Archive of SID.ir

Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Valuation of genetic diversity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) based on the comparison of ISSR and SSR marker efficiency

Fatemeh Hosseini

MSc Student, Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail address: hosseinimhfa@gmail.com

Azadeh Niknejad

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail address: niknejad@khu.ac.ir

Behzad Sorkhilaleloo

Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail address: bsorkhi@gmail.com

Jahangir Abbasi-Kohpalekani

Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail address: jabbaskohpayegani@yahoo.com

Manni Marefatzadeh-Khameneh

Researcher, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail address: mani.marefatzadeh@gmail.com

Abstract

Objective

This study was conducted to evaluate the genetic diversity of tomato accessions selected from the core collection of National Plant Gene Bank of Iran (NPGBI) based on a comparative assessment of SSR and ISSR markers. Genetic diversity of species and cultivars is necessary to increase productivity and production, and if diversity is reduced, species and cultivars are in danger of extinction. Due to the importance of tomato as the second most consumed crop among vegetables, it is necessary to study it. Other objectives of this study are to compare the performance of SSR and ISSR markers in differentiating tomato genotypes and to find primers with the highest polymorphism.

Materials and methods

In this study, genetic diversity among and within tomato accessions collected from 8 geographic regions of Iran and 22 countries from the world were evaluated using 13 ISSR and 5 SSR primers.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Results

The number of polymorphic alleles and the average of resolving power and marker index were related to the ISSR marker. However, the highest values of PIC for studied markers were obtained in the SSR primers. The molecular analysis of variance showed that both markers were suitable for the evaluation of diversity among species. Also, genetic diversity among the species was higher than within the species. The highest values of genetic diversity features were obtained in SSR primers. The lowest parameters were observed in the *S. lycopersicum* cherry in comparison to *S. lycopersicum* esculentum. In the cluster analysis, tomato accessions were distributed into four groups. PCoA was obtained for a more accurate explanation of the grouped accessions. These results indicated that SSR primers have had more tangible efficiency in showing the genetic diversity between Iranian and *S. lycopersicum* Cherry populations, while ISSR primers distinguished the *S. lycopersicum* esculentum accessions better than others.

Conclusions

The results indicated high genetic diversity among and within tomato species. According to genetic diversity features in both markers, it can be expected that the use of ISSR and SSR primers will be more effective for preparing genetic maps and studying population structure and/or accession grouping, respectively.

Keywords: Principal coordinate analysis (PCoA), Inter-simple sequence repeat (ISSR), Simple sequence repeat (SSR), Core collection.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Hosseini F, Niknejad A, Sorkhilaleloo B, Abbasi-Kohpalekani J, Marefatzadeh-Khameneh M (2023) Valuation of genetic diversity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) based on the comparison of ISSR and SSR marker efficiency. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (2), 63-82.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (2), 63-82. DOI: 10.22103/jab.2023.20016.1422

Received: February 20, 2023. Received in revised form: April 08, 2023.

Accepted: April 09, 2023. Published online: June 10, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸
دانشگاه شهید باهنر کرمان
انجمن بیوتکنولوژی ایران

ارزیابی تنوع ژنتیکی گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) مبتنی بر مقایسه کارآیی دو نشانگر SSR و ISSR

فاطمه حسینی

دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: hosseinimhfa@gmail.com

آزاده نیک نژاد

*نویسنده مسئول: استادیار بیوتکنولوژی، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: abcdefg@ac.ir

بهزاد سرخی لله‌لو

استادیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: bsorkhi@gmail.com

جهانگیر عباسی کوه‌پالکانی

استادیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: jabbaskohpayegani@yahoo.com

مانی معرفت زاده خامنه

محقق، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: mani.marefatzadeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۰

چکیده

هدف: این تحقیق به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های گوجه فرنگی متعلق به کلکسیون هسته بانک ژن گیاهی ملی ایران انجام شد. هم‌چنین بررسی مقایسه‌ای کارآیی دو نشانگر مولکولی SSR و ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی و قابلیت تفکیک توده‌های مختلف گوجه فرنگی از اهداف دیگر این مطالعه بود.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مواد و روش ها: در این تحقیق تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای ۳۰ توده گوجه فرنگی متعلق به تواحی مختلف ایران و جهان ارزیابی شد. برای این منظور نمونه‌های برگی مورد نیاز در مرحله چهار برگی از توده‌های مورد بررسی برداشت و پس از استخراج DNA انگشت نگاری با استفاده از ۱۳ نشانگر ISSR و ۵ نشانگر SSR انجام شد.

