مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (32) العدد (2) 2010
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (32) No. (2) 2010

التوصيف الجزيئي والعلاقات الوراثية بين أصول الحمضيات

الدكتورة وفاء شومان*
الدكتور فيصل دواي**
ريما الموعي***

(تاريخ الإيداع 4 / 1 / 2010. قبل للنشر في 25 / 5 / 2010)

□ ملخّص □

هدفت هذه الدراسة إلى تحديد الهوية الوراثية لأصول الحمضيات العشرة الموجودة في مجمع الأصول الوراثية في قسم بحوث الحمضيات في طرطوس، باستخدام مؤشرات التوابع الدقيقة المتكررة SSR . تم تحليل إحدى وثلاثين عينة (31 مدخلاً) من الحمض النووي منقوص الأوكسجين (DNA) باستخدام سبعة عشر زوجاً من البادئات، ثم أجريت مقارنة نتائج المكاثرة والتعرف على القرائن المتعددة على المواقع المختلفة، و من ثم تم تحديد قرائن معينة قادرة على التمييز بين أغلب الأصول المدروسة. قدر البعد الوراثي بين المدخلات المدروسة، واستخدمت المعطيات في إنشاء شجرة القرابة الوراثية بين الأصول العشرة.

بينت النتائج أن الأصلين كاريزو سيترانج وستروميللو هما الأكثر قرباً للبرتقال ثلاثي الأوراق، حيث تجمعوا معاً في مجموعة واحدة منفصلة عن بقية الأصول، مدعماً للفكرة التي تشير إلى أن البرتقال ثلاثي الاوراق هو أحد الآباء المشاركة في إنتاج هذه الأصول. أظهرت النتائج أن جميع مدخلات الأصل الواحد كانت متشابهة وتجمعت مع بعضها في فرع واحد منفصل عن أفرع مدخلات الأصول الأخرى، وان أعلى نسبة للتنوع الوراثي قد سجلت في الليم الفلسطيني و النارنج وأقلها في البرتقال ثلاثي الأوراق، كما لوحظت حالة غياب النقاوة الوراثية في جميع الأصول المدروسة.

الكلمات المفتاحية: أصول الحمضيات – المؤشرات الجزيئية – التوابع الدقيقة المتكررة SSR – التنوع الوراثي

* أستاذة– قسم العلوم الأساسية– كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية، سورية.
** أستاذ– قسم الساتين– كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.
*** طالبة دراسات عليا (دكتوراه)– قسم البساتين– كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (32) العدد (2) 2010
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (32) No. (2) 2010

Molecular Characterization and Genetic Relationships between *Citrus* Rootstocks

Dr. Waffa Choumane*
Dr. Faisal Dway **
Rima Almouie***

(Received 4 / 1 / 2010. Accepted 25 / 5 /2010)

□ ABSTRACT □

The objectives of this study are the genetic identification of ten *Citrus* rootstocks, present in the germplasm pool at the Department of *Citrus* Research in Tartous, using microsatellite markers (SSR).

Thirty-one DNA samples (31 accesssions) were analyzed using 17 SSR primer pairs. The amplified products were compared and the different alleles were identified at the different loci. Specific alleles were detected in some genotypes, allowing the distinction between the studied rootstocks. Alleles amplified by SSR primers were scored and data was used to evaluate the genetic distance and to establish a dendrogram of genetic relationships between the 10 rootstocks. The results showed that Carrizo citrange and Citromello were the closest rootstocks to trifoliate orange and were regrouped in a cluster, distant from the other genotypes, which supports the idea that Trifoliate is one of the parents involved in the production of these two rootstocks. All accessions of one rootstock were regrouped in one branch. The highest value of genetic diversity was detected in Lime and Sour orange, while the lowest one was detected in Trifoliate orange. The genetic impurity was detected in all studied rootstocks.

Key words: *Citrus* rootstocks, Molecular markers, Microsatelitte SSR, Genetic diversity.

* **Professor, Department of Basic Science, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
** **Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
*** **Postgraduate student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

تعد زراعة الحمضيات إحدى الزراعات الرئيسة في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط ذات السواحل الدافئة، وتعتبر ثمارها من الفواكه الأساسية ذات الأهمية الغذائية والطبية والاقتصادية والجمالية أيضاً.

تتأثر إنتاجية أشجار الحمضيات بمجموعة من العوامل والظروف غير المناسبة، الإحيائية منها كالإصابات المرضية، واللاحيائية كالظروف البيئية المختلفة، وهذا ما دفع مربو النبات للاهتمام باستنباط طرز جديدة محسنة باستخدام برامج تربية متعددة الأهداف.

بدأ التحسين بالبحث عن الأصول الوراثية ومصادر التنوع الوراثي في الحمضيات، الأمر الذي ووجه بصعوبات عديدة نتيجة للخصائص المرتبطة ببيولوجيا التكاثر لدى هذا النبات، مثل الخصوبة العالية بين الأنواع، وبالتالي الفرصة الكبيرة لحصول تهجين طبيعي فيما بينها، وكذلك ظاهرة التوالد البكري، وظاهرة تعدد الأجنة، وطول مرحلة ما قبل الإثمار(Corazza-Nunes *et al.*, 2002)، ولهذا السبب فإن التمييز بين أنواع الحمضيات المزروعة اعتماداً على الخصائص المورفولوجية، تعترضه صعوبات حقيقية.

تنتمي الحمضيات إلى العائلة السذبية *Rutaceae*، حيث يعد الجنس *Citrus* أحد الأجناس الأساسية فيها ويصنف مع أقربائه المقدرة بـ 28 جنساً ضمن قبيلة *Citreae* من تحت عائلة *Aurantioideae* (Swingle and Reece, 1967). من الجدير بالذكر، أنه لا يوجد اتفاق واضح بين العلماء على تقسيم الحمضيات اعتماداً على الصفات المورفولوجية، حيث يوجد أكثر من تصنيف شائع للحمضيات، من أهمها تصنيف (Swingle and Recee) عام 1967، الذي ميز ستة أنواع ضمن الجنس*Citrus*، وتصنيف Tanaka (عام 1977) الذي ميز 162 نوعاً ضمن الجنس *Citrus*، إضافة إلى تصنيف Scora (عام 1975) الذي أشار إلى أن الجنس *Citrus* يضم ثلاثة أنواع حقيقية فقط هي: السيترون (الحامض) *C. medica* ، المندرين *C. reticulata*، البوميللو *C. paradisi* ، أما بقية أنواع الحمضيات المزروعة فيعتقد بأنها عبارة عن هجن طبيعية بين هذه الأنواع الحقيقية. لذلك فقد تم اللجوء لمعايير أخرى لتعريف أنواع الحمضيات المزروعة، فاستخدمت الأيزوزيمات كمؤشرات بيوكيميائية، وكانت مفيدة في تمييز الأنواع المزروعة الناتجة عن الإكثار الجنسي (Herrero *et al.*,1996 ; Fang *et al.*,1993) ، ومن ثم تم التحول لاستخدام المؤشرات الجزيئية Molecular Markers لتحقيق هذا الهدف، فقد استخدمت تقنية المكاثرة لقطع الـ DNA المتباينة الأطوال (AFLP) في دراسة العلاقات الوراثية بين أصناف الجنس *Citrus* (Green *et al.*,1986)، وفي توصيف المندرين (Campos *et al.*, 2005) ، كما استخدمت تحاليل مكاثرة الـ DNA المتباين والموزع عشوائياً في المجين (RAPD) بكفاءة عالية في تعريف الأنواع المزروعة من الحمضيات، حيث سمحت بتمييز الليمون الحامض المزروع *C. limon* عن غيره من الحمضيات (Deng *et al.*, 1995)، كما استخدمت لتقدير التنوع الوراثي في البرتقال الحلو (Targon *et al.*, 2000)، وعند المندرين (Coletta Filho *et al., 2006*) وفي دراسة علاقات القرابة بين الكلمنتين والجريب فروت (Cabrita *et al.*, 2001)، وكذلك في إنشاء الخريطة الوراثية في الحمضيات (Cai *et al.* 1994).

