگ‌های کاملاً توسعه یافته در شرایط درون شیشه‌ای برای انجام آزمایش جداسازی پروتوپلاست استفاده شد. پروتوپلاست‌های کالوس و مزوفیل برگ به ترتیب مطابق با روش گروسر و جمیتر (۱۹۹۰) و اهگاوارا و کوبایشی (۱۹۸۵) جدا شدند. شمارش پروتوپلاست‌ها با هموسایتومتر و آزمون زیوایی با استفاده از فلورسئین دی استات انجام شد. غلظت بهینه آنزیم برای جداسازی پروتوپلاست از برگ و پینه به ترتیب ۲٪ سلولاز، ۱/۵٪ پکتیناز و ۰/۵ ٪ پکتیناز بود. بعد از ۱۲ تا ۱٤ ساعت از تیمار آنزیمی از یک گرم پینه و برگ تازه به ترتیب $۱۰^{۶}\times۱/۵-۱$ و $۱۰^{۶}\times۱-۰/۸$ پروتوپلاست آزاد شد. همچنین زیوایی پروتوپلاست‌های برگ و پینه به وسیله رنگ‌آمیزی با فلورسئین دی استات به ترتیب ۷۰ و ۸۰٪ تعیین شد. فشار اسمزی بهینه برای هر دو والد با CPW + ۱۳٪ مانیتول به دست آمد.