نتایج: تعداد قطعات تکثیر شده چند شکل و متوسط شاخص‌های قدرت تفکیک و شاخص نشانگری برای نشانگر ISSR بیشتر از SSR بود. با این حال محتوای اطلاعات چندشکلی در نشانگر SSR بیشتر از ISSR به‌دست آمد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که هر دو سیستم نشانگری کارآیی مطلوبی در ارزیابی تنوع بین گونه‌ای داشتند، به‌طوری‌که بیشترین تنوع ژنتیکی مشاهده شده در بین گونه بیشتر از درون گونه برآورد شد. در برآورد پارامترهای ژنتیکی نیز نشانگر SSR در کلیه پارامترها مقادیر بزرگ‌تری را در مقایسه با نشانگر ISSR داشت. هم‌چنین این مقادیر در *S. lycopersicum* esculantum بیشتر از *S. lycopersicum* cherry بود. در تجزیه خوشه‌ای بر اساس هر کدام از نشانگرهای مورد استفاده، توده‌های گوجه فرنگی مورد بررسی در ۴ گروه قرار گرفتند. از تجزیه به مختصات اصلی به‌منظور ارزیابی دقیق‌تر گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای استفاده و مشخص شد که آغازگرهای SSR از کارآیی ملموس‌تری در بیان تنوع ژنتیکی موجود در بین توده‌های ایرانی و *S. lycopersicum* Cherry برخوردار بودند، در حالی که آغازگرهای ISSR توده‌های متعلق به *S. lycopersicum* esculantum را بهتر متمایز نمودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بالا در درون و بین گونه‌های گوجه فرنگی مورد مطالعه بود. با توجه به خصوصیات مشاهده شده در هر کدام از نشانگرهای مورد استفاده می‌توان انتظار داشت که کاربرد آغازگرهای ISSR برای اشباع نقشه‌های ژنتیکی و آغازگرهای SSR در بررسی ساختار جمعیت و گروه‌بندی توده‌های مختلف از کارآیی بالاتری برخوردار باشد.

کلید واژه‌ها: تجزیه به مختصات اصلی، توالی‌های تکراری ساده میانی، ریزماهواره، کلکسیون هسته.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: حسینی فاطمه، نیک نژاد آزاده، سرخی لله‌لو بهزاد، عباسی کوه‌پالکانی جهانگیر، معرفت زاده خامنه مانی (۱۴۰۲) ارزیابی تنوع ژنتیکی گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) مبتنی بر مقایسه کارآیی دو نشانگر SSR و ISSR. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۲)، ۶۳-۸۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مقدمه

بررسی جمعیت‌های متنوع گیاهی از نقطه نظر جوانب مختلف با هدف ارزیابی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی درون و بین گونه‌ای، مطالعه و ارزیابی صفات مهم اصلاحی و ارتباط بین آنها و همچنین شناسایی سهم تنوع ژنتیکی صفات و تبیین نقش صفات در اصلاح محصول، از مهمترین رویه‌های برنامه‌های به‌نژادی گیاهی می‌باشد. تنوع به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و اساسی‌ترین ملزومات برنامه‌های به‌نژادی در افزایش بهره‌وری و تولید محسوب می‌شود که مخاطرات پیش‌روی آن امکان تولید مجدد واریته‌ها، ارقام و گونه‌های خویشاوند منقرض شده را با مشکلات عدیده‌ای مواجه خواهد ساخت (Sazmosi et al. 2010). بنابراین حفظ و مدیریت صحیح ژرم‌پلاسم‌های موجود (Lotti et al. 2008) و همچنین ارزیابی تنوع ژنتیکی آنها (Naz et al. 2013; Gonias et al. 2019; Hesison et al. 2019; Marefatzadeh-Khameneh et al. 2021) از اهمیت وافری برخوردار است. بدون شک موفقیت برنامه‌های اصلاحی مستلزم دسترسی به منابع ژنتیکی قوی و ژرم پلاسم متنوع است که بر اساس اصول عملی صحیح جمع‌آوری، ارزیابی و نگهداری شده باشند (Eiadathong et al. 2000). آگاهی از تنوع و مدیریت منابع ژنتیکی ضمن حفاظت از ذخایر ژنتیکی، قابلیت استفاده از آنها را در برنامه‌های به‌نژادی ممکن می‌سازد و به به‌نژادگران گیاهی کمک می‌کند تا از این تنوع جهت افزایش کارآیی صفات کمی، کیفی و افزایش عملکرد استفاده کنند (Ahmadzadeh et al. 2011).

گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) به‌عنوان مهم‌ترین محصول گلخانه‌ای جهان و دومین محصول پر مصرف بین سبزیجات (پس از سیب زمینی) محسوب می‌شود که به‌علت ویژگی‌های رشدی و قابلیت سازگاری بالا در سراسر جهان گسترش یافته است (Robertson and Labate 2007). ارزش غذایی بالا، مقادیر بالای ویتامین‌های A و C در میوه (USDA 2021) و همچنین میوه غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی ضد سرطان (Leonardi et al. 2000) از دیگر دلایل رغبت روزافزون به مصرف بالای گوجه فرنگی در رژیم غذایی مردم جهان است. این موارد بخشی از دلایلی است که پژوهشگران را راغب نمود تا پروژه ژنوم این گیاه را در سال ۲۰۰۴ آغاز و در سال ۲۰۰۸ به اتمام برسانند (Sato et al. 2012) و تا دهه ۱۹۸۰ میلادی بیشتر روش‌های به‌نژادی بر پایه انتخاب‌های فنوتیپی انجام می‌شد (Foolad 2012). با توسعه نشانگرهای مولکولی و نقشه‌های ژنتیکی، گرایش به استفاده از فناوری‌های نوین در بهبود خصوصیات گوجه فرنگی فزونی یافت و نشانگرهای متعددی برای اهداف به‌نژادی و تهیه نقشه‌های ژنتیکی مانند نشانگرهای مولکولی SSR (Mazzucato et al. 2008)، SNP (Hu et al. 2012; Corrado et al. 2014)، RAPD (Ezekiel et al. 2011; Naz et al. 2013; Herison et al. 2018)، ISSR (Tikunov et al. 2003; Figueiredo et al. 2015; Henareh et al. 2016; Sharifova et al. 2017; Kiani & Siahchehreh 2018; Vargas et al. 2020)، RAPD و ISSR (Hassan et al. 2013)، RAPD و SSR (Priya et al. 2019) و SCoT و ISSR (Shahlaei et al. 2014) استفاده شد. نشانگرهای مولکولی DNA یکی از قدرتمندترین ابزارها برای مطالعات تنوع ژنتیکی، روابط فیلوژنتیکی و انتخاب گیاهان برتر هستند. در واقع این نشانگرها مهم‌ترین و کاربردی‌ترین سیستم‌های نشانگری به‌علت گستردگی زیاد، تظاهر در اولین سطح بیان ژن، دقت، تنوع و چندشکلی زیاد هستند (Naghavi et al. 2009). در میان

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

نشانگرهای مولکولی، توالی‌های تکراری ساده میانی (ISSR) و توالی‌های ساده تکراری (SSR) به طور گسترده‌ای در مطالعات مرتبط با بررسی تنوع ژنتیکی استفاده می‌شوند (Carvalho et al. 2015). نشانگر ISSR علی‌رغم دارا بودن چندین جایگاه ژنی، تکرارپذیری بالا، عدم نیاز به داشتن اطلاعات قبلی نسبت به DNA و سهولت کاربرد، به عنوان یک نشانگر غالب قادر به تمایز نمونه‌های هموزیگوت و هتروزیگوت نمی‌باشند. از سوی دیگر، نشانگرهای هم‌بارز SSR نه تنها دارای خصوصیت چندآللی هستند بلکه قابل تمایز در تمامی دسته‌های ژنوتیپی می‌باشند (Oliveira et al. 2022). از جایی که هر کدام از این نوع نشانگرها دارای مزایا و معایبی هستند، لذا ترکیب چندین نوع نشانگر می‌تواند برای درک بهتر تنوع ژنتیکی مفیدتر باشد (Mirzaei, 2021).

در یکی از این مطالعات Vargas et al. (2020) در ارزیابی تنوع ژنتیکی گوجه فرنگی با استفاده از نشانگر ISSR علاوه بر اینکه چندشکلی بالایی در حدود ۹۰ درصد در قطعات تکثیر شده مشاهده نمودند بلکه میزان محتوای اطلاعات چند شکلی بالایی (PIC=۰/۲۷) نیز به‌دست آمد. همین طور در مطالعات Henareh et al. (2016) بررسی تنوع ژنتیکی ۹۳ توده گوجه فرنگی با استفاده از ۱۴ آغازگر ISSR تنوع بالایی در ژرم‌پلاسم را نشان داد که میزان پارامترهای ژنتیکی تنوع شانون (I) و نی (He) را به‌ترتیب ۰/۳۶۵ و ۱/۳۳ گزارش کردند. در پژوهش دیگر سال ۲۰۱۶ توسط Kumar et al نیز با استفاده از ۱۱ نشانگر SSR اقدام به ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۹ ژنوتیپ گوجه فرنگی نمودند. در این مطالعه میزان محتوای اطلاعات چند شکلی از ۰/۹۷۹ تا ۰/۹۹۵ متغیر بود که نشان از کارآیی بالای این آغازگرها در تشخیص تنوع موجود در توده‌های مورد بررسی داشت. همین طور Gonias et al. (2019) به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۴ واریته مدرن، ۷۱ واریته بومی و ۲۲ هیبرید تجاری گوجه فرنگی از نه نشانگر SSR و دو نشانگر SCAR استفاده نمودند. نتایج نشان دهنده وجود سطح بالای تنوع ژنتیکی در بین جمعیت مورد مطالعه با تعداد متوسط ۹/۶ آلل در هر لوکوس و محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۷۴ بود. هم‌چنین نشانگرهای SSR در مجموع با ۵۶ آلل و سطح بالاتر چندشکلی توانستند تمایز بیشتری را بین جمعیت مورد مطالعه ایجاد نمایند. این نتایج متفاوت می‌تواند در ارتباط با توده‌ها و ارقام گوجه فرنگی، نوع سیستم نشانگری و آغازگرهای مورد استفاده و تعداد آنها باشد. اگر چه تاکنون مطالعات زیادی در ارتباط با بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای گوجه فرنگی انجام شده است، در این مطالعه سعی شد تا علاوه بر بررسی تنوع ژنتیکی بخشی از ژرم‌پلاسم گوجه فرنگی بانک ژن گیاهی ملی ایران اقدام به بررسی و مقایسه کارآیی دو نوع سیستم نشانگری SSR و ISSR از نظر برآورد پارامترهای ژنتیکی و گروه بندی توده‌های بررسی شده شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۳۰ توده گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum* sp.) از ژرم پلاسم بانک ژن گیاهی ملی ایران واقع در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه و مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). توده‌های مورد نظر در گلخانه