تم حديثاً تطوير مؤشرات التوابع الدقيقة المتكررة (SSR) في الحمضيات، استخلصت من البرتقال الحلو (Chunxian *et al.*,2006)، تتميز بكونها وحدات بسيطة متكررة مكونة من مقاطع نيوكليوتيدية قصيرة (من 6-1 أزواج من النيوكليوتيدات)، تتوزع على كامل المجين (Zhao and Kochert, 1993).

ازداد استخدام هذا النوع من المؤشرات في الدراسات الوراثية بشكل متسارع لكونها مؤشرات ذات سيادة مشتركة، وسريعة التطور ولها القدرة على تمييز الأفراد الهجينة (Zane *et al.*, 2002).

استخدمت مؤشرات التوابع الدقيقة المتكررة في مجال تعريف الأنواع المزروعة والأفراد الناتجة عن التكاثر الجنسي (Oliveira *et al.*, 2002 ; Ruiz *et al.*, 2000; Novellii *et al.*, 2006) ، وبمجال تقدير التنوع الوراثي ضمن الجنس *Citrus* والأجناس القريبة منه (Corazza- ; Pang *et al.*,2003; Kijas *et al.*,1995) Nunes *et al.*,2002، وفي دراسة علاقات القرابة ضمن مجموعة من الأصول الوراثية (,Fang and Roose) 1997، وكذلك في مجال إنشاء الخريطة الوراثية عند البرتقال ثلاثي الأوراق (Roose *et al.*,2000 ; Kijas *et al.*,1997) وعند البرتقال الحلو (Luro *et al.*,1996).

أما على مستوى القطر العربي السوري، فما زالت معرفتنا بالأصول الوراثية للحمضيات، الموجودة والمستخدمة على نطاق واسع، محدودة جداً ولا تتجاوز بعض المواصفات المورفولوجية التي تتضمن الشكل الخارجي للأوراق والثمار والأشجار (دراسات قسم بحوث الحمضيات، التابع لمركز بحوث طرطوس - أبحاث غير منشورة)، و لا توجد دراسات دقيقة على المستوى الجزيئي تسمح بالتوصيف الدقيق والتعرف على هذه الأصول، ومن هنا كانت أهمية تطوير هذا المجال في القطر واستخدام هذه المؤشرات الجزيئية على الحمضيات.

أهمية البحث وأهدافه:

تتمثل أهمية البحث بالتعرف الدقيق على أصول الحمضيات المتوفرة في مجمع الأصول الوراثية في قسم بحوث الحمضيات في طرطوس، وتهدف هذه الدراسة إلى تحديد الهوية الوراثية لأصول الحمضيات باستخدام مؤشرات التوابع الدقيقة المتكررة SSR، وإلى دراسة التباينات الوراثية الموجودة ضمنها وبينها للتعرف على مدى نقاوتها الوراثية ومن ثم تحديد علاقات القرابة فيما بينها.

طرائق البحث ومواده:

المادة النباتية:

استخدمت في هذه الدراسة عشرة أصول من الحمضيات (جدول1)، وهي تشكل جميع الأصول الوراثية الموجودة في المجمع الوراثي في طرطوس، التابع لقسم بحوث الحمضيات في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية.

استخدم من كل أصل ثلاث عينات (3 مدخلات) أخذت من أشجار مختلفة، باستثناء النارنج، حيث تم استخدام ثماني عينات، جمعت ثلاث منها من مجمع الأصول الوراثية التابع لقسم بحوث الحمضيات، والعينات الخمس المتبقية جمعت من حقول المركز الزراعي بطرطوس، وذلك نظراً لكون النارنج هو الأصل الوحيد المستخدم في زراعة الحمضيات في سورية، كما استخدمت عينة واحدة فقط أخذت من شجرة واحدة من كل من الأصلين الليمون المخرفش والرانجبور، نظراً لعدم وجود أشجار أخرى تتبع لهذين الأصلين، سواء في المجمع الوراثي لقسم بحوث الحمضيات، أو في الحقول الأخرى التابعة للمركز.

جمعت الأوراق الفتية الخالية من الإصابات المرضية والحشرية من أشجار بعمر27 عاماً، لاستخدامها في عملية استخلاص الأحماض النووية. أجريت التحاليل في مخبر الوراثة الجزيئية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، خلال عامي 2007 - 2008.

استخلاص الأحماض النووية :

تم طحن 0.2 غ من الأوراق الفتية باستخدام محلول الاستخلاص المكون من المواد التالية: (2% CTAB, 1.4M NaCl, 0.1M Tris-HCl pH 7.8, 20mM EDTA)، وذلك وفقاً لتقنية Benito *et al.*, عام 1993، وتم التأكد من نوعية الحمض النووي المستخلص باختباره على هلامة الأجاروز (1%) والتلوين ببروميد الايتيديوم (0.5mg/L)، وقدر تركيزه في العينات باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer عند طول موجة 260 نانوميتر.

الجدول(1): أصول الحمضيات المستخدمة في الدراسة ومكان الجمع والمصدر.

