

بررسی چندشکلی نشانگرهای مولکولی SSR و ISSR در نژادگان‌های مختلف لیموترش بدون علائم بیماری جاروک

سمانه راهب^۱، محمود قاسم نژاد^{۲*}، بهروز گلین^۳، مرتضی گل محمدی^۴ و عاطفه صبوری^۵
۱، ۲ و ۵. دانشجوی سابق دکتری، استاد و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳ و ۴. دانشیار و استادیار، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، رامسر، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۳)

چکیده

لایم‌ها به دلیل کیفیت و اسیدیته بالای عصاره میوه، به صورت تازه خوری و فرآوری شده استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر، رخداد بیماری جاروک، باعث بین رفتن هزاران اصله درخت لایم در جنوب ایران شده است. مهم‌ترین روش کنترل این بیماری، کاشت نژادگان (ژنوتیپ)‌های متحمل است. بنابراین، در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۳۳ نژادگان مختلف لایم بدون علائم بیماری جاروک در مزرعه یا پس از آزمایش‌های مقدماتی، به همراه ده رقم تجاری مرکبات به‌عنوان شاهد با ۱۷ جفت آغازگر SSR و ۱۱ آغازگر ISSR بررسی شد. با توجه به محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نشانگرهای ریزماهواره TAA1 و TC26 به ترتیب به میزان ۰/۷۲ و ۰/۶۸ و همچنین در نشانگرهای ISSR، آغازگرهای ISSR1، 809 و 810 هر سه به میزان ۰/۴۹ به‌عنوان مناسب‌ترین نشانگرهای متمایزکننده شناسایی شدند. نتایج نشان داد، بین لایم‌ها و دیگر انواع مرکبات از لحاظ نشانگرهای مورد بررسی تفاوت‌هایی وجود دارد. از سوی دیگر همه نژادگان‌های لایم بر پایه هر دو نشانگر، قرابت بالایی با رقم‌های مکزیکن لایم و پرشین لایم نشان دادند و در یک خوشه قرار گرفتند. بنابراین، بیشتر نژادگان‌های لیموترش در جنوب کشور متعلق به گروه لایم‌ها هستند.

واژه‌های کلیدی: لایم، محتوای اطلاعات چندشکلی، مرکبات.

Investigation of polymorphism in different acid lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) genotypes with free witches broom disease by molecular markers of SSR and ISSR

Samaneh Raheb¹, Mahmood Ghasemnezhad^{2*}, Behrouz Golein³, Morteza Golmohammadi⁴
and Atefeh Sabouri⁵

1, 2, 5. Former Ph. D. Student, Professor and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran
3, 4. Associate Professor and Assistant Professor, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Ramsar, Iran
(Received: Sep. 25, 2016 - Accepted: Mar 3, 2017)

ABSTRACT

Limes have been consumed as fresh fruits and processing products, due to high quality and acidity in fruit juice. In recent years, the incidence of Witches Broom disease resulted in destroy of thousands Limes trees in the south of Iran. The best method for controlling this disease is planting tolerant genotypes. Therefore, in this study, genetic diversity of 33 different lime genotypes which didn't showed Witches Broom disease in the field and preliminary test, with 10 commercial citrus cultivars as a control was evaluated by 17 pair primers of SSR and 11 primers of ISSR. According to results with Simple Sequence Repeat (SSR) markers, the highest Polymorphic Information Content (PIC) were observed in TAA1 and TC26 with 0.72 and 0.68, respectively and by using ISSR markers were in ISSR1, 809 and 810 with 0.49 which was identified as a the most appropriate distinguishing markers. Results showed that there were differences between Limes and other types of citrus based on kind of studied markers. On the other hand, all of Lime genotypes had high affinity with Mexican Lime and Persian Lime and grouped in a cluster. Therefore, most of acid limes in south of Iran belonged to Limes group.

Keywords: Citrus, genetic diversity, lime, polymorphic information content.

* Corresponding author E-mail: ghasemnezhad@guilan.ac.ir

مقدمه

لایم‌ها گروهی از مرکبات را شامل می‌شوند که موطن اصلی آن‌ها جزایر هند شرقی بوده که به اروپا منتقل شده است (Davies & Albrigo, 1994)، اما منشأ لمون‌ها به‌طور دقیق شناسایی نشده و این احتمال می‌رود که حاصل تلاقی بالنگ و لایم باشد. این موضوع نشان می‌دهد که بالنگ و لایم جزو مرکبات اولیه هستند (Barret & Rhods, 1976). کشورهای عمده تولیدکننده لیموترش در جهان شامل هند، مکزیک، چین، آرژانتین، برزیل، آمریکا، ترکیه، اسپانیا و ایران هستند که از لحاظ سطح زیرکشت و میزان تولید لایم، ایران در رتبه نهم جهانی قرار گرفته است و سطح زیر کشت آن حدود ۲۸۶۲۷ هکتار و میزان تولید آن ۴۲۷۷۱۵ تن است (FAOSTAT, 2013). مناطق مناسب کشت لایم شامل استان‌های فارس، بوشهر، کهگیلویه و بویراحمد، هرمزگان و سیستان بلوچستان است (Golein & Adouli, 2011). اما در سال‌های اخیر با رخداد بیماری جاروک بخش زیادی از درختان لایم در جنوب ایران از بین رفته است و تهدید اصلی برای تولید لایم در ایران به شمار می‌آید. بیماری جاروک ناشی از نوعی فیتوپلازما (*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*)، مهم‌ترین بیماری درختان لایم‌ترش است (Bove et al., 2000). این بیماری قابلیت انتقال بالایی داشته و با توجه به وجود ناقل طبیعی و نیز وجود میزبان‌های دیگری به‌غیر از مرکبات (مانند برخی از علف‌های هرز همچون تاجریزی، داتوره و سس) از میان بردن همه کانون‌های آلودگی و امحاء درختان آلوده تا حدودی غیرممکن است. بدین منظور، تحقیقات زیادی در زمینه مبارزه با این بیماری صورت گرفته است. از جمله اصلاح لیموترش برای تولید رقم‌های مقاوم به بیماری جاروک با دورگ‌گیری بین نارنگی کلمانتین و کامکوات ناگامی، که هر دو مقاوم به این بیماری هستند به‌عنوان والد مادری در تلاقی با لیموترش (والد نر) است (Asadi et al., 2012). همچنین در پژوهش دیگر اثر میان‌پایه والنسیا، واشنگتن ناول، مارس ارلی در جلوگیری و کنترل بیماری جاروک لیموترش

بررسی و معلوم شد میان‌پایه هیچ نقشی در مهار و کنترل جریان فیتوپلازمایی عامل جاروک ندارد (Salehi et al., 2012).

آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد آن در ژرم‌پلاسم گیاهان و تعیین روابط ژنتیکی مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاحی به‌شمار می‌رود. به‌نژادگران گیاهی به‌طور معمول استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA را نسبت به دیگر نشانگرها برای اطمینان از درستی تنوع بر پایه نشانگرهای مرفولوژیک ترجیح می‌دهند (Mohammadi, 2006). نشانگرهای مولکولی به‌عنوان ابزاری مهم در مرکبات در دامنه گسترده‌ای از بررسی‌ها شامل تجزیه پیوستگی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، تجزیه آرایه‌بندی، تعیین خویشاوندی ژنتیکی و شناسایی رقم‌ها به‌کار گرفته شده‌اند. فراوانی نشانگرهای SSR در ژنوم، سطح بالای تنوع آلی در جایگاه‌های ریزماهورهای و سهولت به‌کارگیری این نشانگرها، آن‌ها را از نشانگرهای ژنتیکی مشهور ساخته است. ویژگی دیگر این نشانگرها، هم‌بارز بودن آن‌ها و امکان تشخیص افراد هتروزایگوت از هموزایگوت است (Ovesna et al., 2002). نشانگر بعدی که در این تحقیق استفاده شده است نشانگر ISSR است. که به‌دلیل تکرارپذیری بالا، سادگی و کم‌هزینه بودن، عمومیت زیادی دارد و برای طراحی آن نشانگر نیاز به داشتن اطلاعات از توالی ژنومی نیست (Abdollahi et al., 2015). از نشانگرهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی مرکبات استفاده زیادی شده است. Shrestha et al. (2012) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۶۲ نژادگان (ژنوتیپ) مختلف لایم‌ترش در قسمت شرقی کشور نپال از نشانگر SSR (۱۲ جفت آغازگر) استفاده کردند. نتایج نشان داد، نشانگر SSR چندشکلی بالا و کارایی زیادی در ارزیابی تنوع ژنتیکی نژادگان‌های مختلف لایم‌ترش دارد. Golein et al. (2012) برای بررسی روابط ژنتیکی بین بکرایی و بعضی از نژادگان‌های شناخته‌شده مرکبات از نشانگر SSR و PCR-RFLP استفاده کردند. بر پایه نتایج به‌دست‌آمده رابطه نزدیکی بین بکرایی و رافلمون پیدا شد و پیشنهاد

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی این پژوهش شامل ۴۳ نژادگان متشکل از ۳۳ نژادگان طبیعی لایم ترش بدون علائم بیماری جاروک و ده رقم تجاری مرکبات به‌عنوان شاهد بود (جدول ۱). نژادگان‌های انتخابی از مناطق آلوده به بیماری، موجود در کلکسیون ایستگاه‌های تحقیقات مرکبات واقع در استان‌های فارس (داراب و جهرم)، هرمزگان (میناب) و کرمان (جیرفت)، انتخاب و گردآوری شدند. این نژادگان‌ها در آغاز از لحاظ سلامت نسبت به بیماری جاروک ارزیابی شدند. در مرحله اول هیچ‌یک از نژادگان‌ها آلوده به عامل بیماری نبودند و سپس از نظر ویژگی‌های مولکولی با ده رقم تجاری اصلی مرکبات شامل بالنگ، سلطان مرکبات، گریپ‌فروت، نارنج، پرتقال محلی، مکزیکن لایم، لیمو لیسبون، پرشین لایم، لیموشیرین، نارنگی دنسی به‌عنوان شاهد مقایسه شدند. از سرشاخه‌های جوان و بدون علائم ظاهری بیماری نژادگان‌های یادشده، حدود پنج تا شش برگ جوان به‌طور تصادفی گردآوری و تا زمان استخراج DNA در فریزر در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

شد که به‌احتمال رافلمون به‌عنوان والد مادری بکرایی حساب می‌شود. (2004) *Shahsavari et al.* در ارزیابی گوناگونی ژنتیکی انواع لیمو در استان فارس از شش آغازگر ISSR استفاده کرد. بنا بر نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد، نشانگرهای ISSR می‌توانند به‌خوبی رابطه‌های فیلوژنتیکی را بین نژادگان‌های مختلف مرکبات مشخص کنند. (2013) *Asadi et al.* برای بررسی تنوع ژنتیکی ۱۹ نژادگان از مرکبات شمال کشور، از هفت نشانگر ISSR استفاده کرد. نتایج تحقیق نشان داد، نشانگرهای ISSR، در تعیین میزان تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی قدرت تمایز بالایی دارند.

بنابراین هدف این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین ارتباط خویشاوندی شماری از نژادگان‌های لیموترش بدون علائم ظاهری جاروک (همچون زرد شدن اندام هوایی، کوتاه شدن فاصله میانگره‌ها، کوتولگی، جارویی شدن سرشاخه‌ها و در نهایت پژمردگی و مرگ درخت) گردآوری‌شده در کلکسیون‌های مرکبات جنوب کشور با استفاده از نشانگرهای SSR و ISSR است.