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

شیشه‌ای بانک ژن گیاهی ملی ایران در سینی‌های مخصوص کشت حاوی کوکوپیت:پرلیت (۱:۳) کشت و در شرایط دمایی ۳±۲۵، رطوبت ۳±۷۵ درصد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دو مرتبه آبیاری در هفته نگهداری شدند.

جدول ۱. فهرست توده‌های ژرم‌پلاسم گوجه فرنگی مورد بررسی به همراه محل جمع‌آوری

Table 1. Studied tomato (*S. lycopersicum*) list and origin

ردیف Row	کد بانک ژن Gene bank code	منشأ Origin	گونه Specie	ردیف Row	کد بانک ژن Gene bank code	منشأ Origin	گونه Specie
1	315031	ناشناخته Unknown	esculentum	16	48044	آمریکا USA	esculentum
2	315036	ناشناخته Unknown	esculentum	17	48051	آمریکا USA	cherry
3	47779	ایران–مازندران Iran-Mazandaran	esculentum	18	48087	دانمارک Denmark	esculentum
4	47798	ایران–فارس Iran-Fars	esculentum	19	48107	هلند Netherlands	esculentum
5	47807	ایران–کردستان Iran-Kurdistan	esculentum	20	48127	هلند Netherlands	cherry
6	47812	ایران–ایلام Iran-Elam	esculentum	21	48128	هلند Netherlands	esculentum
7	47819	ایران–بوشهر Iran-Bushehr	esculentum	22	48162	انگلستان UK	cherry
8	47846	آمریکا USA	esculentum	23	48165	آذربایجان Azerbaijan	cherry
9	47889	مجارستان Hungary	esculentum	24	48174	آمریکا USA	esculentum
10	47906	هلند Netherlands	esculentum	25	48183	مجارستان Hungary	cherry
11	47941	هلند Netherlands	esculentum	26	48272	ایران Iran	esculentum
12	47948	بلغارستان Bulgaria	esculentum	27	48276	ایران Iran	esculentum
13	47958	روسیه Russia	esculentum	28	48289	کره جنوبی South Korea	esculentum
14	47975	مجارستان Hungary	esculentum	29	48302	آمریکا USA	esculentum
15	47998	آمریکا USA	esculentum	30	Ch-falat	ایران Iran	esculentum

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

در مرحله ۳-۲ برگی اقدام به جمع‌آوری نمونه برگی مورد نیاز شد. بلافاصله نمونه‌های برگ تازه و جوان با کمک ازت مایع منجد و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌های برگی منجمد با استفاده از ازت مایع پودر و میزان ۰/۲ گرم از هر نمونه به‌منظور استخراج DNA ژنومی در تیوب ۲ میلی‌لیتری ریخته شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از دستورالعمل تغییر یافته CTAB انجام شد (Lodhi et al. 1994). برای اطمینان از صحت استخراج انجام شده اقدام به الکتروفورز نمونه‌های مورد نظر بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد شد. سپس غلظت DNA موجود در هر نمونه با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجیده و غلظت هر نمونه به ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر رسانده شد. به‌منظور بررسی تنوع موجود در توده‌های مورد بررسی از تعداد ۱۳ نشانگر ISSR و ۵ نشانگر SSR استفاده شد که مشخصات آغازگرهای دارای قطعات باندی چند شکل و قابل امتیازدهی در جدول ۲ درج شده است.