اسم الأصل	أرقام العينات	مكان الجمع	المصدر الاصلي
االبرتقال ثلاثي الأوراق Trifoliata orange	1-2-3	مركز بحوث طرطوس	تركيا
سيتروميللو Citromello	4-5-6	مركز بحوث طرطوس	محطة سان جوليانو – كورسيكا
كاريزو سيترانج Carrizo citrange	7-8-9	مركز بحوث طرطوس	محطة سان جوليانو – كورسيكا
البرتقال الحلو الفلسطيني (الليم) Palestine sweet lime	10-11-12	مركز بحوث طرطوس	محطة سان جوليانو – كورسيكا
مندرين كليوباترا Cleopatra mandarin	13-14-15	مركز بحوث طرطوس	محطة سان جوليانو – كورسيكا
سانكي مندرين Sanki mandarin	16-17-18	مركز بحوث طرطوس	ايران
النارنج (الزفير) Sour orange	19-20-21-25-26-27-28-29	مركز بحوث طرطوس	محلي
فولكا مريانا Volkamer lemon	22-23-24	مركز بحوث طرطوس	محطة سان جوليانو – كورسيكا
الليمون المخرفش (الخشن) Rough lemon	30	مركز بوقا الزراعي	غير معروف بدقة
رانجبور Ranjpour lime	31	مركز بوقا الزراعي	غير معروف بدقة

البادئات المستخدمة وبرامج التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR)

تم اختبار خمسة وثلاثين زوجاً من بادئات الـ SSR المجهزة من البرتقال ثلاثي الاوراق (Chunxian *et al., 2006*) على عشر عينات ممثلة لجميع اصول الحمضيات المستخدمة في هذه الدراسة، ومن ثم تم اختيار واستخدام سبعة عشر زوجاً من البادئات (جدول2)، تميزوا بقدرتهم على كشف اختلافات بين العينات المختارة. أجريت مكاثرة الـ DNA باستخدام برنامجين PCR مختلفين هما: البرنامج الأول(1) مكون من 40 دورة،

تتضمن كل منها مرحلة التحطم الحراري Denaturingعلى 95 مْ لمدة 30 ثانية، ثم ارتباط البادئة بالـ DNA (Annealing) على درجة 56مْ لمدة 30 ثانية، ثم الاستطالة Elongation على درجة 72مْ لمدة دقيقة، في حين يتكون البرنامج الثاني (2) من 45 دورة، تتضمن مرحلة التحطيم لمدة دقيقة على درجة 95 مْ، والارتباط لمدة 30 ثانية على درجة 65 مْ، ثم الانخفاض بمعدل 0.7− مْ في كل دورة على مدار 15 دورة، ثم تثبت درجة الارتباط على الدرجة 54 مْ لمدة 30 دورة، ثم الاستطالة لمدة دقيقة واحدة على درجة حرارة 72مْ. سبق كل برنامج عملية فصل أولية لسلاسل الـ DNA لمدة 5 دقائق على درجة 94 مْ وانتهى كل برنامج بعملية تحضين للعينات لمدة 7 دقائق على درجة حرارة 72 مْ.

مكاثرة الـ DNA والرحلان الكهربائي:

أجري التفاعل باستخدام 35 نانو غرام من DNA في حجم 10 ميكرو ليتر، وبوجود 1x من المحلول الواقي، و 200µM من مزيج النيوكلوتيدات الأربعة، و10 µM من كل بادئة، 0.5 وحدة إنزيمية من DNA *Taq* Polymerase (المحضر من قبلنا في مخبر الكلية)، ثم وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري وفق البرنامج المناسب لكل بادئة (جدول 2). فصلت نواتج المكاثرة في جهاز الرحلان الكهربائي على هلامة الأكريلاميد 6%، وأجري التلوين بنترات الفضة (Bassam *et al.*, 1991).

تحليل النتائج:

سجلت القراءات وجمعت نتائج المكاثرة لجميع البادئات المستخدمة في جداول خاصة اعتماداً على وجود أو غياب قطع DNA في العينات، حيث يرمز لوجود قطعة DNA بموقع ما بالرقم 1 وبالرقم 0 في حال غيابها من نفس الموقع، وتم استثناء البادئتين Org-3, Org-12 من حسابات التنوع المورثي والوراثي لإعطائهما أكثر من قرين واحد مع جميع العينات المدروسة. تم تقدير التنوع المورثي Genic Diversity (H) لكل من المواقع (البادئات) التي استخدمت تبعاً لـ Weir (1990) . وفقاً للعلاقة : $\mathbf{H = 1- \Sigma\ pi^2}$

الجدول (2): البادئات المستخدمة في الدراسة وتركيبها النيوكلوتيدي وبرنامج الـ PCR المستخدم.

البادئات (المواقع) Primers (Loci)	برنامج PCR المستخدم PCR Programs	التسلسل النيوكليوتيدي للبادئات Primer sequences 5’ to 3’
Org-2	2	AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA CTTCCTCTTGCGGAGTGTTC
Org-3	1	TTCCTTATGTAATTGCTCTTTG TGTGAGTGTTTGTGCGTGTG
Org-4	1	TAAATCTCCACTCTGCAAAAGC GATAGGAAGCGTCGTAGACCC
Org-7	2	GGTGATGCTGCTACTGATGC CAATTGTGAATTTGTGATTCCG
Org-9	1	AACACTCGCACCAAATCCTC TAAATGGCAACCCCAGCTTTG
Org-10	2	AATGCTGAAGATAATCCGCG TGCCTTGCTCTCCACTCC
Org-11	1	GCTTTCGATCCCTCCACATA GATCCCTACAATCCTTGGTCC
Org-12	2	GGTGATGCTGCTACTGATGC CAATTGTGAATTTGTGATTCCG
Org-14	1	CGCCAAGCTTACCACTCACTAC GCCACGATTTGTAGGGGATAG

CGAACTCATTAAAAGCCGAAAC CAACAACCACCACTCTCACG	2	Org-15
GCCTTCTTGATTTACCGGAC TGCTCCGAACTTCATCATTG	1	Org-17
GAAAGGGTTACTTGACCAGGC CTTCCCAGCTGCTTGCAACAGC	2	Org-19
GGATGAAAAATGCTCAAAATG TAGTACCCACAGGGAAGAGAGC	1	Org-20
AGAGAAGAAACATTTGCGGAGC GAGATGGGACTTGGTTCATCACG	2	Org-21
AGGTCTACATTGGCATTGTC ACATGCAGZTGCTATAATGAATG	1	Org-23
CTTCCTCTTGCGGAGTGTTC GAGGGAAAGCCCTAATCTCA	2	Org-26
ATATAGCCCCTAGGCCTCCCTATC GAGTAACCATGGGAGGAGAAAGGA	2	Org-31-F-98

حيث pi هي نسبة تكرار كل قرين على نفس الموقع المورثي. ومن ثم تم حساب التباين أو التنوع الوراثي Genetic diversity(GD) على كافة المواقع تبعاً لعلاقة Nei (1987):

$$\mathbf{GD = n(1- \Sigma p^2)/(n-1)}$$

حيث تمثل n عدد العينات وتمثل P نسبة تكرار كل قرين على الموقع المورثي. قدرت قيم عدم التشابه Dissimilarity بين العينات وفقاً لـ Nei and Li (1979) واستخدمت القيم في إنشاء مخططات القرابة باستخدام البرنامج الإحصائي Numerical Taxonomy and Multi-variant Analysis System NTSYS-2-PC (Rohlf، 1993).