جدول ۱. ویژگی‌های نژادگان‌های لایم مورد بررسی در این پژوهش

Table 1. Traits of Lime genotypes studied in this research

Location	Scientific name	Common name	Number	Location	Scientific name	Common name	Number
Darab	<i>Citrus</i> sp.	Forg Hybrid (7)	23	Minab	<i>Citrus</i> sp.	6 darab	1
Darab		Limequat	24	Minab	<i>Citrus</i> sp.	1-1	2
Darab	<i>Citrus</i> sp.	Forg Hybrid (8)	25	Minab	<i>Citrus</i> sp.	2-2-MX	3
Darab	<i>Citrus</i> sp.	Hybrid (2): <i>citrus aurantifolia</i> × Bakraee (<i>Citrus</i> sp.)	26	Minab	<i>Citrus</i> sp.	Binam	4
Darab	<i>Citrus</i> sp.	Hybrid (3): <i>citrus aurantifolia</i> × <i>citrus sinensis</i>	27	Minab	<i>Citrus</i> sp.	5-2	5
Darab	<i>Citrus</i> sp.	Cucumber lime Farood	28	Minab	<i>Citrus</i> sp.	4- Darab	6
Darab	<i>Citrus</i> sp.	Sweet lime Forg	29	Minab	<i>Citrus</i> sp.	4-5	7
Darab	<i>Citrus</i> sp.	Curly lime Farood	30	Minab	<i>Citrus</i> sp.	1-10	8
Jiroft	<i>Citrus</i> sp.	G6	31	Minab	<i>Citrus</i> sp.	4-2	9
Jiroft	<i>Citrus</i> sp.	G7	32	Minab	<i>Citrus</i> sp.	1-13	10
Jiroft	<i>Citrus</i> sp.	G11	33	Minab	<i>Citrus</i> sp.	1-14	11
Ramsar	<i>Citrus maxima</i> Merill	Pummelo	34	Minab	<i>Citrus</i> sp.	1-7	12
Ramsar	<i>Citrus aurantium</i> L.	Sour orange	35	Minab	<i>Citrus</i> sp.	5-1	13
Ramsar	<i>Citrus limettioides</i> Tan.	Sweet lime	36	Minab	<i>Citrus</i> sp.	1-4	14
Ramsar	<i>Citrus latifolia</i>	Persian lime	37	Minab	<i>Citrus</i> sp.	1-3	15
Ramsar	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.	Lisbon lemon	38	Minab	<i>Citrus</i> sp.	2-8	16
Ramsar	<i>Citrus medica</i> L.	Citron	39	Minab	<i>Citrus</i> sp.	2-10	17
Ramsar	<i>Citrus paradisi</i> Macf.	Duncan grapefruit	40	Minab	<i>Citrus</i> sp.	1-5	18
Ramsar	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Local orange Siavaraz orange	41	Jahrom	<i>Citrus</i> sp.	Mesri Kamali tangebaluchi (21)	19
Ramsar	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Dancy mandarin	42	Jahrom	<i>Citrus</i> sp.	Kharkulu	20
Ramsar	<i>Citrus aurantifolia</i> (Chrism.) Swingle	Mexican lime	43	Darab	<i>Citrus</i> sp.	Hybrid (5)	21
				Darab	<i>Citrus</i> sp.	Forg Hybrid (6)	22

استخراج DNA

برای استخراج DNA ژنومی دو گرم از بافت برگ گی گردآوری شده در هاون چینی در حضور نیتروژن مایع پودر و استخراج DNA به روش Edward *et al.* (1991) انجام شد. برای کنترل خلوص DNA از دستگاه طیفسنج نوری یا اسپکتروفوتومتر (Nanodrop- ND2000) با نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. برای تعیین کیفیت DNAهای استخراج شده از ژل ۰/۸ درصد آگاروز استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با نشانگر SSR

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (MJ Research. PTC200) ساخت شرکت Bio-Rad با ۱۷ جفت آغازگر اختصاصی SSR (Novelli *et al.*, 2006) در مرکبات که در بررسی‌های دیگر محققان میزان چندشکلی بالایی را نشان داده بود، انجام شد. مشخصات نشانگرها در جدول ۲ آورده شده است. واکنش‌های PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ واحد آنزیم *Taq DNA Polymerase*، ۰/۵ میکرومولار از هر جفت آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPS) و ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی انجام شد. شرایط افزونش DNA در آغاز برای هر جفت آغازگر به صورت واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، دمای اتصال برای هر جفت آغازگر ۴۵-۵۵ درجه سلسیوس (متفاوت برای هر جفت آغازگر) به مدت ۳۰ ثانیه و توسعه ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در نهایت هفت دقیقه توسعه نهایی انجام شد. فراورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به نسبت مساوی روی ژل پلی‌آکرلامید ۶ درصد (در دستگاه Mega-Gel SystemC-DASG-400-50) بارگذاری و با جریان ثابت ۸۰ میلی‌آمپر به مدت ۶۰-۹۰ دقیقه با توجه به طول جایگاه‌ها، الکتروفورز انجام و رنگ‌آمیزی با استفاده از اتیدیوم بروماید انجام شد. الگوی نواری DNA حاصل بر پایه وجود یا نبود (به ترتیب ۰ و ۱) و همچنین بر پایه اندازه نوار DNA حاصل، امتیازدهی شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نشانگر ISSR

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (MJ Research. PTC200) ساخت شرکت Bio-Rad با ۱۱ نشانگر ISSR (Fang & Roose, 1997; Tripolitsiotis & Nikoloudakis, 2013) انجام شد. مشخصات نشانگرها در جدول ۲ آورده شده است. در افزونش اولیه در آغاز واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال نشانگرها در ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و توسعه در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و در نهایت هفت دقیقه توسعه نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. پس از پایان افزونش محصول PCR برای بررسی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در توان ثابت ۱۰۰ وات و به مدت دو ساعت آزمون شد و توسط اتیدیوم بروماید و نور UV عکس‌برداری صورت گرفت. الگوهای نواری حاصل به صورت وجود یا نبود باند به ترتیب با ۱ و ۰ امتیازدهی شدند.

ارزیابی سلامت نژادگان‌ها نسبت به بیماری جاروک

برای بررسی وجود یا نبود عامل بیماری در ارزیابی اولیه نژادگان‌های طبیعی لایم ترش از آزمون PCR با نشانگرهای P1/WB3، P1/P7 و R16F2n/R16R2 استفاده شد.

تجزیه‌های آماری

برای تجزیه داده‌های SSR، پس از تشکیل ماتریس صفر و یک و انتقال آن به نرم‌افزار GGT، تشکیل ماتریس تشابه با استفاده از روش‌های مختلف انجام شد و در نهایت ماتریس ضریب تطابق ساده (SM) و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA تفسیر شد. همچنین برای محاسبه میزان هتروزیگوتی مشاهده شده، شمار آلل، فراوانی آلل‌ها و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از نرم‌افزار Power Maeker ۷.3.25 استفاده شد. برای تجزیه داده‌های ISSR، پس از تشکیل ماتریس صفر و یک و انتقال آن به نرم‌افزار NTSYS (ویرایش ۲/۰۲) (Rohlf, 1998) تشکیل ماتریس تشابه با استفاده از روش‌های مختلف و

است. از ۱۷ جفت آغازگر استفاده شده در این پژوهش ۱۳ جفت، الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی برای نژادگان‌های مختلف ایجاد کردند. سیزده جفت آغازگر مورد استفاده در این تحقیق در مجموع ۸۲ آلل تولید کردند. شمار آلل شناسایی شده در هر مکان ژنی بین ۱۰-۳ آلل بود که مکان‌های ژنی TAA1 و AC01 به ترتیب بیشترین و کمترین آلل را داشتند. با توجه به جدول ۳، مکان‌های TAA41، AC01 و TC26 ۱۰۰ درصد هتروزیگوسیتی نشان دادند و کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مربوط به مکان TAA15 و معادل ۸۵ درصد بود. Nematollahi *et al.* (2013) برای بررسی تنوع ژنتیکی ۵۶ نژادگان ناشناخته مرکبات از ۱۲ جفت نشانگر SSR استفاده کردند. دامنه شمار آلل به دست آمده بین ۲ تا ۸ گزارش کردند و همچنین دامنه میزان هتروزیگوسیتی به دست آمده بین ۰/۲۵ تا ۰/۹۶ بود. در این پژوهش، محتوای اطلاعات چند شکل، بین ۰/۴ تا ۰/۷۲ و میانگین آن ۰/۵۷ بود. بالاترین میزان PIC محاسبه شده مربوط به مکان‌های TAA1 و TC26 بود که به ترتیب به میزان ۰/۷۲ و ۰/۶۸ و کمترین میزان مربوط به مکان CT02 با میزان ۰/۴ تعیین شد. میزان PICهای محاسبه شده در این پژوهش با یافته‌های Golein *et al.* (2012) که میزان محتوای اطلاعات چند شکل در مکان‌های TAA1 و CT02 در آن به ترتیب ۰/۷۲ و ۰/۴۹ بود تا حدودی هماهنگی دارد.