با استفاده از PCR گرادیانت تکثیر آغازگرها در دماهای مختلف بررسی و دمای مناسب انتخاب شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای آغازگرهای ISSR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر آب دیونیزه (۲ میکرولیتر برای هر آغازگر SSR)، ۱ میکرولیتر آغازگر ISSR (۱ میکرولیتر آغازگر رفت و ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت برای نشانگر SSR)، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (غلظت ۵۰ نانوگرم) و ۵ میکرولیتر Master Mix 2X PCR شرکت پارس طوس تهیه شد. سپس مخلوط واکنش در دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad Thermal Cycler قرار گرفت و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر اساس برنامه حرارتی مشخص شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه میانی شامل ۱ دقیقه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه اتصال آغازگر در دمای بهینه مندرج در جدول ۲ برای هر آغازگر و ۱ دقیقه توسعه آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای آغازگرهای SSR شامل ۲ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت و ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (غلظت ۵۰ نانوگرم) و ۵ میکرولیتر Master Mix 2X PCR شرکت پارس طوس در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر تهیه شد. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای نشانگرهای SSR شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه میانی شامل ۴۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه اتصال آغازگر در دمای بهینه مندرج در جدول ۲ برای هر آغازگر و ۱ دقیقه توسعه آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. جداسازی قطعات تکثیر شده با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد برای نشانگر ISSR و ۳ درصد برای نشانگر SSR به همراه بافر TAE 1X انجام شد. آشکارسازی قطعات تکثیر شده نیز با رنگ آمیزی توسط Safeview و عکس برداری با دستگاه Gel Document انجام شد. نمره‌دهی الگوهای باندی به‌صورت صفر و یک به‌ترتیب برای عدم وجود و وجود الگوی باندی صورت گرفت. سپس شاخص‌های مختلفی هم‌چون محتوای اطلاعات چند شکلی، قدرت تفکیک، شاخص نشانگر، تعداد کل قطعات تکثیری و تعداد قطعات تکثیری چند شکل به‌منظور بررسی و مقایسه کارآیی انواع نشانگرهای مولکولی و آغازگرها به‌کار گرفته شد.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای ISSR و SSR به‌همراه شاخص‌های بررسی تنوع ژنتیکی آنها

Table 2. Characteristics of ISSR and SSR primers and their genetic diversity features

قدرت تفکیک Resolution	شاخص نشانگری Marker index	تعداد باندهای چندشکل Number of polymorphic bands	تعداد کل باند Total number of bands	محتوای اطلاعات چندشکلی Polymorphic information content	دمای اتصال Annealing temperature	توالی (´۳→´۵)	آغازگر
Rp	**MI**	**NPB**	**TAB**	**PIC**	**Ta(°C)**	**Sequence (5'-3')**	**Primer**
2.190	3.614	7	8	0.224	45.8	$(GA)_4$CAGAGACAT	ISSR-3
1.429	2.532	6	6	0.264	53.7	$(AC)_8$Y(C/T)A	ISSR-9
1.635	3.004	4	4	0.216	49.9	GCAGAGGAGAGGAGA	ISSR-14
2.206	3.364	6	7	0.297	48.3	$(GA)_8$A	UBC-812
1.492	2.450	7	7	0.364	56.2	$(AG)_8$YG	12F
1.778	2.908	6	6	0.369	56.2	AGTCGTAGT$(AC)_8$	UBC-889
2.254	0.310	6	7	0.428	49.8	$(AG)_8$T	B2
0.102	1.749	4	4	0.301	53.3	$(AC)_8$YG	K10
2.095	3.630	11	11	0.319	52.2	$(AC)_8$G	K12
2.222	2.322	4	7	0.374	57.3	$(GA)_8$C	K18
1.508	2.321	6	6	0.437	54.6	$(GA)_8$YC	K11
1.302	1.695	3	4	0.385	48.3	$(AC)_8$	UBC-816
0.476	0.359	4	4	0.359	53.9	F: CCACAAACAATTCCATCTCA R: GCTTCCGCCATACTGATACG	SSR-63
0.444	0.431	2	2	0.462	55.3	F: AAATAATTAGCTTGCCAATTG R: CAAACAACATGAGAAGCAGCA	TG7-18
0.413	0.418	2	2	0.482	57.5	F: AAATAATTACAGCTTGCCAATTG R: CTGAAAGCAGCAACAGTATTT	LEEF1AA
0.269	0.205	2	2	0.433	59.3	F: AGCATGGGAAGAAGACACGT R: TTGAGCAAAACATCGCAATC	TMS33
0.476	0.233	2	2	0.361	57.3	F:TGTAGATAACTCCTAGCGACAATC R: TTGAGCAAAACATCGCAATC	LETA019
1.684	**2.492**	**5.833**	**6.417**	**0.332**	**میانگین**	**ISSR**	
0.416	**0.329**	**2.4**	**2.4**	**0.433**	**میانگین**	**SSR**	

روابط محاسباتی هر یک از این شاخص‌ها در ذیل آورده شده است:

$$PIC = 1 - (p^2 + q^2)$$ رابطه ۱)

$$Rp = \sum I_b, \qquad I_b = 1 - [2 \times (0.5 - P_i)]$$ رابطه ۲)

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

$$MI = PIC \times EMR, \quad EMR = N_p \left({}^{N_p}/_{N}\right)^4$$ رابطه ۳)

