



دانشگاه گوارش و تولید گیاهی

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و سوم، شماره سوم، ۱۳۹۵

<http://jopp.gau.ac.ir>

بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های لایم اسیدی (*Citrus aurantifolia* Swingle) ایران بر پایه نشانگر AFLP

*شاهین جهانگیرزاده خیای،^۱ یوسف حمید اوغلی،^۲ بهروز گل‌عین^۳ و عاطفه صبوری^۴

^۱ پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران،
^۲ گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی،
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران،
^۳ گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۳۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۱۶

چکیده

سابقه و هدف: مرکبات یکی از مهمترین محصولات مناطق نیمه گرمسیری دنیا هستند که لایم‌های اسیدی (*Citrus aurantifolia*) در آن گروه بزرگی را تشکیل می‌دهند. کشت و کار این گروه از لایم‌ها از دیر باز در مناطق جنوبی ایران متداول بوده و نقش مهمی در اقتصاد منطقه دارد. از آنجا که امروزه بسیاری از درختان لایم منطقه به دلایل مختلف در معرض نابودی قرار دارند، بنابراین داشتن اطلاعات درباره ژنتیک آن درختان برای طراحی برنامه‌های اصلاحی جهت دستیابی به گیاهان مناسب و با اهداف خاص کمک شایانی است. در این تحقیق تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های بومی لیموهای اسیدی مربوط به در جنوب ایران و مقایسه آن‌ها با شش رقم تجاری، بررسی شد.

مواد و روش‌ها: پس از نمونه‌برداری از برگ‌های جوان و کاملاً توسعه یافته، DNA ژنومی آن‌ها استخراج شد. از نشانگر AFLP با کاربرد چهار ترکیب پرایمری حاصل از آغازگرهای *EcoRI* و *MseI* شامل *ECGC/MAGA*، *ECCA/MAGT*، *ECCA/MAGA* و *ECGC/MAGA* برای بررسی روابط ژنتیکی ۳۰ ژنوتیپ بومی از سه منطقه داراب (فارس)، منوجان (کرمان) و میناب (هرمزگان) و شش رقم وارداتی استفاده شد. داده‌های حاصل توسط ضریب شباهت جاکارد و الگوریتم UPGMA مورد تجزیه قرار گرفتند.

*مسئول مکاتبه: shjahangirzadeh@yahoo.com

یافته‌ها: در مجموع این چهار ترکیب، ۱۲۶ باند قابل نمره‌دهی تولید کردند که ۷۰/۶۳ درصد حالت چندشکلی داشتند. دامنه تعداد نوارهای تکثیر شده برای هر ترکیب پرایمری در محدوده ۲۶ الی ۳۷ بود (متوسط ۲۲ نوار به ازای هر ترکیب). حداکثر تعداد نوار مشاهده شده چند شکل در ترکیب E_{CCA}/M_{AGT} به تعداد ۲۷ نوار بود. میزان محتوای اطلاعات چند شکلی محاسبه شده برای تمام ترکیب‌ها از ۰/۴ تا ۰/۵ با متوسط ۰/۴۸ بود. دامنه تشابه به دست آمده توسط ضریب تشابه جاکارد بین ۰/۲۴ تا ۰/۹۶ بود که کمترین میزان بین لیمو شیرین (C. *limetta*) و ژنوتیپ D8 از داراب و حداکثر بین دو ژنوتیپ منطقه میناب (M4-2 و M4-2) مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای، نمونه‌ها را در چهار گروه قرار داد که این گروه‌بندی با موقعیت جغرافیایی تهیه نمونه‌ها مطابقت قابل توجهی نداشت. به عبارت دیگر نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف از یکدیگر تفکیک نشدند اما نمونه‌های منطقه میناب شباهت ژنتیکی بیشتری با یکدیگر در مقایسه با نمونه‌های دو منطقه منوجان و داراب نشان دادند که دلیل آن می‌تواند محدود بودن تنوع کاشت مرکبات در منطقه باشد.

نتیجه‌گیری: درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات چندشکلی قابل توجه حاصل از ترکیبات آغازگری به کار رفته در این پژوهش بیانگر توانمندی این نشانگرها در تفکیک ژنوتیپ‌های مختلف لیمو اسیدی است. با استفاده از این نشانگرها تنوع ژنتیکی چشم‌گیری بین ژنوتیپ‌های لیمو اسیدی مشاهده شد اما این تنوع به گونه‌ای نبود که قادر باشد ژنوتیپ‌های مناطق مختلف را از هم منفک نماید. به نظر می‌رسد شاید با افزایش تعداد ترکیبات آغازگری و استفاده از سایر نشانگرها همانند SSR، SNP و غیره بتوان به این تفکیک دست یافت. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که ژنوتیپ‌های لیمو اسیدی ایران به دلیل آنکه اکثراً به صورت جنسی تکثیر شده‌اند دارای تنوع ژنتیکی بالایی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: مرکبات، ترکیب پرایمری، محتوای اطلاعات چند شکلی، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی

مقدمه

جنس مرکبات که شامل تعدادی از مهمترین میوه‌های دنیا است به خانواده Rutaceae تعلق دارد. این خانواده دارای ۱۴۰ جنس و ۱۳۰۰ گونه است. مرکبات دارای سابقه طولانی کاشت بوده و در بیش از ۱۰۰ کشور کشت می‌گردد (۲۵). در ایران مرکبات نقش تجاری مهمی در صنعت باغبانی، خصوصاً در نواحی جنوبی به علت شرایط مناسب برای تولید لایم‌های اسیدی (*C. aurantifolia* Swingle) ایفا می‌کنند.

یکی از مهمترین مشکلات رخ داده برای لیموهای اسیدی به‌ویژه در کشورهای حاشیه خلیج فارس و دریای عمان، بیماری جاروی جادوگر یا جاروک^۱ است. در ایران جاروک در اواخر دهه ۶۰ هجری شمسی (سال ۱۹۹۰ میلادی) گزارش شده است (۴). گسترش وسیع بیماری جاروک در جنوب ایران و کشورهای همسایه، سوالاتی در رابطه با تنوع ژنتیکی لیموهای اسیدی این کشورها ایجاد کرده است. شیوع بیماری در قسمت‌های مختلف جهان و میزبانان متفاوت به عوامل متفاوتی مانند سطح پایین تنوع ژنتیکی در محصولات که تحت تأثیر قرار می‌گیرند، مرتبط است (۱۲) که این موضوع محصولات را در برابر صدمه دیدن از بیماری‌ها حساس می‌سازد.