همچنین گروه‌بندی‌های متفاوت صورت گرفت. در نهایت با توجه به ساختار دندروگرام‌های به دست آمده، برترین گروه‌بندی با استفاده از ضریب شباهت تطابق ساده و الگوریتم UPGMA به دست آمد. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) با توجه به غالب بودن نشانگر ISSR از رابطه $PIC_i = 2 \sum_{j=1}^{f_i} (1 - f_{ij})$ استفاده شد. در این رابطه PIC برابر با PIC نشانگر نام، f_i فراوانی وجود قطعه نام و $(1 - f_{ij})$ فراوانی نبود قطعه نام است (Roldin-Ruiz *et al.*, 2000) که برای محاسبه آن از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

ارزیابی اولیه آلودگی نژادگان‌ها به عامل بیماری جاروک

فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک در هیچ‌یک از ۳۳ نژادگان مورد بررسی در این تحقیق با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تشخیص داده نشد.

افزونش SSR

برای تعیین روابط ژنتیکی ۴۳ نژادگان مختلف لایم‌های اسیدی و رقم‌های تجاری بدون علائم بیماری جاروک از ۱۷ جفت آغازگر SSR استفاده شد. اطلاعات مربوط به نشانگرها، دامنه اندازه آللی، محتوای اطلاعات چندشکلی، میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و شمار آلل‌های مؤثر، در جدول ۳ خلاصه شده

جدول ۲. توالی آغازگرهای نشانگرهای SSR و ISSR

Table 2. List of the used SSR and ISSR primers

Primer sequence	Primer	Reverse sequence	Forward sequence	Primer
	ISSR			SSR
BDB (TCC)5	ISSR1	ACATGCAGTGCTATAATGAATG	AGGTCTACATTGGCATTGTC	TAA41
DBDA(CA)7	N3	AAGAAGAAGAGCCCCATTAGC	GACAACATCAACAACAGCAAGAGC	TAA1
YG (GA)8	N4	TAACCACTTAGGCTTCGGCA	TCAGACATTGAGTTGCTCG	CTT01
(AG)8YT	N5	CTTCCCAGCTGCACAAGC	GAAAGGGTTACTTGACCAGGC	TAA15
(AC)8YG	N7	TGTGAGTGTGTTGTGCGTGTG	TTCCTTATGTAATTGCTCTTTG	ATC09
(AC)8YA	N8	TAGTACCCACAGGAAGAGAGC	GGATGAAAAATGCTCAAAATG	TAA27
(AG)8G	809	TTGCCATTGTAGCATGTTGG	ATCACAATTACTAGCAGCGCC	CAC23
(GA)8T	810	TTTTAAAATCCCTGACCAGA	TTTGACATCAACATAAAAACAGAAA	AC01
(CT)8AGC	844	GTGATTGCTGGTGTGCTT	AACAGTTGATGAAGAGGAAG	CCSM18
(ACC)6	861	GTTATGATACGTCTGTGTCC	ACATGGACAGGACAATAAG	CCSM17
(CT)8A	814	GAGGGAAAAGCCCTAATCTCA	CTTCTCTTGCGGAGTGTTC	TC26
		TGCTCCGAACCTTCATCATTG	GCCTTCTTGATTTACCGGAC	GT03
		CAACAACCACCCTCTCACG	CGAACCTATAAAAAGCCGAAAC	CT21
		TGACTGTTGGATTTGGGATG	ACGGTGCGTTTTGAGGTAAG	CT02
		AGACTCACGTAACCTACTTC	GCTATGTTATGATACGCTG	CCSM147
		CCCACATGCTAGCACAAAGA	TCAACACCTCGAACAGAAGG	CCT01
		CTTCTCTTGCGGAGTGTTC	AAAGGGAAAAGCCCTAATCTCA	AG14

افزودن ISSR

از ۱۱ آغازگر استفاده شده در این پژوهش، نه نشانگر قطعاتی قابل امتیازدهی تولید کردند که میزان چندشکلی این قطعات در جدول ۴ نشان داده شده است. از کل نشانگرهای موجود در مجموع ۱۰۳ نوار ایجاد شد که از بین آن‌ها ۸۷ نوار چند شکل بودند. میانگین مکان‌های چند شکل ۹/۶ به دست آمد. درصد چندشکلی به دست آمده از ۱۰۰ درصد برای نشانگرهای N4 و 844 و ۶۱/۵۳ درصد برای نشانگر N4 متغیر بود. میانگین درصد چندشکلی به دست آمده در این تحقیق ۷۱/۳۸ درصد بود. با توجه به درصد به نسبت بالای چندشکلی به دست آمده می‌توان انتظار داشت این نشانگرها بتوانند به خوبی در شناسایی و تفکیک نژادگان‌های لیموترش عمل کنند. محتوای اطلاعات چند شکل در این تحقیق بین ۰/۳۲ و ۰/۴۹ و میانگین آن ۰/۳۹ بود. بالاترین میزان PIC محاسبه شده در نشانگرهای ISSR1، 809 و 810 با میزان ۰/۴۹ تعیین شد.

بررسی قرابت ژنتیکی و تجزیه خوشه‌ای بر پایه

نشانگرهای SSR

تجزیه خوشه‌ای ۴۳ نژادگان مورد بررسی بر پایه داده‌های حاصل SSR با روش UPGMA و ضریب تشابه تطابق ساده (SM) انجام شد (شکل ۱). در دندروگرام ترسیم شده (شکل ۱) نژادگان‌ها و رقم‌های مورد بررسی در چهار گروه اصلی (A, B, C و D) قرار گرفتند که هر گروه اصلی به جز گروه D با دو زیرگروه مشخص می‌شوند. گروه A به عنوان بزرگ‌ترین گروه را می‌توان به دو زیرگروه تقسیم کرد. زیرگروه اول A1 شامل ۳۲ نژادگان متشکل از نژادگان‌های G1, G2, G43, G5, G6, G8, G9, G10, G11, G12, G13, G14, G15, G17, G19, G20, G21, G22, G23, G25, G3, G4, G16, G7, G33, G31, G28, G30 و G24 زیرگروه دوم A2 تنها شامل G37 یعنی پرشین لایم است. قرارگیری شمار قابل توجه از نژادگان‌های مورد بررسی در گروه مکزیکن لایم و پرشین لایم نشان می‌دهد، بیشتر نمونه‌های لیمو در جنوب متعلق به لایم‌ها هستند.