النتائج والمناقشة:

حللت عينات DNA باستخدام 17 زوجاً من البادئات التي سمحت بمكاثرة قطع من الـ DNA ذات وزن جزيئي محدد في جميع الأصول المدروسة، وأظهرت جميع البادئات المنتخبة اختلافات في القرائن بين العينات (المدخلات) المدروسة.

قدر العدد الكلي للقرائن (الأليلات Alleles) المكاثرة في جميع الأصول وعلى جميع المواقع بـ (84) قريناً، حيث تراوح عدد القرائن التي تم كشفها على الموقع الواحد باستخدام زوج واحد من البادئات من 2-9 قرائن (2على الموقعين **Org-15** و**Org-31-F-98** و 9 على الموقع **Org-23**)، وبمتوسط قدره 5.6 قرائن للموقع الواحد، (جدول 3)، مع ملاحظة وجود أصول تحوي أكثر من قرين واحد على الموقع الواحد، كما في الموقع **Org-20**، حيث لوحظ وجود أكثر من قرين لدى جميع الأصول المدروسة (نتائج غير معروضة) والموقع **Org-23**، حيث شوهد قرينان عند جميع الأصول باستثناء الفولكامريانا الذي امتلك قريناً واحداً فقط، وسجل الموقع **Org-11** وجود قرينين لدى جميع الأصول، عدا البرتقال ثلاثي الأوراق.

أكدت العديد من الدراسات التي أجريت على الحمضيات، وباستخدام أنواع مختلفة من المؤشرات الجزيئية، وجود نسبة عالية من حالة تخالف اللواقح عند معظم الأصناف والأنواع المدروسة وعلى مواقع مختلفة (Herrero *et al.*,1996 ; Golein et al.,2004 ; Boykin *et al.*,2007) ، ويفسر ذلك بسبب ارتفاع نسبة التلقيح الخلطي الطبيعي بين الأنواع ضمن الجنس *Citrus*، في حين أن النسبة الأقل من الأفراد متخالفة اللواقح قد

لوحظت عند الأصناف التي يعتقد بأنها حقيقية (صحيحة)، وهي السترون(الحامض) *C. medica* البوميللو *C. paradisi* ، والتي يلاحظ فيها ارتفاع نسبة التلقيح الذاتي، وكذلك المندرين *C. reticulata* ؛ إلا أن نسبة عدم تماثل اللواقح فيه مرتفعة قياساً بالحامض والبوميللو، وهذا يتوافق مع ما اقترحه Scora (1975) من أنه يوجد فقط ثلاثة أنواع حقيقية ضمن الجنس (*Citrus*) هي:السيترون (الحامض) *C. medica*، المندرين *C. reticulata*، البوميللو *C. paradisi*، وبأن باقي الأنواع هي هجن نشأت من خلال التلقيح الخلطي والحر بين الأنواع الحقيقية، وقد لاقت هذه الفكرة ما يدعمها من خلال الأبحاث المعتمدة على الدراسات الجزيئية (Federici *et al*.,1998)

الجدول (3): عدد القرائن على المواقع المدروسة وقيم التنوع المورثي والوراثي.

البادئات Primers	العدد الكلي للقرائن على الموقع الواحد N0. of alleles	التنوع المورثي Gene Diversity	PIC التنوع الوراثي Polymorphic Info Contents
Org-2	7	0.433	0.447
Org-4	5	0.622	0.642
Org-7	7	0.297	0.306
Org-9	3	0.647	0.668
Org-10	3	0.597	0.616
Org-11	8	0.432	0.446
Org-14	8	0.528	0.545
Org-15	2	0.411	0.424
Org-17	5	0.219	0.226
Org-19	7	0.691	0.713
Org-20	6	0.775	0.800
Org-21	4	0.282	0.291
Org-23	9	0.399	0.412
Org-26	8	0.551	0.569
Org-31-F-98	2	0.413	0.426
المجموع	84		
المتوسط	5.6	0.486	0.502

تميزت المدخلات المدروسة من البرتقال ثلاثي الأوراق بامتلاكها لأقل عدد من القرائن على المواقع المدروسة، حيث امتلكت قريناً واحداً فقط عند مكاثرتها مع ثلاث عشرة بادئة (على ثلاثة عشر موقعاً مختلفاً) مما يؤكد على كونها جنساً محدداً وبأن مدخلاتها ترتفع فيها نسبة تماثل اللواقح، وقد ذكر Roose et al., عام (2006) في دراسة شملت 370 مدخلاً أن مدخلات البرتقال ثلاثي الأوراق قد امتلكت أقل نسبة من تباين اللواقح، في حين كانت مدخلات النارنج (الزفير) تحتوي دائماً على قرينين اثنين عند مكاثرتها مع معظم البادئات (على معظم المواقع المدروسة).

لقد تباينت البادئات المستخدمة في هذه الدراسة بمعدل التنوع الوراثي الذي استطاعت أن تكشفه على المواقع الوراثية المختلفة، حيث أعطى زوج البادئات Org- 20 أعلى قيمة للتنوع الوراثي (GD=0.800)، في حين وجد أقل معدل للتنوع الوراثي (0.226) باستخدام زوج البادئات Org-17 ، وكان متوسط قيمة التنوع الوراثي مع جميع ابادئات هو 0.502 في جميع المدخلات المدروسة جدول (3).

لم يلاحظ وجود علاقة ارتباط بين عدد القرائن على موقع معين ومعدل التنوع المورثي على نفس الموقع، الأمر الذي يبدو واضحاً بالنسبة للموقع Org-7 الذي يملك سبعة قرائن وقيمة التنوع الوراثي فيه هي 0.306 ، والموقع Org-23 الذي يملك تسعة قرائن وقيمة التنوع الوراثي لديه هي 0.412، في حين يملك الموقع Org-31-F-98 قرينين فقط

وقيمة تنوع وراثي بلغت 0.426، ويعود السبب في ذلك إلى انخفاض نسبة تكرار بعض القرائن ضمن مجموعة الأصول المدروسة، مما يجعل مشاركتها في قيمة التنوع الوراثي، المقدرة اعتماداً على نسب تكرار القرائن، منخفضة.