که در این روابط، p_i، N_p و N به‌ترتیب نشان دهنده فراوانی حضور و عدم حضور آلل (به ترتیب ۱ و ۰)، تعداد باندهای چند شکل و تعداد کل باندهای تکثیر شده از یک آغازگر می‌باشند (Powell et al. 1996). کلیه محاسبات با استفاده از برنامه Excel انجام شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای از تجزیه واریانس مولکولی توسط نرم‌افزار GenAlEX6.41 استفاده شد. پارامترهای مختلف تنوع ژنتیکی در هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه شامل درصد لوکوس‌های چند شکل، شاخص شانون، تنوع ژنی نی، تعداد آلل‌های مشاهده شده، تعداد آلل‌های مؤثر، ضریب تمایز ژنی و جریان ژنی نیز با این نرم‌افزار محاسبه شد. گروه‌بندی نمونه‌های مورد بررسی بر اساس ماتریس عدم تشابه جاکارد و به‌روش Neighbor-joining و با استفاده از نرم‌افزار DARwin6.0 انجام گرفت (Perrier et al. 2003). در انتها از تجزیه به مختصات اصلی توسط نرم‌افزار GenAlEX6.41 جهت ارزیابی و تأیید نتایج تجزیه خوشه‌ای و گروه‌بندی توده‌ها استفاده شد.

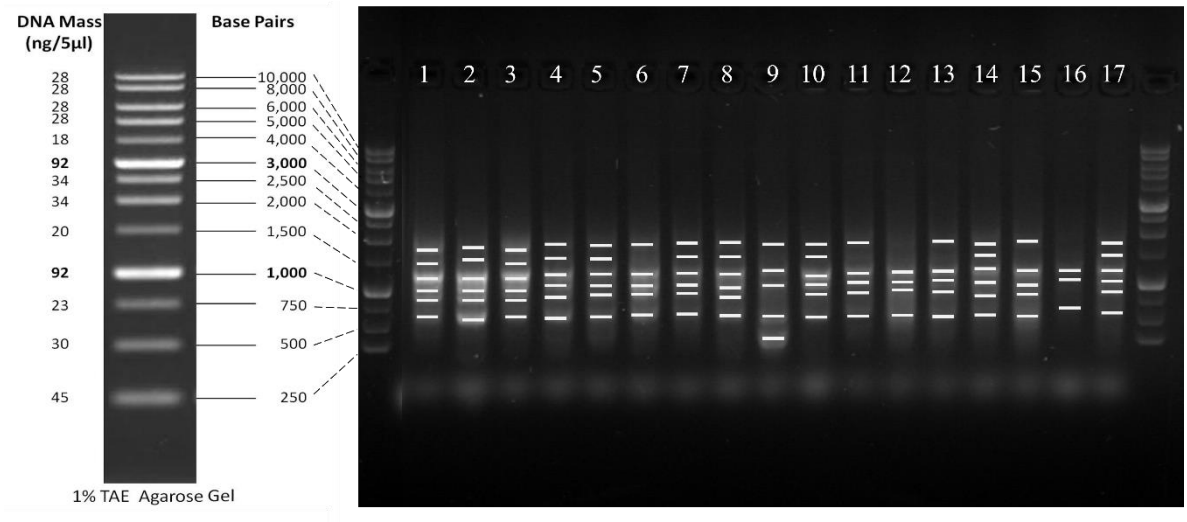
نتایج و بحث

بررسی تنوع ژنتیکی گوجه فرنگی با استفاده از نشانگرهای مولکولی در مطالعات زیادی صورت گرفته است. به‌طوری‌که در این مطالعات استفاده از پارامترهای مختلف تنوع ژنتیکی شامل محتوای اطلاعات چند شکلی، قدرت تفکیک، شاخص نشانگری، تعداد قطعات تکثیر شده و تعداد قطعات تکثیر شده چند شکل به‌عنوان معیارهای اولیه در شناسایی نشانگرهای کارآمد برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ارتباط بین جمعیت‌های مورد مطالعه مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه سعی شد تا با استفاده از این پارامترها و دو نشانگر ISSR و SSR اقدام به بررسی میزان تنوع ژنتیکی توده‌های گوجه فرنگی مورد ارزیابی شود (شکل ۱ و جدول ۲). همان‌طور که در جدول ۲ ملاحظه می‌شود دو سیستم نشانگری مورد استفاده در مجموع ۸۹ قطعه تکثیر شده داشتند که ۸۲ قطعه چند شکل بودند. در بین آغازگرهای ISSR با ۷۷ قطعه تکثیری و متوسط چند شکلی ۵/۸۳۳ قطعه، بیشترین و کم‌ترین تعداد قطعه تکثیر شده مربوط به آغازگرهای K12 با ۱۱ قطعه و ISSR1-14، K10 و UBC-816 با ۴ قطعه بود. قطعات تکثیر شده در آغازگرهای ISSR-3، UBC-812، B2، k18 و UBC-816 چند شکل و در آغازگرهای ISSR-9، ISSR-14، 12F-UBC-889، K10، K12 و K11 فاقد چند شکلی بودند. شاخص اطلاعات چندشکلی با متوسط ۰/۳۳۲ از ۰/۲۱۶ برای آغازگر ISSR-14 تا ۰/۴۳۷ برای آغازگر K11 متغیر بود که نشان از قابلیت آغازگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی و چند شکلی در نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد. کم‌ترین و بیشترین میزان شاخص نشانگری با متوسط ۲/۴۹۲ به‌ترتیب مربوط به آغازگرهای B2 (۰/۳۱۰) و K12 (۳/۶۳۰) بود. قدرت تفکیک آغازگرهای مورد استفاده نیز از ۰/۱۰۲ تا ۲/۲۵۴ به‌ترتیب برای آغازگرهای K10 و B2 متفاوت بود.