جدول ۳. آغازگرها، اندازه آلل، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (H_{obs}) و شمار آلل مربوط به ۱۳

جفت آغازگر SSR

Table 3. Primers, allele size, PIC, observed heterozygosity (H_{obs}) and number of alleles for 13 primer pairs of SSR

Alleles number	H_{obs}	PIC	Allele size (bp)	Primer
8	0.90	0.64	108-178	AG14
6	0.97	0.67	173-210	GT03
3	0.90	0.40	111-167	CT02
6	0.85	0.52	182-247	TAA15
7	1	0.67	127-190	TAA41
3	1	0.48	135-167	AC01
7	1	0.68	133-190	TC26
7	0.95	0.55	211-263	CCSM18
6	0.93	0.57	169-202	ATC09
6	0.95	0.54	196-233	TAA27
5	0.90	0.51	250-281	CAC23
10	0.90	0.72	170-202	TAA1
8	0.90	0.55	124-159	CTT01
6.3	0.93	0.57	--	Mean

جدول ۴. آماره‌های تنوع ژنتیکی مربوط به ۱۱ آغازگر ISSR

Table 4. Statistics of genetic diversity for 11 ISSR primers

Polymorph bands	Total bands	Polymorphism Percentage	PIC	Primer
7	8	87.5	0.49	ISSR1
9	10	90	0.38	N3
5	5	100	0.32	N4
13	16	81.25	0.38	N5
10	13	76.92	0.27	N7
8	13	61.53	0.28	N8
11	13	84.61	0.49	809
12	13	92.30	0.49	810
12	12	100	0.47	844
9.6	11.44	71.38	0.39	Mean

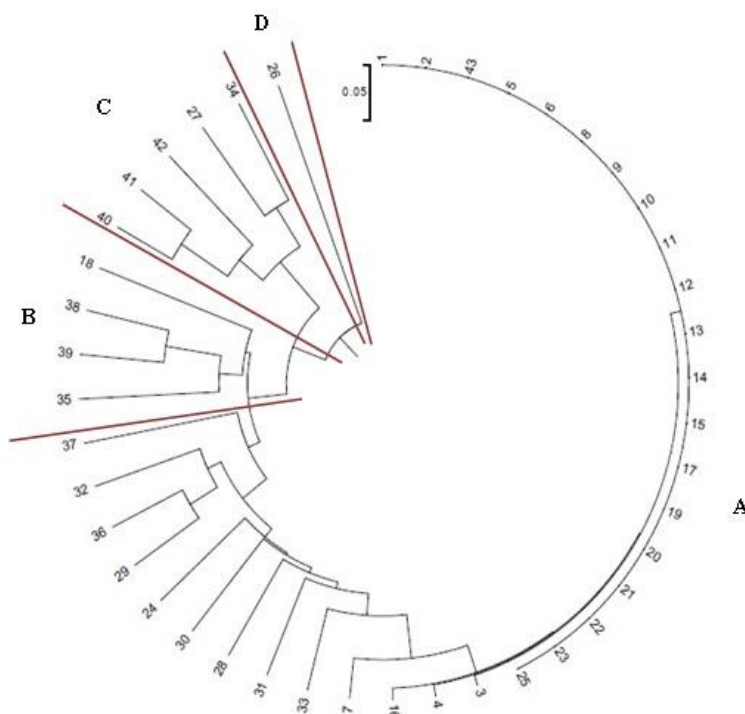
توجه به اینکه پرشین لایم بنابر نظریه Zhang (2016) یک دورگ بین مکزیکن لایم و لمون است، حال با توجه به ضریب تشابه ۰/۷۳ بین پرشین لایم و مکزیکن لایم و همچنین ضریب تشابه ۰/۶۸ بین پرشین لایم و لمون، لذا نتایج به دست آمده از این بررسی، نظریه یادشده را تأیید می کند. همچنین علت جدا شدن پرشین لایم از دیگر رقم های لیموترش شاید به علت تفاوت در اندازه و شکل میوه، اندازه و شکل برگ، نوع درخت و همچنین به علت بی بذری آن و در نتیجه تفاوت ژنومی و نواحی افزونش شده بر پایه نشانگرهای مورد بررسی باشد. گروه B شامل نژادگان های G18 (نژادگان ناشناخته لیموترش)، G35 (نارنج)، G39 (بالنگ) و G38 (لمون لیسبون) است. هم گروه بودن نارنج، بالنگ و لمون لیسبون با یافته های Nicolosi (2000) مبنی بر اینکه بالنگ والد مادری بسیاری از گونه های *Citrus* مانند لمون و لایم است، همخوانی دارد. بالنگ و لمون لیسبون با ضریب تشابه ۰/۸۴ بیشترین ضریب تشابه را در این گروه دارند. قرارگیری لمون در کنار بالنگ در این پژوهش و این میزان ضریب تشابه بالا در بررسی های پیشین نیز به دست آمده است (Federici et al., 1998; Nicolosi et al., 2000) و با نتایج به دست آمده از این بررسی هماهنگ است. نتایج به دست آمده گویای آن است که لمون ها دورگ حاصل از تلاقی میان لایم و بالنگ هستند. با توجه به نتایج به دست آمده از این بررسی، نژادگان G18 که به نظر می رسد جزو گروه لیموترش ها باشد با ضریب تشابه ۰/۶۵ نسبت به مکزین لایم از آن گروه جدا شده است و در گروه B قرار گرفته است. با توجه به مرفولوژی متفاوت میوه آن نسبت به دیگر لیموترش ها و ضریب تشابه ۰/۷۰ بین G18 و لمون لیسبون به نظر می رسد که از لمون ها منشأ گرفته باشد. نژادگان های G42 (نارنگی دنسی)، G41 (پرتقال محلی)، G40 (گریپ فروت دانکن)، G27 (دورگ شماره ۳ لیمو در پرتقال) و G34 (سلطان مرکبات) در گروه C قرار گرفتند. یافته های Golein et al. (2012) گروه بندی به دست آمده از این بررسی را تأیید می کند. بنابر نتایج Barre et al. (1982) Moor (2001) و Barre et al.