تقریباً تنوع ژنتیکی تمام ارقام و جنس‌های وابسته مرکبات مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱، ۲، ۳، ۵، ۷، ۸، ۱۱، ۱۶ و ۱۷) اما پژوهش‌های مربوط به تعیین روابط ژنتیکی لیموهای اسیدی محدود بوده است (۳، ۱۵، ۲۰ و ۲۴). السعدی و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۳۶ ژنوتیپ لایم عمان همراه با دو نمونه از برزیل با استفاده از روش AFLP با چهار ترکیب پرایمری، گزارش نمودند که تنوع ناچیزی مابین نمونه‌های عمان وجود دارد و میزان تشابه ۰/۰۸ الی ۰/۲۲ را برای این نمونه‌ها محاسبه کردند اما مابین نمونه‌های عمان و دو نمونه برزیل تنوع بسیار بالایی دیده شد که دلیل آن را جدا شدن این دو جمعیت در زمان‌های بسیار طولانی گذشته بیان کردند (۳). شرستا و همکاران (۲۰۱۲) اقدام به بررسی تنوع ۶۲ ژنوتیپ لایم اسیدی نیپال با روش SSR. نمودند و متوسط شباهت ۰/۷۷ را به دست آوردند. نمونه‌های مورد بررسی آن‌ها در پنج گروه قرار گرفتند و میزان تنوع بالایی را در بین این نمونه‌ها گزارش کردند (۲۴). الانباری و همکاران (۲۰۱۴) در عراق اقدام به بررسی تنوع لایم‌های اسیدی توسط ۲۰ پرایمر RAPD نمودند که در نتیجه گزارش کردند که نمونه‌ها در دو گروه اصلی که

1- Witches' broom disease of lime (WBDL)

گروه اول شامل بالنگ و هیبریدهای آن (لایم و لمون) و گروه دوم که خود به سه زیر گروه تقسیم شد که شامل زیر گروه اول نارنج، پرتقال و گریپ فروت؛ زیر گروه دوم نارنگی و زیر گروه سوم سلطان مرکبات بود (۲). مواندکاری و همکاران (۲۰۱۴) تعداد ۶۰ نمونه لایم اسیدی نپال را توسط نه پرایمر RAPD بررسی کردند و میزان شباهت را در دامنه ۰/۳۸ الی ۰/۹۸ به دست آوردند و بیان نمودند که تنوع بالایی بین این نمونه‌ها وجود دارد (۱۴).

نشانگرهای گوناگونی از جمله آیزوزایم‌ها، RFLP، ISSR، RAPD، SSR و AFLP برای محاسبه تنوع ژنتیکی جنس مرکبات و جنس‌های وابسته به کار رفته‌اند (۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۶). اگر چه روش AFLP تا سال ۱۳۸۵ شمسی (۲۰۰۷ میلادی) برای تجزیه و بررسی فیلوژنی در مرکبات استفاده نشده بود (۱۸)، اما این روش نشان داده است که می‌تواند به عنوان یک تکنیک قدرتمند برای شناسایی و تخمین تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنی در جمعیت‌های مرکبات باشد (۳، ۱۵، ۱۸ و ۲۰).

مطالعه پیش‌رو برای شناسایی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های بومی لیموهای اسیدی صورت گرفته است. اهداف اختصاصی که در این مطالعه پیگیری شدند (الف) شناسایی تنوع ژنتیکی بین برخی ژنوتیپ‌های بومی لیموهای اسیدی در ایران، (ب) شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی لیموهای اسیدی نواحی متفاوت تولید این محصول و (ج) شناسایی روابط لیموهای اسیدی ایران و برخی از ارقام لیموهای اسیدی تجاری، بودند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA: برگ‌های جوان بالغ از ۳۰ ژنوتیپ لیموهای اسیدی مناطق متفاوت جنوب و مرکز ایران (میناب، منوجان و داراب) و شش رقم مکزیکن لایم (*C. auratifolia*)، پرشین لایم (*Citrus × latifolia*)، لیمو شیرین (*C. limetta*)، بالنگ (*C. medica*)، لیمو لیسبون (*C. limon*) و راف لمون (*Citrus jambhiri*) از باغ تحقیقاتی موسسه مرکبات ایران در رامسر تهیه شده و تا زمان استفاده در فریز ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کل آزمایش‌ها در موسسه تحقیقات مرکبات کشور صورت پذیرفت. جدول ۱ اطلاعات نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد.

جدول ۱- نمونه‌های لیمو اسیدی به کار رفته در بررسی AFLP.

Table 1. Acid lime samples used in AFLP analysis.

نام علمی	محل جمع‌آوری	کد نمونه	نام علمی	محل جمع‌آوری	کد نمونه
Scientific name	Location	Plant code	Scientific name	Location	Plant code
<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M1-5	<i>Citrus</i> sp.	داراب Darab	D1
<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M1-7	<i>Citrus</i> sp.	داراب Darab	D2
<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M1-10	<i>Citrus</i> sp.	داراب Darab	D3
<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M1-13	<i>Citrus</i> sp.	داراب Darab	D4
<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M1-14	<i>Citrus</i> sp.	داراب Darab	D5
<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M2-2	<i>Citrus</i> sp.	داراب Darab	D6
<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M2-8	<i>Citrus</i> sp.	داراب Darab	D7
<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M2-10	<i>Citrus</i> sp.	داراب Darab	D8
<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M4-2	<i>Citrus</i> sp.	داراب Darab	D9
<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M4-5	<i>Citrus</i> sp.	منوجان Manojan	A5
<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M5-2	<i>Citrus</i> sp.	منوجان Manojan	A6
<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M1-5	<i>Citrus</i> sp.	منوجان Manojan	A7
<i>Citrus aurantifolia</i>	رامسر Ramsar	S37	<i>Citrus</i> sp.	منوجان Manojan	A8
<i>Citrus × limon</i>	رامسر Ramsar	S46	<i>Citrus</i> sp.	منوجان Manojan	A9
<i>Citrus jambhiri</i>	رامسر Ramsar	S49	<i>Citrus</i> sp.	منوجان Manojan	A10
<i>Citrus × latifolia</i>	رامسر Ramsar	S51	<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M1-1
<i>C. medica</i>	رامسر Ramsar	S54	<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M1-3
<i>Citrus limetta</i>	رامسر Ramsar	S55	<i>Citrus</i> sp.	میناب Minab	M1-4

استخراج DNA ژنومی بر اساس دستورالعمل معرفی شده توسط شرکت Diversity Arrays Technology Pty Ltd کشور استرالیا صورت گرفت (۹).