لقد سبق ونجحت مؤشرات SSR في تحديد البصمة الوراثية للعديد من المدخلات التابعة للجنس *Citrus*، (Capparelli *et al*., 2004 ; Shahsavar *et al*., 2007; Jannati *et al*.,2009)، كما أن استخدام هذه المؤشرات في دراستنا قد سمح بالتمييز الواضح بين الأصول المدروسة، حيث نجد من خلال القرائن التي حددت بأن هناك بادئات متخصصة بتمييز أصول معينة، فهي تسمح بمكاثرة قرائن ذات وزن جزيئي محدد في أصل واحد بجميع مدخلاته في حين يغيب هذا القرين في كافة الأصول الأخرى، كما هو الحال بالمواقع Org-23 , Org-2 اللذين سمحا بتمييز مدخلات النارنج (الزفير) عن باقي الاصول المدروسة (جدول 4). يمكن الاستفادة من هذه البادئات عملياً واعتبارها مؤشرات جزيئية متخصصة بأصل معين، تسمح بتمييزه أو تمييز نسله عن باقي أصول الحمضيات أينما وجد.

يبين لنا الجدول (4)، أنه يمكن تمييز النارنج باستخدام البادئتين Org-26 و Org-2 ، حيث لوحظ وجود قرين واحد ذي وزن جزيئي محدد لدى جميع مدخلاته، في حين كان نفس القرين غائباً عند بقية المدخلات المدروسة والتابعة للأصول المختلفة، بينما ميزت البادئة Org-7 الليمون المخرفش، في حين لم تستطع أية بادئة من البادئات المستخدمة التمييز الدقيق لباقي الأصول مثل البرتقال ثلاثي الأوراق، الرانجبور، الفولكاميريانا والسيتروميللو عن بعضها البعض.

الجدول (4): البادئات المتخصصة بتمييز أصول معينة من الحمضيات.

الموقع / الأصل	Org-23	Org-26	Org-19	Org-14	Org-11	Org-7	Org-2
النارنج (الزفير) Sour orange		+					+
السيترانج Carrizo citrange	+						
مندرين كليوباترا M.Cleopatra					+		
سانكي مندرين M. Sanki				+			
الليمون المخرفش (الخشن) Rough lemon						+	
البرتقال الحلو الفلسطيني Palestine sweet lime			+				

+: تدل على أن هذه البادئة مميزة للأصل الموجود بنفس السطر .

العلاقات الوراثية ومخطط القرابة:

لقد استخدمت المعطيات المبنية على وجود أو غياب القرائن بين المدخلات في حساب معدل التشابه والبعد الوراثي بين الأصول المختبرة تبعاً لـ Nei and Li عام 1979، وبتحديد علاقات القرابة فيما بينها، وأظهرت شجرة القرابة الوراثية التي أنشئت اعتماداً على هذه القيم، بأن جميع الأصول المستخدمة تحمل تباينات وراثية يستدل عليها من وجود نسبة من البعد الوراثي بين مدخلاتها، مما يدل على غياب النقاوة الوراثية ضمن هذه الأصول، إلا أن التباينات الوراثية بين مدخلات نفس الأصل كانت أقل من التباينات بين مدخلات الأصول المختلفة، مما أدى لتوضع جميع مدخلات الأصل الواحد مع بعضها البعض في نفس التجمع (نفس الفرع)، وبشكل منفصل عن مدخلات الأصول الأخرى.

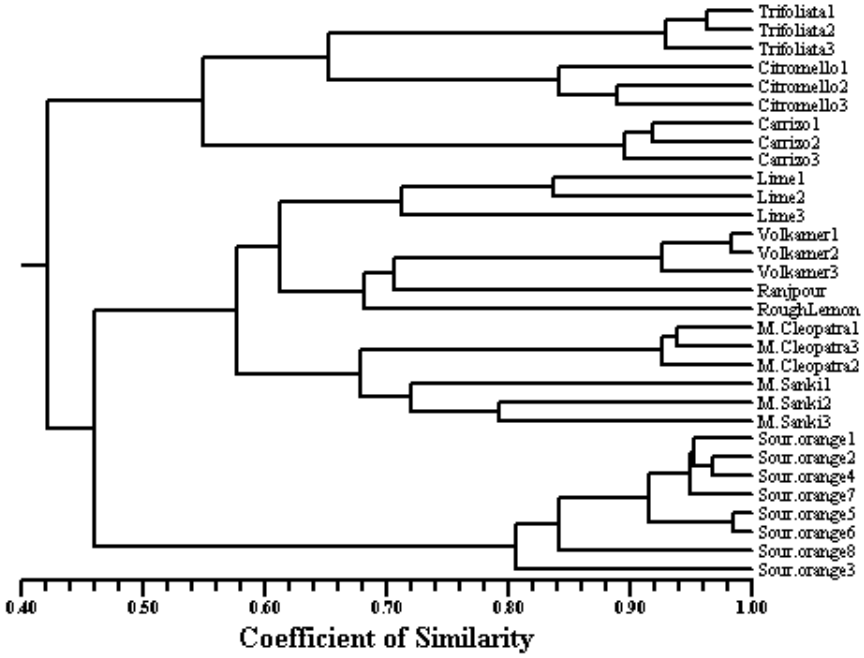
كانت مدخلات المندرين Mandarine، المندرين كليوباترا M.cleopatraالبرتقال ثلاثي الأوراق Trifoliata orange، والفولكامريانا Volkamer هي الأكثر تشابهاً وراثياً، حيث لم تتجاوز قيمة البعد الوراثي بين أفراد الأصل الواحد 8%، وكان معدل التشابه الوراثي حوالي 92% (شكل 1)، في حين كانت مدخلات الليم الفلسطيني Lime تحمل اكبر قدر من التباينات الوراثية، وبالتالي كان معدل التشابه الوراثي بين مدخلات الأصل بحدود 70% فقط. لقد سبق ووجد Fang *et al.*, عام (1997) نتيجة مشابهة عندما قام بدراسة 48 مدخلاً من البرتقال ثلاثي الأوراق باستخدام مؤشرات الأيزوزيمات ومؤشرات AFLP و SSR، حيث وجد ارتفاعاً بنسبة التشابه الوراثي بين المدخلات المدروسة ومعدلاً منخفضاً من التنوع الوراثي فيما بينها. كما سمحت دراسة التنوع الوراثي لـ 370 مدخلاً تنتمي للجنس *Citrus* وأقربائه باقتراح وجود أصل واحد لجميع مدخلات البرتقال ثلاثي الأوراق التي تميزت بنسبة عالية من التشابه الوراثي أيضاً وهذا ما فسر سبب انخفاض معدل التنوع الوراثي بين أفراد هذا الأصل (Roose *et al.*,2006).

يظهر مخطط القرابة بوضوح بأن الأصول المدروسة قد توزعت في مجموعتين رئيسيتين مشكلة فرعين كبيرين (شكل 1). ضم الفرع الأول ثلاثة أصول هي:Ttrifoliate orange ، Citromello ، Carrizo citrange ، في حين ضم الفرع الآخر الأصول الباقية.