با توجه به شکل ۱، ۲۲ نژادگان با ضریب تشابه ۱، هم تراز با مکزیکن لایم قرار گرفتند. این موضوع بیانگر این مطلب است که این نشانگرها برای شناسایی و تمیز دادن این نژادگان ها مناسب نبودند و نژادگان های مورد بررسی از لحاظ نواحی افزونش شده توسط این نشانگرها، تفاوت چندانی نداشتند و باید از نشانگرهای دیگر و با شمار بیشتر استفاده می شد. Sheresta et al. (2012) در بررسی ۶۲ نژادگان مختلف لیموترش در کشور نپال از ۱۲ جفت نشانگر SSR استفاده کرد که با توجه به نتایج به دست آمده تنوع زیادی بین نژادگان های یادشده مشاهده کردند. اگر زیرگروه A1 به دو زیرگروه دیگر تقسیم شود، زیرگروه A11 شامل لیموترش هایی است که هم ردیف مکزیکن لایم قرار گرفته اند و همچنین نه نژادگان دیگر با ضریب تشابه بالای ۰/۷۹ نسبت به مکزین لایم در این زیرگروه قرار گرفته اند. با توجه به میزان قرابت زیاد آن ها با هم (بالای ۰/۷۹) احتمال دارد آن ها موتانت هایی باشند که در اثر جهش سوماتیکی به وجود آمده اند یا نژادگان های همانند نوسلار همدیگر هستند (Ollitrault et al., 2010). در زیرگروه A12 نژادگان های G36، G29 و G32 با ضریب تشابه به ترتیب ۰/۸، ۰/۷ و ۰/۷۹ از گروه لیموترش ها جدا شده اند و دو نژادگان G36 و G29 با ضریب تشابه ۰/۸۵ در کنار هم قرار گرفته اند. با توجه به اینکه نژادگان G29 لیموشیرین منطقه فورگ داراب و نژادگان G36 لیموشیرین مربوط به منطقه شمال کشور (ایستگاه کترا) است لذا این ضریب تشابه زیاد و هم گروهی آن ها مورد انتظار است. با توجه به اینکه نژادگان ناشناخته G32 با ضریب تشابه ۰/۷۹ در کنار نژادگان های G29 و G36 قرار گرفته احتمال می رود جزو لیموشیرین ها باشد. بنابر نظریه Nicolosi (2000) لیموشیرین، یک دورگ بین مکزیکن لایم و یک لمون شیرین یا یک بالنگ شیرین است. با توجه به ضریب تشابه لیموشیرین با مکزیکن لایم در این تحقیق ۰/۸۰ و همسانی آن با لمون ۰/۷۵ و میزان همانندی اش با بالنگ نیز ۰/۷۴ است. لذا نتایج به دست آمده از این تحقیق همانند نتایج Nicolosi است. زیرگروه A2 تنها شامل پرشین لایم است. با

بررسی قرابت ژنتیکی و تجزیه خوشه‌ای بر پایه نشانگرهای ISSR

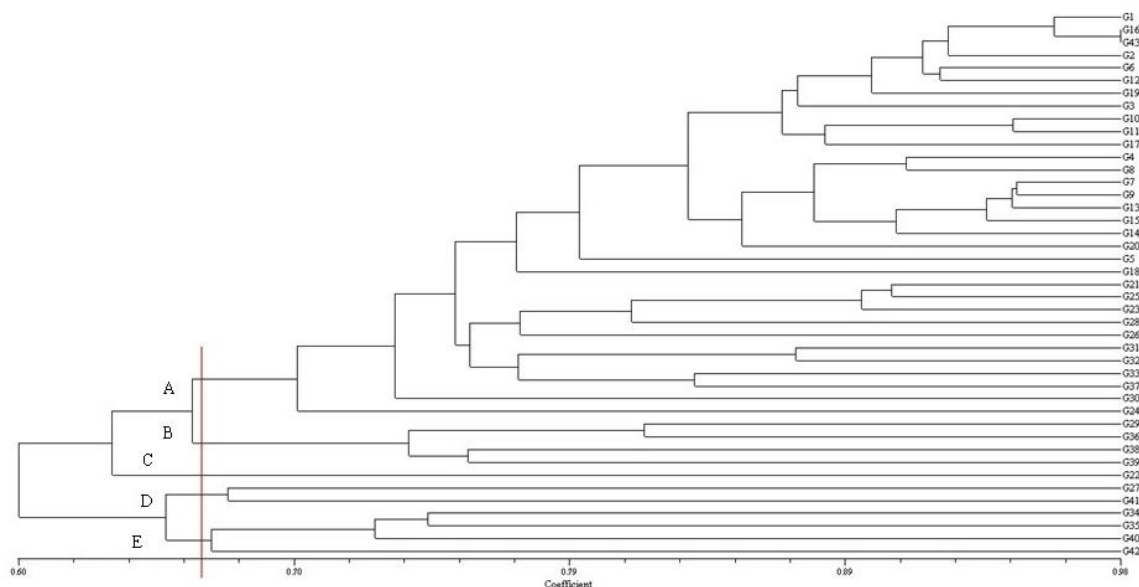
تجزیه خوشه‌ای ۴۳ نژادگان مورد بررسی بر پایه داده‌های حاصل از ISSR با روش UPGMA و ضریب تشابه تطابق ساده (SM) انجام شد (شکل ۲). بر پایه خوشه‌بندی، نژادگان‌های مورد بررسی در سطح تشابه ۰/۶۸، در پنج خوشه اصلی (A, B, C, D و E) قرار گرفتند. گروه A شامل ۳۲ عضو همچون نتایج حاصل از نشانگر SSR بزرگ‌ترین گروه را تشکیل می‌دهد که شامل نژادگان‌های مختلف لایم، رقم‌های لیموترش شامل مکزیکن لایم و پرشین لایم و همه لیموترش‌های منطقه داراب، جیرفت و میناب است. نژادگان G16 با ضریب تشابه ۰/۹۸ بیشترین تشابه را با مکزیکن لایم داشت. گروه A را می‌توان به دو زیرگروه A1 و A2 تقسیم کرد که زیرگروه A1 همان‌طور که پیشتر گفته شد شامل رقم‌های مختلف لایم و نژادگان‌های مورد بررسی است. زیرگروه A2 شامل لایم‌کوآت است که با ضریب تشابه ۰/۷ از گروه لیموترش‌ها جدا شده است.