آنالیز AFLP: روش AFLP بر اساس دستورالعمل وس و همکاران (۱۹۹۵) با کمی تغییرات صورت پذیرفت (۲۷). ابتدا DNA ژنومی استخراج شده به مدت ۱۸۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با کاربرد آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *MseI* برش خوردند. سپس سازگار سازهای *EcoRI* و *MseI* به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یک ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به انتهای DNA برش یافته متصل شدند. در مرحله بعد نمونه‌های حاصل از مرحله قبل به نسبت ۵:۱ رقیق شدند و با آغازگرهای *EcoRI* و *MseI* واجد یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳' با توالی‌های زیر مورد تکثیر پیش انتخابی قرار گرفتند.

آغازگر *EcoRI*-۳'-GACTGCGTACCAATTCC-۵' و *MseI*-۳'-GATGAGTCCTGAGTAAA-۵' آغازگر ۵' چرخه‌های حرارتی در این مرحله شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، تکرار برنامه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه به تعداد ۳۰ چرخه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه بود. ترکیب مواد نیز به شرح، محصول هضم و اتصال رقیق شده ۶ μl ، از هر پرایمر ۰/۵mM، بافر PCR (10X) حاوی MgCl_2 به میزان ۲/۵ μl ، از هر dNTP به میزان ۲۰۰ μM و یک واحد آنزیم *Taq DNA* پلی‌مراز در حجم ۲۵ μl بود. بعد از تکثیر انتخابی، محصول آن مجدداً به نسبت ۵:۱ رقیق گردید. جهت انتخاب بهترین ترکیب‌های ممکن تعداد شش نمونه تصادفی از بین نمونه‌ها انتخاب و توسط نه ترکیب پرایمری مختلف که دارای دو نوکلئوتید انتخابی علاوه بر تک نوکلئوتید مرحله پیش تکثیر در انتهای ۳' بودند مورد تکثیر انتخابی قرار گرفتند. از آنجایی که چهار ترکیب *ECGC/MAGA*، *ECCA/MAGA*، *ECCA/MAGT* و *ECGC/MAAG* بیشترین تعداد باند پلی‌مورف را تولید نمودند بنابراین برای ادامه بررسی از آن‌ها استفاده شد. ترکیب مواد در مرحله تکثیر انتخابی شامل محصول تکثیر اولیه رقیق شده ۶ μl ، از هر پرایمر انتخابی ۰/۵ mM، بافر PCR (10X) حاوی MgCl_2 به میزان ۲/۵ μl ، از هر dNTP به میزان ۲۰۰ μM و یک واحد آنزیم *Taq DNA* پلی‌مراز در حجم ۲۵ μl بود. تکثیر انتخابی در شرایط دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ده چرخه با برنامه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه که در مرحله اتصال پرایمرها در هر چرخه دما یک درجه کاهش می‌یابد تا به دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد برسد، در ادامه ۲۵ تکرار برنامه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه،

۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه صورت گرفت. محصول این تکنیک انتخابی برای بررسی در ژل پلی‌اکریل آمید واسرشت‌ساز ۶ درصد تفکیک و با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد. امتیازدهی باندها به صورت صفر برای عدم حضور و یک برای حضور نوار باندها در دامنه ۵۰-۱۰۰۰bp انجام گرفت. جدول ۲ اطلاعات ترکیب‌های پرایمری به کار رفته را بیان می‌دارد.

تجزیه آماری: فقط نوارهای تشکیل شده کاملاً مشخص و مطمئن امتیازدهی شدند. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک و انتقال آن‌ها به نرم‌افزار NTSYS ver 2.1e ماتریس ضریب تشابه جاکارد تشکیل گردید و تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها با الگوریتم UPGMA صورت گرفت (۲۱). محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بر اساس رابطه $PIC_i = 2f_i(1-f_i)$ که برای نشانگرهای غالب توصیه شده است، محاسبه شد. در این رابطه f_i فراوانی قطعه نشانگر نام هنگام وجود و $(1-f_i)$ فراوانی قطعه نشانگر نام در حالت عدم وجود نوار است (۲۲).

جدول ۲- ترکیب‌های پرایمری AFLP، به کار رفته در بررسی نوع ژنتیکی ۳۶ نمونه مرکبات و اطلاعات آماری آن‌ها.

Table 2. AFLP primer combinations used in genetic diversity experiments with 36 citrus samples.

محتوای اطلاعات چندشکلی	درصد چندشکلی	تعداد قطعات چندشکلی	تعداد کل قطعات	ترکیب پرایمر	کد ترکیب
Polymorphic Information Content (PIC)	Polymorphic percent	Number of polymorphic fragment	Total Number of fragments	Primer Combination	Combination code
0.48	75	24	32	M _{AGA} -E _{CGC}	C1
0.40	65.38	17	26	E _{CCA} -M _{AGA}	C2
0.48	72.97	27	37	E _{CCA} -M _{AGT}	C3
0.50	64.52	20	31	E _{CGC} -M _{AAG}	C4
0.48	69.84	88	126	-	Total

نتایج و بحث

در این تحقیق در ابتدا تعداد نه ترکیب متفاوت پرایمری بر روی شش نمونه تصادفی انتخاب شده مورد بررسی قرار گرفتند که چهار ترکیب پرایمر E_{CCA}/M_{AGA}، E_{CGC}/M_{AGA}،

1- Polymorphic Information Content (PIC)