من المعروف بان الأصل Citromello هو عبارة عن هجين بين البرتقال ثلاثي الاوراق Ttrifoliate orange و البرتقال الحلو *C. siensis*، وكذلك الحال بالنسبة للأصل Carrizo citrange الذي هو هجين بين Ttrifoliate orange مع البوميللو *C. paradisi* (Scora,1975)، وهذا يتوافق مع ما لاحظناه في هذه الدراسة، حيث كان هذان الأصلان هما الأقرب للبرتقال ثلاثي الأوراق و توضعا معه بنفس الفرع لكونه يمثل أحد الآباء المشاركين بإنتاجهما، وبالتالي كان معدل التشابه الوراثي بين الأصول الثلاثة في الفرع الأول هو بحدود 54% ، كما أظهر التحليل من خلال نسبة التشابه الوراثي بين الأصول الثلاثة بأن الأصل سترومياللو هو أقرب وراثياً للبرتقال ثلاثي الأوراق (معدل التشابه حوالي 65%) من الأصل كاريزو سيترانج (معدل التشابه 54%).

أما الفرع الثاني، فقد انقسم إلى مجموعتين أساسيتين، احتوت إحداهما على مدخلات النارنج (الزفير) Sour orange فقط، في حين تفرعت الأخرى إلى ثلاث تحت مجموعات ضمت الأولى مدخلات الليم الفلسطيني Lime، والثانية جميع مدخلات المندرين سواء M. Cleopatra أو M. Sankil وضمت تحت المجموعة الثالثة مدخلات فولكامريانا Volkamer ، الليمون المخرفش Rough lemon والرانجبور Ranjpour ، وبدرجات متفاوتة من البعد الوراثي. وقد لوحظ بأن مدخلات اللايم الفلسطيني تحمل نسبة منخفضة نسبياً من التشابه بين أفرادها، كما أن معدل التنوع الوراثي ضمن هذا الأصل كان كبيراً.

اقترح Scora (عام 1975) أن الليم الحلو الفلسطيني قد يكون من هجن الحامض، وفي دراسة أخرى بهدف تقدير التنوع الوراثي لتحت العائلة Aurantioideae، لوحظ وجود نسبة عالية من التراكيب الوراثية الخلطية (التباين في اللواقح) عند مدخلات الليم، مما يشير إلى أنها ناشئة من التهجين بين الأنواع (Herrero *et al.*,1996) ، كما أن الدراسة التي أجريت في إيران بهدف توصيف 33 طرازاً وراثياً من مجموعة الأصول، وباستخدام مؤشرات الـ ISSR ، أظهرت بأن مدخلات الليم قد تجمعت ضمن مجموعة الحامض، وإن كانت تحمل بعض الاختلافات عن الليمون الحامض بسبب وجود أصل آخر مشارك بالتهجين، مما أدى لتوضعها بشكل فرع منفصل عن الحامض ولكنه قريب منه وضمن نفس المجموعة (Shahsavar *et al.*, 2007) .



شكل (1): مخطط القرابة الوراثية بين أصول الحمضيات المدروسة اعتماداً على نتائج مؤشرات SSR.

يبين (شكل1) بأنه، على الرغم من التنوع الوراثي الموجود بين المدخلات التابعة لأصول المندرين Mandarin، إلا أن نسبة التشابه الوراثي بين أفرادهم كانت أعلى من النسبة الموجودة مع باقي المدخلات، مع التركيز على أن مدخلات المندرين التابعة لـ M. Cleopatra كانت نسبة التشابه الوراثي بين أفرادها أعلى من النسبة الموجودة بين مدخلات M. Sankil، مما أدى إلى وجود مدخلات المندرين قرب بعضها البعض في مخطط القرابة، ويمكن تفسير الاختلافات بين مدخلات أصلي المندرين بكونهما هجينين مختلفين من هجن المندرين *C .reticulata* وتجدر الإشارة هنا إلى أن مجموعة المندرين هي ثاني أكبر مجموعة ضمن الجنس *Citrus* بعد مجموعة البرتقال، ومن المعروف أنها تملك تنوعاً كبيراً بالصفات المظهرية، و تتميز بوجود عدد كبير من الهجن التي تستخدم كأصناف اقتصادية أو كأصول في برامج التربية وتملك درجة عالية من التنوع الوراثي.

لقد أظهرت دراسة أجريت لتوصيف 63 صنفاً من أصناف المندرين المزروعة في المكسيك، باستخدام الصفات المورفولوجية وتحاليل RAPD، وجود درجة عالية من التنوع بين المدخلات التابعة للأصناف المختلفة (Campos *et al.*,2005)، ، وفي دراسة أخرى للتنوع الوراثي لأربعة وأربعين نمطاً وراثياً من الساتزوما المزروعة في إيران باستخدام مؤشرات SSR، لوحظ أيضا وجود درجة عالية من التنوع الوراثي بين المدخلات المدروسة (Ghanbari *et al.*, 2009).

أما تحت المجموعة الثالثة فقد ضمت مدخلات الفولكا مريانا، الرانجبور والليمون المخرفش، وهي جميعها من هجن الحامض، وقد ذكر Scora (1975) أن الليمون المخرفش هو هجين طبيعي بين المندرين والحامض ، وهذا ما أيده Nicolosi *et al.*, (2000) بنتائج تحاليل SCAR, CpDNA RAPD, وهذا يتوافق مع نتائجنا التي وضعتهم قريبا من المندرين (احد الاباء المشاركين في التهجين) في شجرة القراية الوراثية (شكل 1).

اقترح Webber (1943)، أن رانجبور قد يكون هجيناً بين اللايم والمندرين، في حين اقترح كل من Nicolosi *et al.*,2000: Roose *et al.*,2006)) وفقاً لنتائج استخدام المؤشرات الجزيئية، أنه هجين بين

المندرين والسيترون وبأنه أقرب للسيترون (الحامض) حيث كانت معظم قرائنه آتية منه، أما في دراستنا، فيبدو الرانجبور أقرب للمندرين من باقي الأصول، و لكن يصعب مقارنته بالحامض، لكون الأخير غير مختبر في دراستنا التي اقتصرت على الاصول الموجودة والمستخدمة لدينا في القطر. وفقاً للدراسات السابقة نفسها، فقد اقترح الباحثون أيضاً أن الفولكا مريانا هي هجين طبيعي بين الحامض والنارنج.

أظهرت التحاليل التي أجريت على مدخلات الجنس *Citrus* باستخدام مؤشرات AFLP ، SSR، بأن أعلى نسبة تشابه وراثي قد لوحظت بين الفولكا مريانا والرانجبور 73,9%، في حين أن أقل نسبة تشابه كانت بين الكاريزو والنارنج 8.3% (Hussein *et al*.,2003) ، وهذا يتوافق مع النتائج التي حصلنا عليها والتي توضح من خلال شجرة القرابة بأن النارنج هو في الطرف المعاكس لمكان توضع الكاريزو سيترانج.