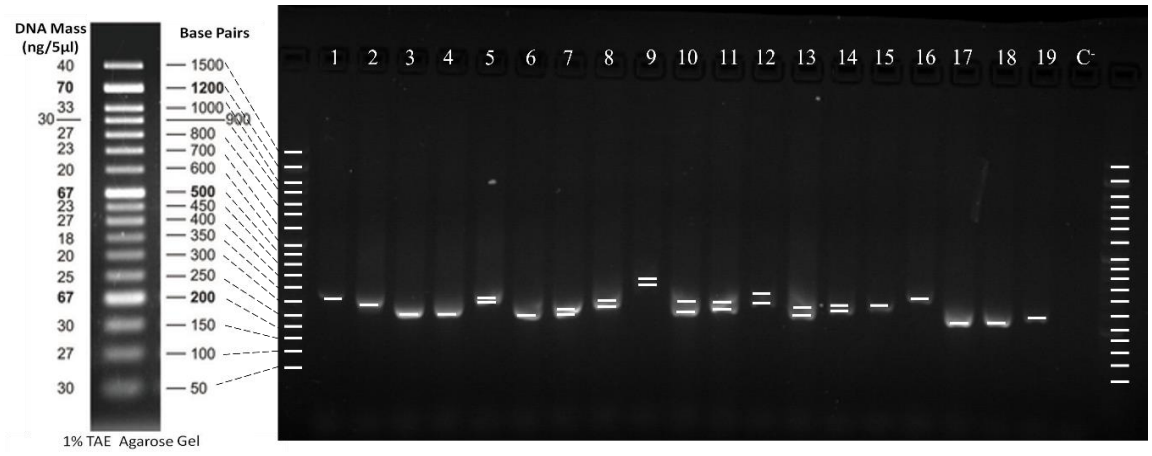
Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

A)



B)



شکل ۱. الگوی باندی توده های گوجه فرنگی مورد مطالعه بر اساس آغازگر ISSR-3 (A) و آغازگر SSR-63F (B).

Figure 1. Scoring of the bands of tomato accessions resulting from the marker ISSR-M9 (A) and marker SSR- Xgwm192-5D (B)

آغازگرهای SSR مورد استفاده نیز تعداد ۱۲ قطعه چندشکل تکثیر نمودند که بیشترین قطعه تکثیر شده مربوط به آغازگر SSR-63 با ۴ قطعه چندشکل بود. دامنه تغییرات محتوای اطلاعات چندشکلی از ۰/۳۵۹ برای آغازگر SSR-63 تا ۰/۴۸۲ برای آغازگر LEEF1AA و متوسط ۰/۴۳۳ تخمین زده شد. کم‌ترین و بیشترین شاخص نشانگری با متوسط ۰/۳۲۹ به‌ترتیب مربوط به آغازگرهای TMS33 (۰/۲۰۵) و TG7-18 (۰/۴۳۱) بود. قدرت تفکیک این آغازگرها نیز از ۰/۲۶۹ (TMS33) تا ۰/۴۷۶ (SSR-63 و LETA019) با متوسط ۰/۴۱۶ متغییر بود. با بررسی نتایج به‌دست آمده در این بخش مشاهده شد که آغازگرهای SSR در مقایسه با آغازگرهای ISSR دارای محتوای اطلاعات چندشکلی بیشتری بودند ولی از نظر شاخص نشانگری و قدرت تفکیک مقادیر