انتخاب و برای بررسی ۳۶ نمونه لیموی اسیدی مورد استفاده قرار گرفتند اسامی ترکیب‌ها، تعداد کل باندها، تعداد باندهای چندشکل، درصد چند شکلی و محتوای اطلاعات چند شکلی برای هر ترکیب پرایمیری در جدول ۲ ارائه شده است. در مجموع ۱۲۶ ناحیه ژنومی تکثیر شدند که ۸۸ نوار (۶۹/۸۴ درصد) چند شکلی داشتند. تعداد نوار برای هر ترکیب پرایمیری از ۲۶ تا ۳۷ بود که متوسط نوار چند شکل تکثیر شده به ازای هر ترکیب پرایمر معادل ۲۲ بود. حداکثر تعداد نوار در ترکیب C3 با ۳۷ نوار و کمترین آن مربوط به ترکیب C2 با ۲۶ نوار بود. حداکثر درصد چندشکلی نیز در ترکیب C1 با ۷۵ درصد و حداقل آن در ترکیب C4 با ۶۴/۵۲ درصد مشاهده شد. درصد چندشکلی محاسبه شده در مقایسه با بسیاری از پژوهش‌های صورت گرفته روی ژنوتیپ‌های سایر گیاهان متفاوت (۱۰ و ۱۳)، این مقادیر پایین‌تر می‌باشند؛ اما در مقایسه با مطالعات صورت گرفته در مرکبات این مقدار چندشکلی به نسبت بالاتر است. ناوارنات و ناوارنات (۲۰۱۱) درصد چندشکلی ۴۵/۰۸ را برای بررسی ارقام سلطان مرکبات (*Citrus maxima* (Burm.) Merrill) که گونه مشابه با گونه به‌کار رفته در پژوهش حاضر بود، گزارش نمودند (۱۵). در مطالعه پانگ و همکاران (۲۰۰۷) با کاربرد شش ترکیب پرایمیری در بین جنس‌های مختلف مرکبات به میزان ۹۵/۳۲ درصد چندشکلی حاصل شد (۱۸).

دقت در میزان محتوای چند شکلی حاصل شده در مطالعه حاضر، بیانگر این حقیقت است که کارایی قابل توجه ترکیب‌های پرایمیری به‌کار رفته با توجه به میزان درصد چند شکلی و محتوای اطلاعات چند شکلی، می‌تواند برای بررسی تنوع ژنتیکی بین نمونه‌ها مناسب باشد.

در ماتریس تشابه به‌دست آمده بر اساس ضریب جاکارد حداقل میزان تشابه مابین رقم لیمو شیرین (S55) و ژنوتیپ D8 از منطقه داراب به میزان ۰/۲۴ و حداکثر تشابه نیز مابین دو ژنوتیپ M4-2 و M4-5 که از روستای سندرک منطقه میناب جمع‌آوری شده بودند به میزان ۰/۹۶ به‌دست آمد. نتایج مشابهی در رابطه با حداکثر و حداقل میزان تشابه در رابطه با لایم توسط شرس‌تا و همکاران (۲۰۱۲) و موانکارمی و همکاران (۲۰۱۴) گزارش شده است (۱۴ و ۲۴) اما السعدی و همکاران (۲۰۱۲) عکس این نتایج را گزارش نموده‌اند (۳) که دلیل آن تکثیر غیربذری در کشور عمان است. جدول ۳ ماتریس تشابه ضریب جاکارد محاسبه شده را با کاربرد چهار ترکیب پرایمیری نشان می‌دهد.

جدول ۳. ماتریس ضریب تشابه جاکارد برای ۳۶ نمونه لیموی اسپیدی.