Rhod (1976) گریپ‌فروت حاصل تلاقی پوملو (سلطان مرکبات) و پرتقال است و همچنین نتایج بررسی‌ها با استفاده از نشانگرهای RAPD و SCAR و SSR نشان داد، گریپ‌فروت از تلاقی میان پرتقال و پوملو ایجاد شده است (Gmitter *et al.*, 1992;) (Bakhshipoor *et al.*, 2013). نتایج به‌دست‌آمده در این بررسی نیز این فرضیه را تأیید می‌کند و گریپ‌فروت با ضریب تشابه ۰/۸۸ از پرتقال و ضریب تشابه ۰/۷۵ از پوملو جدا شده است. نژادگان G27 دورگ بین پرتقال و لیموترش است و با توجه به اینکه با پرتقال ضریب تشابه ۰/۷۵ دارد، شاید بتوان احتمال داد پرتقال، یکی از والدین آن باشد. نژادگان G26 (دورگ لیمو در بکرایی) تنها عضو از گروه E است. بنابر یافته‌های Golein *et al.* (2012) بکرایی حاصل تلاقی رافلمون و لیموشیرین است. میزان تشابه آن با لیموشیرین ۰/۶۳ و با مکزیکن لایم ۰/۵۱ است.



شکل ۱. نمودار خوشه‌ای ۴۳ نژادگان مرکبات با استفاده از نشانگر SSR به روش UPGMA. ویژگی‌های هر کدام از نژادگان‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

Figure 1. Dendrogram of 43 genotypes of citrus using SSR markers based on UPGMA. Name of the genotypes are shown in Table 1.



شکل ۲. نمودار خوشه‌ای ۴۳ نژادگان مرکبات با استفاده از نشانگر ISSR به روش UPGMA
Figure 2. Dendrogram of 43 genotypes of citrus using ISSR markers based on UPGMA

قرارگیری این دورگ در کنار پرتقال بر پایه سابقه ژنتیکی موجود کاملاً قابل حدس و پیشگویی بود. نژادگان‌های G34 (سلطان مرکبات)، G35 (نارنج)، G40 (گریپ‌فروت) و G42 (نارنگی) همگی با هم در گروه E قرار گرفته‌اند. یافته‌های (Jahangirzadeh *et al.*, 2013; Asadi *et al.*, 2015) این گروه‌بندی را تأیید می‌کند.

نتیجه‌گیری

از جمع‌بندی نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه و تحلیل داده‌های SSR و ISSR چنین استنباط می‌شود که از میان نشانگرهای SSR استفاده شده در این تحقیق TAA1 و TC26 و همچنین از میان نشانگرهای ISSR، آغازگرهای ISSR1، 810 و 844 برای بررسی‌های در آینده و بررسی تنوع بین نژادگان‌های ناشناخته و رقم‌های موجود، معرفی و پیشنهاد می‌شود. با توجه به اینکه نشانگرهای SSR در مسیر تولیدمثل جنسی و نوترکیبی ایجاد می‌شوند، بنابراین نیاز است در مواقعی که احتمال می‌رود افزونش از طریق غیرجنسی و یا در اثر جهش‌های کوچک ژنتیکی ایجاد شده باشد و یا احتمال تلاقی‌های طبیعی وجود داشته باشد، بهتر است از نشانگرهای

Morton (2004) در نتایج بررسی‌های خود بیان کرد، لایم‌کوات از تلاقی مکزیکن لایم و کامکوات توسط سوئینگل در سال ۱۹۰۹ به وجود آمده است. با توجه به این نظریه قرارگیری لایم‌کوات در یک گروه جداگانه طبیعی به‌نظر می‌رسد. گروه B شامل نژادگان‌های G29 (لیموشیرین فورگ)، G36 (لیموشیرین شمال)، G38 (لیمو لیسبون) و G39 (بالنگ) است. نژادگان شماره G29 و G36 با ضریب تشابه ۰/۸۱ در کنار هم قرار گرفتند. بنا بر یافته‌های Nicolosi *et al.* (2007) لیموشیرین از تلاقی بالنگ و لیمون‌ها به وجود آمده است که این گروه‌بندی در این بررسی را تأیید می‌کند. گروه C شامل نژادگان G22 است که یک دورگ است یک والد آن لیمو و والد دیگر آن نامشخص است. با توجه به شکل ظاهری و طعم اسیدی آن به نظر می‌رسد که جز گروه لایم‌ها باشد و با توجه به اینکه حفاصل بین گروه لیموها و پرتقال‌ها قرار گرفته است، احتمال دارد یکی از والدین آن پرتقال باشد. ضریب تشابه آن با مکزیکن و پرشین لایم ۰/۶۳ و با پرتقال ۰/۶۰ است. گروه D شامل نژادگان‌های G27 (دورگ لیمو در پرتقال) و G41 (پرتقال محلی) است. در این گروه، یک دورگ مصنوعی (حاصل تلاقی لیموترش و پرتقال) قرار دارد.

و داشتن ویژگی‌های کمی و کیفی مناسب معرفی کرد. همچنین با توجه به اینکه تاکنون هیچ گزارشی از بررسی تنوع ژنتیکی نژادگان‌های مختلف بدون علائم بیماری جاروک در کشور وجود ندارد، لذا نتایج این بررسی می‌تواند برای دیگر محققان در ارزیابی‌های تکمیلی و همچنین برای به‌نژادگران سودمند واقع شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از ریاست محترم پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری جناب آقای دکتر مرتضی گل‌محمدی که امکانات لازم برای این پژوهش را از طرح کلان جاروک مصوب معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری در اختیار نویسنده اول قرار دادند و همچنین از همکاری صمیمانه همه همکاران گروه ژنتیک و به‌نژادی پژوهشکده سپاسگزاری می‌شود.

بارز همچون ISSR و PCR-RFLP که در آن‌ها قدرت تشخیص جهش به فرایند میوز بستگی ندارد، استفاده شود. بر پایه دندروگرام حاصل از اطلاعات نشانگرهای ISSR نژادگان‌های مختلف لیموترش تمایز بسیار مناسب‌تری نسبت به خوشه‌بندی SSR داشتند. بنا بر نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از هر دو نشانگر، بیشتر لیموترش‌های منطقه جنوب کشور در گروه لایم قرار گرفته‌اند و از گروه لمون‌ها جدا شده‌اند. به‌نظر می‌رسد این نژادگان‌ها از جهش‌های بسیار کوچک گونه مکزیکن لایم منشأ گرفته‌اند. همچنین لایم‌ها در مناطق جنوبی کشور بیشتر با روش جنسی افزونش می‌شوند. لذا احتمال دگرگرفته‌اشانی و تولید نژادگان‌های دورگ در آن‌ها زیاد است. می‌توان در آینده با بررسی و ارزیابی بیشتر در مورد تحمل نژادگان‌ها به بیماری جاروک، بعضی از آن‌ها را در صورت متمایز بودن نسبت به مکزیکن لایم