ضمت المجموعة الثالثة في شجرة القرابة جميع مدخلات النارنج (الزفير) Sour orange، مع وجود اختلافات واضحة فيما بينها تدل على التنوع الوراثي الموجود ضمن أصل النارنج ، وتجدر الإشارة إلى أن أشجار النارنج المزروعة في سورية تبدي غالباً اختلافات واضحة بالصفات المورفولوجية وهذا يتوافق مع الاختلافات التي لوحظت باستخدام مؤشرات SSR في دراسة نفذت في اسبانيا بهدف توصيف 22 طرازاً من النارنج باستخدام الصفات المورفولوجية والبيوكيميائية، حيث تبين من خلالها وجود اختلافات واضحة في الصفات الكمية والنوعية عند الطرز المدروسة وأظهرت شجرة القرابة التي انشئت اعتماداً على تلك النتائج تجمع الطرز المختبرة في مجموعتين أساسيتين مشيراً لتنوعها الوراثي ولانتمائها إلى أنواع مختلفة ولكنها تمثل أباء مشاركة في التهجين للحصول عليها (Gogorcena and Ortiz,1989).

وفي دراسة لمجموعة من المدخلات التي يعتقد بأنها هجن للنارنج، وجدوا أنها توزعت ما بين مجموعتي البوميللو والمندرين، ويعتقد أن النارنج هجين بينهما، وهذا يتوافق مع ما ذكره (Scora,1975)، مع الإشارة إلى أن القسم الأكبر من القرائن كان من مجموعة البوميللو، مما يشير إلى أن النارنج أقرب إليها من المندرين (Roose *et al*.,2006).

الاستنتاجات والتوصيات:

لقد سمحت عملية تحليل الحمض النووي منقوص الأكسجين (DNA) باستخدام مؤشرات التوابع الدقيقة المتكررة SSR، بتحديد هوية مميزة لأصول الحمضيات المستخدمة في سورية و بمعرفة مدى التنوع الوراثي ضمنها. بالإضافة لذلك، فقد توافقت نتائجنا مع نتائج الدراسات السابقة التي أجريت على مدخلات من مناطق أخرى، والتي أكدت أن معدل التنوع الوراثي في مدخلات البرتقال ثلاثي الأوراق منخفض مقارنة بباقي أصول الحمضيات، وبأن النارنج غني بالتنوع الوراثي وبأنه يختلف كثيراً عن باقي الأصول الوراثية؛ مما يرجح احتمال اتساع القاعدة والمخزون الوراثي لهذا الأصل، و قد يكون هذا هو السبب وراء انتشاره الكبير كأصل في مناطق زراعة الحمضيات في سورية. إن إمكانية تمييز المدخلات المختلفة المستخدمة في هذه الدراسة من خلال بصمتها الوراثية ستمكننا من المحافظة على التنوع الوراثي ضمن وبين أصول الحمضيات، كما ستسهم في دعم برامج التربية الخاصة بتحسين الحمضيات لكونها ستسمح بتقدير كفاءة عمليات التهجين وكذلك متابعة انتقال بعض المورثات في النسل الناتج والتي يمكن ان تكون مرتبطة بشكل وثيق بهذه المؤشرات.

المراجع:

1- BASSAM, B.J., CAETANO-ANOLLES, G., GRESSHOFF, P.M . *Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamid gels*. Anal Biochemical,Vol. 196,1991, 80-83.

2- BENITO, C., FIGUEIRA, S., ZARAGOZA, F.J., GALLEGO, A., DE LAPENA, A. *Rapid identification of Triticeae genotypes from single seeds using the polymerase chain reaction.* Plant Molecular Biology, Vol. 21,1993, 181 – 183.

3- BOYKIN, L.M., BAGMALL, R.A., FROHLICH, D.R., HUNTER,W.B., KTSAR, C.S., MCKENRIE, C.L., ROSELL, R.C., SHATTERS, R.G. *Twelve polymorphic microsatellite loci from the Asian citrus psyllid, diaphorian citri kuwayama, the vector for citrus greening disease, huanglongbing*. Molecular Ecology, Vol. 7, N°. 6, 2007, 1202-1204.

4- CABRITA, L., ELISIARIO, P., LEITAO, J., GUERRERIO, A. *Assesment of the genetic relationships among citrus species and varieties by isozime and RAPD markers*. Acta Horticulturae,Vol. 546, 2001, 177-181.

5- CAI, Q., GUY, C.L., MOORE,G.A. *Extension of the linkage map in citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci*. Thero Appl Genet, Vol. 89,1994, 606-614.

6- CAMPOS,T.C., ESPINOSA,M.A.,WARBURTON, M.L., VARELA, A.S., MONTER, A.V. *Characterization of mandarin (Citrus SPP.) using morphological and AFLP markers*. Interciencia,Vol.30, N°.11, 2005, 687-693.

7- CAPPARELLI, R., VISCARDI, M., AMOROSO, MG., BLAIOTTA, G., BIANCO, M. *Inter-simple sequence repeat markers and flow cytometry for the characterization of closely related Citrus limon germplasm*. Biotechnology Letters, Vol. 26, 2004, 1295-1299.

8- CHUNXIAN C, BOWMAN, KD., CHOI, Y.A., DANG, P.H.M., RAO, M.N., HUANG, S.H., SONEJI, J.R., MCCOLLUM, T.G., GMITTER, F.G. *EST-SSR genetic maps for Citrus sinensisand Poncirus trifoliate.* Tree Genetics and Genomes, Vol. 4, 2006, 1–10

9- COLETTA-FILHO, H.D., MACHADO, M.A., TARGON, M.L P.N., MOREIRA, M.C.P.Q.D.G., POMPEU, J.R. *Analysis of the genetic diversity among mandarins (Citrus spp.) using RAPD markers*. Euphytica, Vol.102, N°. 1, 2006, 133-139.

10- CORAZZA-NUNES, M.J., MACHADO, M.A., NUNES,W.M.C., CRISTOFANI, M., TARGON,M.L.P.N. *Assesment of genetic variability in grapefruits (Citrus paradisi) and pummelos (C.maxima) using RAPD and SSR markers.* Euphytica,Vol.126, N°. 2, 2002, 169-176.

11- DENG, Z.N., GENTILE, A., NICOLOSI, E., VARDI, A., TRIBULATO, E . *Identification of in vivo lemon mutants by RAPD markers*. Journal SCI, Vol. 70, 1995, 117-125.

12- FANG, D.Q., ZHANG,WC., XIAO, S.Y. *Studies on taxonomy and evolution of Citrus and its related genera by isozyme analysis*. Acta Phytotaxonomica Sinica**,** Vol 31,1993, 329-352.