Table 3. Jaccard similarity coefficients matrix among 36 acid lime samples

	D1	D2	D3	D4	D5	D7	D8	D9	D11	A5	A6	A7	A8	A9	A10	M1-1	M1-3	M1-4	M1-5	M1-7									
D1	1.00																												
D2	0.81	1.00																											
D3	0.72	0.84	1.00																										
D4	0.69	0.73	0.70	1.00																									
D5	0.70	0.74	0.71	0.59	1.00																								
D7	0.67	0.78	0.75	0.68	0.63	1.00																							
D8	0.53	0.58	0.55	0.47	0.44	0.59	1.00																						
D9	0.61	0.61	0.59	0.49	0.49	0.58	0.76	1.00																					
D11	0.49	0.51	0.47	0.44	0.39	0.54	0.57	0.60	1.00																				
A5	0.66	0.73	0.67	0.56	0.67	0.60	0.54	0.67	0.45	1.00																			
A6	0.67	0.62	0.68	0.56	0.68	0.60	0.38	0.47	0.42	0.61	1.00																		
A7	0.77	0.69	0.67	0.64	0.70	0.64	0.53	0.55	0.49	0.60	0.72	1.00																	
A8	0.56	0.56	0.57	0.52	0.50	0.53	0.52	0.43	0.37	0.46	0.52	0.65	1.00																
A9	0.60	0.63	0.67	0.59	0.57	0.58	0.45	0.42	0.37	0.51	0.56	0.66	0.73	1.00															
A10	0.82	0.85	0.81	0.74	0.72	0.79	0.55	0.57	0.51	0.68	0.74	0.82	0.71	0.75	1.00														
M1-1	0.58	0.55	0.50	0.52	0.47	0.44	0.55	0.45	0.39	0.43	0.42	0.58	0.74	0.64	0.60	1.00													
M1-3	0.75	0.76	0.73	0.73	0.65	0.70	0.49	0.52	0.48	0.61	0.73	0.80	0.63	0.67	0.89	0.59	1.00												
M1-4	0.79	0.88	0.78	0.77	0.69	0.75	0.57	0.60	0.53	0.70	0.66	0.73	0.60	0.65	0.89	0.62	0.87	1.00											
M1-5	0.64	0.64	0.59	0.60	0.55	0.53	0.59	0.49	0.43	0.52	0.52	0.64	0.77	0.61	0.72	0.80	0.70	0.75	1.00										
M1-7	0.74	0.81	0.79	0.77	0.70	0.76	0.53	0.55	0.49	0.66	0.72	0.80	0.62	0.66	0.89	0.58	0.87	0.92	0.70	1.00									
M1-10	0.75	0.76	0.73	0.71	0.71	0.49	0.52	0.48	0.45	0.63	0.70	0.77	0.69	0.67	0.89	0.59	0.88	0.86	0.74	0.93	1.00								
M1-13	0.74	0.75	0.70	0.70	0.73	0.67	0.48	0.51	0.45	0.63	0.70	0.77	0.69	0.67	0.86	0.59	0.84	0.86	0.73	0.89	0.89	1.00							
M1-14	0.70	0.71	0.69	0.69	0.67	0.66	0.45	0.48	0.42	0.62	0.74	0.76	0.59	0.66	0.84	0.55	0.83	0.81	0.69	0.88	0.88	0.87	1.00						
M2-2	0.75	0.73	0.71	0.68	0.71	0.66	0.50	0.52	0.47	0.65	0.76	0.78	0.58	0.62	0.83	0.60	0.82	0.83	0.71	0.87	0.87	0.87	0.87	1.00					
M2-8	0.76	0.77	0.75	0.69	0.72	0.72	0.50	0.53	0.47	0.68	0.79	0.82	0.64	0.68	0.81	0.55	0.83	0.81	0.69	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	1.00				
M2-10	0.82	0.74	0.72	0.69	0.72	0.72	0.53	0.55	0.49	0.60	0.71	0.85	0.61	0.66	0.88	0.60	0.80	0.78	0.66	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	1.00				
M4-2	0.80	0.75	0.72	0.67	0.70	0.70	0.53	0.55	0.49	0.60	0.75	0.86	0.62	0.66	0.89	0.61	0.81	0.79	0.64	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	1.00			
M4-5	0.80	0.75	0.73	0.67	0.70	0.70	0.54	0.56	0.50	0.61	0.75	0.86	0.63	0.67	0.89	0.59	0.81	0.79	0.67	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	1.00			
M5-1	0.67	0.56	0.52	0.51	0.56	0.48	0.63	0.53	0.46	0.50	0.53	0.67	0.53	0.50	0.64	0.65	0.57	0.60	0.76	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	1.00			
M5-2	0.86	0.76	0.73	0.70	0.73	0.74	0.54	0.57	0.51	0.61	0.75	0.90	0.63	0.67	0.89	0.59	0.81	0.80	0.65	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	1.00		
S37	0.62	0.62	0.62	0.60	0.56	0.59	0.36	0.41	0.38	0.58	0.60	0.59	0.44	0.53	0.66	0.39	0.62	0.63	0.45	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	1.00		
S46	0.53	0.55	0.56	0.52	0.55	0.56	0.40	0.41	0.36	0.57	0.50	0.56	0.47	0.49	0.63	0.39	0.59	0.60	0.47	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	1.00		
S49	0.57	0.57	0.58	0.54	0.47	0.63	0.33	0.36	0.42	0.51	0.61	0.55	0.41	0.48	0.64	0.36	0.60	0.61	0.42	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	1.00		
S51	0.48	0.56	0.54	0.45	0.45	0.59	0.35	0.38	0.38	0.46	0.45	0.48	0.36	0.39	0.58	0.29	0.53	0.54	0.37	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	1.00	
S54	0.48	0.47	0.50	0.45	0.42	0.46	0.29	0.32	0.34	0.46	0.49	0.48	0.43	0.40	0.54	0.35	0.53	0.51	0.41	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	1.00	
S55	0.49	0.48	0.47	0.40	0.44	0.41	0.24	0.27	0.30	0.38	0.51	0.49	0.43	0.56	0.53	0.39	0.54	0.48	0.38	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	1.00

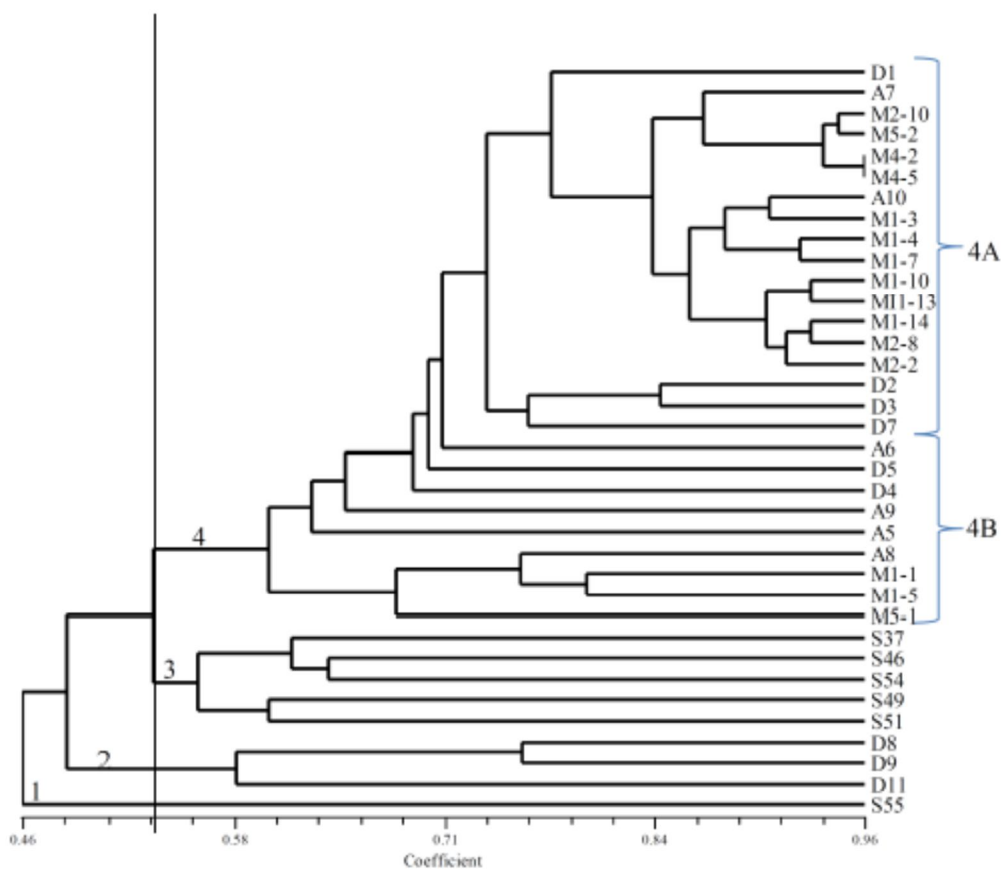
Table 3.