REFERENCES

1. Abdollahi, B., Sadigh, P., Azizi, H., Piri, Y., Nasri, SH. & Arzhangh, S. (2015). Comparative assessment of IRAP, REMAP, ISSR and SSR markers for evaluation of genetic diversity of alfalfa. *Scientific Technology*, 17, 991-1010.
2. Asadi Abkenar, A., Mardi, M., Salehi Abarghoei, M. & Shafiee, M. (2012). Lime breeding to producing the varieties of disease resistant of Witches Broom, 3rd National conference on agriculture and food sciences, 16 Dec., Fasa University. (in Farsi)
3. Asadi Abkenar, A., Sharafi, A. A., Tarang, A. R., Seyghalani, R., Masaeli, M. & Rfia, P. (2013). Use of ISSR molecular markers for evaluating genetic variation in a number of northern citrus accessions, 8th symposium on biotechnology and 4th biosafety national conference, 15-17 Oct., Tehran University, pp. 853-857. (in Farsi)
4. Bakhshipoor, H., Mehrgan, A., Golein, B. & Saadatmand, S. (2013). Evaluation of Genetic diversity of unknown and commercial citrus varieties using SSR marker. *Journal of New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 4(16), 17-25. (in Farsi)
5. Barrect, H. C. & Rhods, A. M. (1976). A numerical taxonomic study of affinity relationship in cultivated Citrus and its closed relatives. *Systematic Botany*, 1, 105-136.
6. Bove, J. M., Danet, J. L., Bananej, K., Hassanzadeh, N., Taghizadeh, M., Salehi, M. & Garnier, M. (2000). Witches Broom Disease of Lime (WBDL) in Iran. *Fourteenth IOCV Conference, Insect-Transmitted Procarvates*, 207-212.
7. Davies, F. S. & Albrigo, L. G. (1994). Taxonomy cultivars and breeding. In: Davis, F. S., and Albrigo, L. G. (Eds) Citrus, Wallingford, CAB International. pp. 12-23.
8. Edwards, K., Johnstone, C. & Thompson, C. A. (1991). Simple rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19(6), 1349.
9. Fang, D. Q. & Roose, M. L. (1997). Identification of closely related Citrus cultivars with intersimple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 408-417.
10. Federici, C. T., Fang, D. Q., Scora, R. W. & Roose, M. L. (1998). Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis, *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 812-822.
11. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database. (2013). From <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>.
12. Moore, G. A. (2001). Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *TRENDS in Genetics*, 17(9), 536-540.

13. Gmitter, F. G., Grosser, J. W. & Moore, A. G. (1992). Hammerschlag, F. A. & Litz, R. E. (eds.). *Citrus*. In: *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. (pp. 335-369). CAB International, Wallingford, Oxon.
14. Golein, B. & Adouli, B. (2011). *Citrus (cultivation)*. Novin Pooya. (Pp 160). (in Farsi)
15. Golein, B., Bigonah, M., Azadvar, M. & Golmohammadi, M. (2012). Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (*Citrus* sp.) and some known Citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers, *Scientia Horticulturae*, 148, 147-153.
16. Jahangirzadeh, SH., Hamidoghli, Y., Golein, B. & Sabouri, A. (2015). *Investigation of genetic relationships and genome study of some Lime genotype by morphological and genetical markers*. Ph.D. Thesis. University of Guilan, Iran.
17. Mohammadi, S. A. (2006). Molecular analysis of genetic diversity of perspectives. In: *Proceeding of 9th Iranian Crop Sciences Congress. 27-29 August, Tehran*. (in Farsi)
18. Morton, J. F. (2004). *Fruits of warm climates*, Creative Resource Systems, pp: 2997.
19. Nematollahi, A. K. H., Golein, B. & Vahdati, K. (2013). Analysis of the genetic diversity in citrus (*Citrus* spp.) species using SSR markers. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 3(2), 39-47.
20. Nicolosi, E., Deng, Z., Gentile, A. & La Malfa, S. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular marker, *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 1155-1166.
21. Novelli, V. M., Cristofani, M., Souza, A. A., Marcos, A. & Machado, M. A. (2006). Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L., Osbeck). *Genetics and Molecular Biology*, 29(1), 90-96.
22. Ollitrault, F., Terol, J., Pina, J. A., Navarro, L., Talon, M. & Ollitrault, P. (2010). Development of SSR markers from Citrus clementina (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in Citrus. *American Journal of Botany*, 97(11), e124-e129.
23. Ovesna, J., Polakova, K. & Leisova, L. (2002). DNA Analyses and their Applications in Plant Breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 38(1), 29-40.
24. Rohlf, F. J. (1998). *NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.02*. Exeter Publications, Setauket, NY.
25. Roldain-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T. J., Coll, R., Van-Eijk, M. J. T. & De-Loose, M. (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties, 2 AFLP characterization. *Molecular Breeding*, 6, 593-602.
26. Salehi, M., Hasanzadeh, H., Faghihi, M. & Zakerifard, A. (2012). *Evaluation the effects of inter stock in citrus varieties on distribution of the causal agent of Witches Broom of Lime*, (Final Report). Iran Citrus Research Institute. 20. (in Farsi)
27. Shahsavari, A. R., Ezadpanah, K. A., Tafazoli, A. A. & Seyed Tababaie, B. A. (2004). Evaluation of genetic variability of limes and lemons in the Fars province by morphological traits and inter-simple sequence repeat (ISSR). *Journal of Horticultural Science and Technology*, 5 (4), 177-188. (in Farsi)
28. Shrestha, R. L., Dhakal, D. D., Gautum, D. M., Paudyal, K. P. & Shrestha, S. (2012). Genetic Diversity Assessment of Acid Lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) Landraces in Nepal, Using SSR Markers. *American Journal of Plant Sciences*, 3(12), 1674-168.
29. Tripolitsiotis, C., Nikoloudakis, N., Linos, A. & Hagidimitriou, M. (2013). Molecular characterization and analysis of the Greek citrus germplasm. *Notulae botanicae hortiagrobotanici*, 41 (2), 463-471.
30. Nicolosi, E., Deng, Z., Gentile, A. & La Malfa, S. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 1155-1166.
31. Scora, R. W. (1975). On the history and origin of Citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 369-375.
32. Zhang, D. & Mabberley, D. J. (2016). ????. *Citrus Linnaeus*, 2, 782- 1753.
33. Zhang, D. & Mabberley, D. J. (2008). *Citrus*. In *Flora of China*, Edited by Z. Y. Wu, P. H. Raven, and D. Y. Hong, pp. 90-96. Science Press-Missouri Botanical Garden Press, Beijing-St. Louis, China-USA.