13- FANG, D.Q., ROOSE, M.L., KRUEGER, R.R., FEDERICI, C.T. *Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs and inter-simple sequence repeat markers*. Thero Appl Genet, Vol. 95, 1997, 211-219.

14- FANG, D.Q and ROOSE, M.L. *Identification of closely related Citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers*. Thero Appl Genet, Vol.95, 1997, 08-417.

15- FEDERICI, C.T., FANG, D.Q., SCORA, R.W., ROOSE, M.L. *Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed bu RFLP and RAPD analysis*. Thero Appl Genet, Vol. 94,1998, 812-822.

16- GHANBARI, A., JELODAR, N.B., RAHIMIAN, H. *Studing of genetic diversity in Satsuma (Citrus unchiu) Mandarin utilizing microsatellite markers*. International Journal of Agricultural Research, Vol.4, 2009, 88-96.

17- Gogorcena,Y and Ortiz, J.M. *Characterization of sour orange (Citrus aurantium) cultivars*. Journal of The Science of Food and Agriculture, Vol. 48, N°.3, 1989, 275-284.

18- GOLEIN, B., KOLTUNO, W.T., TALAIE, A., ZAMANI, Z., EBADI, A. *Isolation and characterization of microsatellite loci in the lemon (Citrus limon)*. Molecular Ecology, Vol. 5, N°.2, 2004, 253-255.

19- GREEN, R.M., VARDI, A., GALUN, E. The plastom of *Citrus: physical map, variation among Citrus cultivated and species and comparison with related*. Thero Appl Genet, Vol.72, 1986, 170-177.

20- HERRERO, R., ASINS, M.J., CARBONELL, E.A., NAVARRO, L. *Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. Intraspecies and intragenus genetic variability*. Thero Appl Genet, Vol. 92, 1996, 599-609.

21- HUSSEIN, E., ABD-ALLAA, S., AWAD, A., HUSSEIN, M. *Genetic analysis in some Citrus accessions using microsatellite and AFLP based markers*. Arab Journal Biotech, Vol. 6, N°. 2, 2003, 202-223.

22- JANNATI, M., FOTOUHI, R., POURJAN ABAD, A., SALEHI, Z. *Genetic diversity analysis of Iranian Citrus varieties using microsatellite (SSR) based markers*. Horticulture and Forestry, Vol.1, N°. 7, 2009, 120-125.

23- KIJAS, J.M., THOMAS, M.R., FOWLER, J.C. *An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species.* Genome.Vol.38, N°. 2, 1995, 34-55.

24- KIJAS, J.M., THOMAS, M.R., FOWLER, J.C., ROOSE, M.L. *Integration of trinucleotide microsatellite into a linkage map of Citrus*. Thero Appl Genet. Vol. 94, 1997, 701-706.

25- LURO, F., LAIGRET, F., LORIEUX, M., OLLITRAULT, P. *Citrus genome mapping with molecular markers: tow maps obtained by segregation analysis of progeny of one intergeneric cross*. Proceeding International Society Citriculture, Vol. l2, 1996, 862-866.

26- NEI, M and SAITOU, N. The neighbor- joining method: *A new method for reconstructing phylogenetic trees*. Molecular Biology Ecology, Vol 4, 1987, 406-425.

27- NEI, M and LI, W: *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases*. Proc Natl Acad Sci USA, Vol.76, N°. 10, 1979, 5269 – 5273.

28- NICOLOSI, E., DENG, Z.N., GENTILE, A., MALFA, SL., CONTINELLA, G., TRIBULATO, E. *Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers*. Thero Appl Genet, Vol 100, 2000, 1155-1166.

29- NOVELLI, V.M., CRISTOFAN,I M., SOUZA, A., MACHADO, M. *Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (Citrus sinensis L. Osbeck)*. Genetic and Molecular Biology, Vol.29, N°. 1, 2006, 90-96.

30- OLIVEIRA, A.C., GARCIA, A.N., CRISTOFANI, M., MACHADO, MA : *Identification of Citrus hybrids the combination of leaf apex morphology and SSR markers*. Euphytica, Vol.128, 2002, 379-403.

31- PANG, X.M., HU, C.G., DENG, X.X. *Phylogenetic relationships among Citrus and its relatives as revealed by SSR markers*. Acta Genetica Sinica, Vol. 30, 2003, 81-87.

32- ROHLF FJ : NTSYS- pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02 g, 1993, Exeter Software, Setauket New York.

33- ROOSE, M.L., FENG, D., CHENG, F.S., TAYYAR, R.I., FEDERIC,I CT., KUPPER, R.S., GOREN, R., GOREN, R., GOLDSCHMID, E.E. *Mapping the citrus genome.*. Acta Horticulturae,Vol. 535, 2000, 25 - 32.

34- ROOSE, M.L., BARKELY, N.A., KRUEGER, R.R., FEDERICI, C.T. *Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs)*.Thero Appl Genet, Vol 112, 2006, 1519-1531.

35- RUIZE, C., PAZ BRETO, M., ASINS, M.J. *A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers*. Euphytica, Vol 112, 2000, 89-94.

36- SCORA, R.W : *On the history and origin of Citrus.* Bull Torr Bot Club 102, 1975, 369-375.

37- SHAHSAVAR, A.R., IZADPANAH, K., TAFAZOLI, E., TABATABAE, I. *Characterization of Citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers*. Scientia Horticuture, Vol.112, N°.3, 2007,310-314.

38- SWINGLE, W.T and REECE, P.C. The botany of Citrus and its wild relatives.In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD.*Th Citrus Industry*.Vol 1. University of California Press, Berkely,1967, 190-430.

39- TANAKA T : *Fundamental discussion of citrus classification*. Studia Citrologia,Vol. 14, 1977, 1-6.

40- TARGON, M.L.P.N., MACHADO, M.A., COLETTA FILHO, H.D., CRISTOFANI, M. *Genetic polymorphism of sweet orange (Citrus sinensis [L.] Osbeck) varieties evaluated by random amplified polymorphic DNA.* Acta Horticulturae,Vol. 535, 2000, 51-54.

41- WEBBER, J.H : *Cultivated varieties of Citrus*. In: Webber HJ, Batchelor LD.Th Citrus Industry.Vol 1. University of California Press, Berkely, 1943, 475-668.

42- WEIR, B.S. Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Assosiates,1990,445 pp.

43- ZANE, L., BARGELLONI, L., PATAMELLO, T. *Strategies for microsatellite isolation*. Molceular Ecology, Vol 11, 2002, 1-6.

44- ZHAO. X and KOCHERT. G. *Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)n microsatellite from rice (Oryza sativa L.)*. Plant Molecular Biology, Vol. 21, 1993, 607-614.