	M1-10	M1-13	M1-14	M2-2	M2-8	M2-10	M4-2	M4-5	M5-1	M5-2	S37	S46	S49	S51	S54	S55
M1-10	1.00															
M1-13	0.93	1.00														
M1-14	0.92	0.91	1.00													
M2-2	0.90	0.90	0.92	1.00												
M2-8	0.92	0.88	0.93	0.92	1.00											
M2-10	0.88	0.85	0.84	0.85	0.90	1.00										
M4-2	0.86	0.83	0.82	0.84	0.88	0.95	1.00									
M4-5	0.90	0.86	0.85	0.87	0.91	0.95	0.96	1.00								
M5-1	0.66	0.65	0.61	0.66	0.67	0.72	0.67	0.71	1.00							
M5-2	0.87	0.84	0.82	0.84	0.88	0.95	0.93	0.93	0.74	1.00						
S37	0.63	0.62	0.64	0.61	0.66	0.64	0.62	0.62	0.45	0.65	1.00					
S46	0.60	0.62	0.61	0.58	0.61	0.61	0.58	0.59	0.51	0.62	0.62	1.00				
S49	0.58	0.55	0.59	0.59	0.65	0.62	0.60	0.58	0.41	0.63	0.61	0.54	1.00			
S51	0.52	0.49	0.53	0.51	0.56	0.51	0.51	0.52	0.34	0.52	0.57	0.53	0.60	1.00		
S54	0.52	0.48	0.52	0.50	0.55	0.52	0.50	0.51	0.42	0.54	0.61	0.64	0.54	0.58	1.00	
S55	0.53	0.52	0.52	0.49	0.52	0.52	0.54	0.52	0.33	0.51	0.55	0.41	0.43	0.40	0.50	1.00

در ماتریس تشابه به‌دست آمده از ضریب جاکارد، سه جمعیت مورد مطالعه در مقایسه با چهار رقم استاندارد لیمو (مکزیکن لایم، پرشین لایم، رافل‌مون و لیمو لیسبون) مشاهده شد که میزان تشابه چهار رقم اصلی لیمو که در این مناطق کشت می‌گردند تفاوت قابل توجهی نداشت (متوسط تشابه ۰/۵۷ برای مکزیکن لایم، ۰/۵۴ برای هر دو لمون و ۰/۴۸ برای پرشین لایم). برای اثبات این موضوع که بتوان این نمونه‌ها را متعلق به لایم یا لمون دانست به پژوهش‌های بیشتری نیاز است.

برای تجزیه خوشه‌ای ابتدا ضرایب تشابه متفاوت شامل جاکارد، دایس و تشابه ساده برای تخمین میزان تشابه و از الگوریتم UPGMA نیز برای گروه‌بندی استفاده شد. برای تشخیص بهترین روش، محاسبه ضریب کوفتیک صورت پذیرفت که ضریب جاکارد با داشتن میزان ۰/۹۲، بالاترین میزان را نشان داد. با توجه به این میزان بالای ضریب کوفتیک با قاطعیت بالاتری می‌توان بیان نمود که روش AFLP می‌تواند با کارایی بالایی برای انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌های لیموی اسیدی به‌کار رود. این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط ناوارنات و ناوارنات (۲۰۱۱) همخوانی دارد (۱۵). در تجزیه خوشه‌ای به‌طور کلی ضریب کوفتیک بالا، دلیل بر کارایی نمودار حاصل است. ضریب کوفتیک می‌تواند در دامنه $0.1 < I < 0.9$ تغییر کند. ضریب بالاتر از ۰/۹ نشانه کارایی خیلی خوب، $0.7 < I < 0.9$ کارایی خوب و

کمتر از ۰/۷ کارایی ضعیف است (۱۰) دامنه تشابه مشاهده شده روی دندروگرام در محدوده ۰/۴۶ تا ۰/۹۶ بود که دو ژنوتیپ M4-2 و M4-5 حداکثر تشابه را نشان دادند. در بررسی دندروگرام حاصل، چهار گروه شاخص قابل تشخیص بود. شکل ۱ دندروگرام حاصل از ماتریس تشابه به روش الگوریتم UPGMA را نشان می‌دهد.



شکل ۱- نمودار ۳۶ ژنوتیپ‌های لیمو اسیدی با استفاده از نشانگرهای AFLP. به روش UPGMA.
Figure 1. Dendrogram of 36 acid lime genotypes using AFLP markers based on UPGMA.

در سطح تشابه ۵۴ درصد نمونه‌ها در چهار گروه قرار گرفتند. در سطح تشابه ۴۶ درصد دسته اول از سایر نمونه‌ها جدا شدند، این دسته تنها نمونه لیمو شیرین (S55) را در برداشت. جدا شدن لیمو

شیرین از سایر لیموهای اسیدی در گزارشات العنباری و همکاران (۲۰۱۴) با کاربرد نشانگر ریپید مشاهده شده است (۲).

دسته دوم در سطح تشابه ۰/۴۸/۸ تشکیل شد. این دسته شامل سه ژنوتیپ منطقه داراب (D9, D8 و D11) بود. شهسوار و همکاران (۲۰۰۷) نیز در بررسی ژنوتیپ D8 با نام محلی لیمو خیاری جدا شدن این نمونه از سایر نمونه‌های لیموی مورد بررسی را گزارش نمودند (۲۳).

دسته سوم نیز در سطح تشابه ۵۳/۵ از سایر نمونه‌های باقی مانده قابل تفکیک شد. نکته مهم در این گروه قرارگیری تمام نمونه‌های شاهد مورد بررسی (مکزیکن لایم، پرشین لایم، لیمو لیسبون، رافلمون و بالنگ) که وارداتی می‌باشند، بود. این نوع تفکیک در مورد نمونه‌های مورد بررسی محتمل بود زیرا که اکثر لیموها در این مناطق به وسیله بذر تکثیر می‌شوند، بنابراین میزان تفرق بالایی قابل رخ داد است. جدا شدن لمون‌ها به دلیل فراوانی کمتر آن‌ها در منطقه و در نتیجه امکان گرده افشانی کمتر و پرشین لایم نیز به دلیل آن که هنوز به صورت تجاری مورد کشت وسیع قرار نگرفته است و جریان ژنی از آن‌ها به سمت ژرم‌پلاسم منطقه رخ نداده است، کاملاً منطقی به نظر می‌رسد. در ارتباط با بالنگ نیز مطالعات گذشته بیان داشته‌اند که تشابه بالایی بین بالنگ و لمون‌ها وجود دارد (۲، ۲۳). در ارتباط با این چهار نمونه (مکزیکن لایم، پرشین لایم، لیمو لیسبون، رافلمون و بالنگ) العنباری و همکاران (۲۰۱۴) نیز در تجزیه خوشه‌ای مطالعه خود تفکیک مشابهی را به دست آوردند (۲). در ارتباط با مکزیکن لایم، اگرچه ممکن است قرارگیری آن در این گروه قرابت چندانی با سایر نمونه‌ها در این گروه نداشته باشد اما عوامل متعددی از جمله گرده افشانی آزاد، امکان رخ دادن جهش جوانه، آپومکس و پلی‌پلوئیدی در مرکبات (۱۱) می‌توانند توجیه‌کننده مناسبی برای این نوع تفکیک باشد.

گروه چهارم که بزرگترین گروه نیز می‌باشد حاوی ۲۷ ژنوتیپ بود. این گروه می‌تواند خود به دو دسته 4A و 4B تقسیم شود. زیر دسته 4A شامل اکثر نمونه‌های مناطق داراب و منوجان به‌علاوه سه نمونه میناب بود. تفاوت‌ها در این گروه بیشتر بود زیرا همان‌طور که در بالا آورده شد محصولات مختلف مرکبات در این دو منطقه (داراب و منوجان) وجود دارند. سه نمونه میناب که در این گروه واقع شده‌اند تشابه بالایی با یکدیگر نشان داده‌اند به طوری که می‌توانند به عنوان یک زیر گروه دیگر مطرح باشند. زیر دسته دیگر، 4B بود که تقریباً تماماً شامل نمونه‌های منطقه میناب به‌علاوه دو نمونه D1 از داراب و A7 از منوجان بود. دو نمونه غیر مینابی (D1 و A7) خصوصاً D1 از دیگر نمونه‌های این گروه فاصله داشتند. در این زیر دسته میزان تشابه بسیار بالا بود که می‌تواند بیانگر این مطلب باشد

که شاید تمام این نمونه‌ها واجد یک جد والد اولیه یکسان هستند که در طی سالیان متوالی در اثر تکثیر بذری و تفرق ژنتیکی از یکدیگر جدا شده‌اند. از آنجایی که سال‌هاست در این مناطق مکزیکن لایم به‌عنوان محصول عمده کاشت می‌شود این احتمال وجود دارد که این نمونه‌ها از این رقم حاصل شده باشند خصوصاً که میزان تشابه آن‌ها با رقم مکزیکن لایم حدود ۵۷ درصد است. بدیهی است برای اثبات این احتمال به بررسی‌های بیشتر نیاز است.

به‌طور کلی چندین عامل در تخمین روابط ژنتیکی افراد نقش دارند که عبارتند از: (۱) تعداد نشانگرهای به‌کار رفته در بررسی، (۲) توزیع نشانگر در ژنوم و (۳) طبیعت مکانیزم‌های تکاملی که در واقع زیر بنای تنوع محاسبه شده‌اند (۱۹). در ارتباط با تعداد نشانگرها به‌کار رفته عموماً تصور می‌گردد هرچه تعداد نشانگر به‌کار رفته بالاتر باشد بهتر است اما الیس و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند با کاربرد شش ترکیب پرایمری می‌توان ۸۰ درصد از روابط ژنتیکی را بیان نمود (۶) که در مطالعه پیش رو با کاربرد چهار ترکیب پرایمری و تولید ۱۲۶ مکان ژنی که ۷۰ درصد چندشکلی داشتند می‌توان بیان نمود نتایج قابل اعتماد است. همان‌طور که ناوارنات و ناوارنات (۲۰۱۱) نیز در کاربرد روش AFLP برای ارقام سلطان مرکبات این‌گونه گزارش نمودند (۱۹).

طالبی کوهیخی و همکاران (۲۰۰۸) بیان نموده‌اند که دقت در تخمین تشابه ژنتیکی افراد به تعداد نشانگر مورد استفاده، میزان چند شکلی و میزان پوشش ژنومی نشانگرها بستگی دارد (۲۶). تعداد جفت پرایمرهای به‌کار رفته در این آزمایش چهار عدد بود که با توجه به مطالعات دیگر که تعداد مشابهی پرایمر AFLP را به‌کار برده بودند، مناسب به‌نظر می‌رسد (۳، ۵ و ۱۵). به‌طوری که کامپوس و همکاران (۲۰۰۵) با کاربرد دو ترکیب آغازگری اقدام به بررسی تنوع نازنگی (۶) و السعدی و همکاران (۲۰۱۲) با کاربرد چهار ترکیب اقدام به بررسی تنوع لایم‌ها (۳) نمودند.

نتایج این بررسی بیان می‌دارد که تنوع ژنتیکی قابل توجهی در بین لیموهای اسیدی ایران وجود دارد که دلیل عمده آن می‌تواند تکثیر از طریق بذر باشد، در حالی که السعدی و همکاران (۲۰۱۲) تنوع کمی را در لایم‌های کشور عمان گزارش نمودند (۳) دلیل آن می‌تواند تکثیر غیر بذری با روش‌های غیر جنسی از روی ارقام مختلف باشد.

پاول و همکاران (۱۹۹۸) بیان داشتند که روش AFLP به‌دلیل تکرار پذیری بالا و مکان‌های ژنی زیادی که در یک زمان کوتاه و در یک بار آزمایش مورد سنجش قرار می‌دهد یک روش قوی، مفید و قابل اعتماد است، یکی از ساده‌ترین روش‌ها برای سنجش کیفیت یک نشانگر تکرارپذیری آن می‌باشد

که اگر این ویژگی را داشته باشد می‌تواند به دسته‌بندی صحیحی در نمونه‌های مورد بررسی منجر گردد (۱۹).

انتظار بر این است که نتایج این پژوهش، محققان را در طراحی برنامه‌های اصلاحی برای اهداف خاص مانند کنترل بیماری‌ها، مقاومت به خشکی و شوری در تخمین و مشخص نمودن تلاقی‌های مناسب‌تر یاری رساند.

منابع

1. Abedinpour, H., Ranjbar, G.A., Babaeian Jelodar, N., and Golein, B. 2014. Assessment of polymorphism in citrus genotypes using RAPD molecular markers. *Plant. Prod. Res. J.* 21(4): 165-178. (In Persian)
2. Al-Anbari, A., Kanawapee, N., Al-Kazragi, T.A., Al-Jewari, H., Al.Mashhadani, A., Barusrux, S., Pornpongrungrueng, P., and Theerakulpisut, P. 2014. Genetic diversity of citrus (Rutaceae) in Iraq based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Afr. J. Agric. Res.* 9(11): 1112-1019.
3. Al-Sadi, A.M., Al-Moqbali, H.S., Al-Yahyai, R.A., and Al-Said, F.A. 2012. AFLP data suggest a potential role for the low genetic diversity of acid lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) in Oman in the outbreak of witches' broom disease of lime. *Euphytica.* 188: 285-297.
4. Bove, J.M., Danet, J.L., Bananej, K., Hassanzadeh, N., Taghizadeh, M., Salehi, M., and Garnier, M. 2000. Witches' broom disease of lime (WBDL) in Iran. *Proceedings of the Fourteenth Conference of the International Organization of Citrus Virologists.* Pp: 207-212.
5. Campos, E.T., Espinosa, M.A.G., Warburton, M.L., Varela, A.S., and Monter, A.V. 2005. Characterization of mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. *Interciencia.* 687-693.
6. Ellis, R.P., Mcnicol, J.W., Baird, E., Booth, A., and Lawrence, P. 1997. The use of AFLP to examine genetic relatedness in barley. *Mol. Breed.* 3: 359- 69.
7. Fang, D.Q., Roos, M.L., Krueger, R.R., and Federic, C.T. 1997. Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with isozymes RFLPs and inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Gen.* 95: 211-219.
8. Goleina, B., Bigonah, M., Azadvar, M., and Golmohammadid, M. 2012. Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (*Citrus* sp.) and some known citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers. *Sci. Hort.* 148: 147-153.
9. http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/pub/DArT_DNA_isolation.pdf
[bfw.ac.at/200/1859.html](http://www.bfw.ac.at/200/1859.html)

10. Khounani, Z., Naghavi, M.R., Omid, M., Sabokdast, M., and Talebi Koyakhi, E. 2010. Assessment of genetic diversity in the samples *ferulla gummosa* from Iran using AFLP markers. *J. Med. Plat.* 38: 117-126. (In Persian)
11. Kumar, S., Jena, S.N., and Nair, N.K. 2010. ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in north-east India. *Sci. Hort.* 123: 350–359.
12. Martinez-Castillo, J., Colunga-GraciaMarin, P., and Zizumbo-Villarreal, D. 2008. Genetic erosion and *in situ* conservation of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces in its Mesoamerican diversity center. *Gen. Resour. Crop. Evol.* 55: 1065–1077.
13. Mohammadi, Z., Sabouri, A., Heydari, R., Sabouri, H., Falahi, H.A., Dadras, A.R., and Mousanejad, S. 2014. Investigation of population structure and genetic diversity of barley genotypes using AFLP molecular markers. *Cereal Res.* 4(2): 141-154. (In Persian)
14. Munankarmi, N.N., Shrestha, R.L., Rana, N., Shrestha, J.K.C., Shrestha, S., Koirala, R., and Shrestha S. 2014. Genetic diversity assessment of acid Lime (*Citrus aurantifolia*, Swingle) landraces of eastern Nepal using RAPD markers. *Int J Appl Sci Biotech.* 2(3): 315-327.
15. Nartvaranant, P., and Nartvaranan, K. 2011. Analysis based on AFLP markers of the genetic variations and their relationships for pummelo cultivars grown in the central region of Thailand. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 33(5): 499-508.
16. Nematollahi, A.Kh., Golein, B., and Vahdati, K. 2013. Analysis of the genetic diversity in Citrus (*Citrus* spp.) species using SSR markers. *J. Plant. Physiol. Breed.* 3: 41-49.
17. Pal, D., Malik, S.K., Kumar, S., Choudhary, R., Sharma, K.C., and Chaudhury, R. 2013. Genetic variability and relationship studies of Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using morphological and molecular markers. *Agri. Res.* 2: 236–245.
18. Pang, X.M., Hu, Ch.G., and Deng, X.X. 2007. Phylogenetic relationships within Citrus and its related genera as inferred from AFLP markers. *Gen. Resour. Crop. Evol.* 54: 429–436.
19. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., and Rafalsky, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225- 38.
20. Robles-Gonzalez, M.M., Medina-Urrutia, V.M., Velazquez-Monreal, J.J., and Simpson, J. 2008. Field performance and molecular profiles of Mexican lime selection. *Euphytica.* 161: 401–411.
21. Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc Numerical taxonomy and Multivariate analysis system, Exeter Software, Setauket, New York.

22. Roldain-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T.J., Coll, R., Van Eijk, M.J.T., and De Loose, M. 2000. Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties, 2. AFLP characterization. *Mol. Breed.* 6: 593-602.
23. Shamsavar, A.R., Izadpanah, K., Tafazoli, E., and Sayed Tabatabaei, B.E. 2007. Characterization of Citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Sci. Hort.* 112: 310-314.
24. Shrestha, R.L., Dhakal, D., Gautam, D., Paudyal, K.P., and Shrestha, S. 2012. Genetic diversity assessment of acid Lime (*Citrus aurantifolia*) landraces in Nepal, using SSR markers. *Amer. J. Plant. Sci.* 3: 1674-1681.
25. Singh, S., and Rajam, M.V. 2009. Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 15(1): 3-22
26. Talebi Kohyakh, E., Naghavi, M.R., and Mohammad Aliha, M. 2008. Study of the essential oil variation of *Ferula gummosa* samples from Iran. *Chem. Nat. Compd.* 44: 124-6.
27. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., De Lee, T.V., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 2: 4407-4414.