Archive of SID.ir

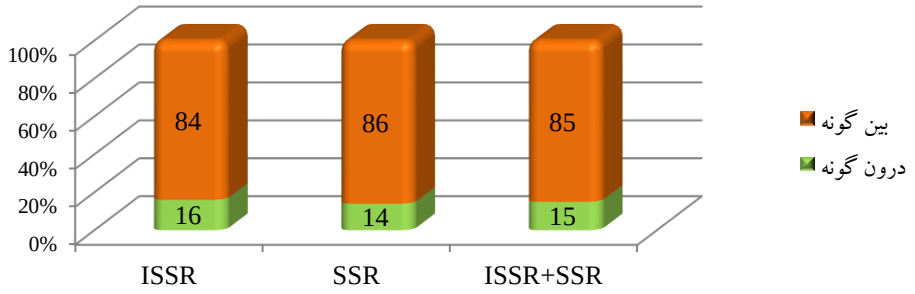
Archive of SID.ir

کم‌تری را به خود اختصاص دادند. به عبارت دیگر با وجود اینکه آغازگرهای ISSR تعداد قطعات چند شکل بیشتری تکثیر نمودند و از شاخص نشانگری و قدرت تفکیک بیشتری در مقایسه با آغازگرهای SSR برخوردار بودند؛ با این وجود محتوای اطلاعات چند شکلی در آغازگرهای SSR بیشتر بود. این امر تا حدودی با مکانیسم عمل نشانگرهای مورد استفاده در ارتباط است. در حقیقت سطح بالای چند شکلی به‌علت وقوع تعداد متنوع تکرارها در نواحی ریزماهواره‌ای است که می‌تواند به آسانی توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تشخیص داده شوند (Kalia et al. 2011). در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف گوجه فرنگی (۶۱ واریته مختلف) Fan-juan et al. (2010) از نشانگرهای SSR و RAPD استفاده کردند که به‌ترتیب ۸۶۹ و ۲۰۶۲ قطعه تکثیر شده به دست آمد. با این حال، چندشکلی مشاهده شده در نشانگر SSR بیشتر از چندشکلی نشانگر RAPD بود (به‌ترتیب ۱۰۰ و ۴۳/۸۴ درصد). علاوه بر این، نشانگر RAPD ضریب شباهت بیشتری (۰/۷۹) در مقایسه با نشانگر SSR (۰/۵۶) از خود نشان داد. این نتایج نشان دهنده کارآیی بالاتر نشانگر SSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های گوجه فرنگی مورد بررسی در این مطالعه می‌باشد. باید این موضوع را نیز مد نظر قرار داد که نشانگرهای ISSR به علت این‌که برای طراحی و استفاده آن‌ها نیازی به داشتن اطلاعات قبلی در مورد ژنوم گیاه نیست، هم‌چنین دارای توارث‌پذیری ساده و تکرارپذیری بالایی هستند به وفور در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Reddy et al. 2002).

به کمک تجزیه واریانس مولکولی تنوع ژنتیکی مشاهده شده در توده‌های گوجه فرنگی مورد بررسی به دو جزء بین و درون گونه‌ای تفکیک شد (شکل ۲). در این مطالعه میزان تنوع بین گونه‌ای در هر دو نشانگر ISSR، SSR و مجموع داده‌های ادغام شده آنها بیشتر از تنوع درون گونه‌ای (به‌ترتیب ۸۴، ۸۶ و ۸۵ در برابر ۱۶، ۱۴ و ۱۵ درصد) بود. به نظر می‌رسد که استفاده از آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه نشان از کارآیی بالایی آنها در تفکیک توده‌های گوجه فرنگی مورد بررسی از نظر گونه‌های موجود دارد. به‌طوری‌که این نشانگرها به‌خوبی توانستند توده‌های *S. lycopersicum* cherry را از *S. lycopersicum* esculantum تفکیک نمایند. رسولی آذر و همکاران (۱۳۹۸) نیز سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در بین جمعیت‌های گوجه فرنگی مطالعه شده بر اساس نشانگر ISSR مشاهده کردند. در مرحله بعد پارامترهای ژنتیکی تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، شاخص تنوع شانون (I)، تنوع ژنی نی (He) و درصد مکان‌های چندشکلی (PPL%) بر اساس نشانگرهای ISSR، SSR و مجموع داده‌های ادغام شده آنها محاسبه و نتایج آن در جدول ۳ درج گردید. همان‌طور ملاحظه می‌شود مقادیر به‌دست آمده برای تمامی پارامترها بر اساس نشانگر SSR از ISSR بیشتر بود. هم‌چنین این مقادیر برای *S. lycopersicum* esculantum نیز از *S. lycopersicum* cherry بیشتر بود که نشان از تنوع بیشتر موجود در آنها دارد.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



شکل ۲. برآورد نسبت واریانس ژنتیکی بین و درون گونه‌ای در توده‌های مختلف گوجه فرنگی بر اساس نشانگرهای ISSR، SSR و ISSR+SSR

Figure 2. Analysis of molecular variance (AMOVA) between two populations of tomato (*S. lycopersicum*) using ISSR, CBDP, and ISSR+SSR markers

جدول ۳. مقادیر پارامترهای ژنتیکی برآورد شده در گونه‌های گوجه فرنگی توسط نشانگرهای SSR و ISSR

Table 3. Genetic diversity parameters of tomato (*S. lycopersicum*) species exhibited SSR and ISSR

درصد مکان-های چندشکلی Percentage of polymorphic loci PPL%	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected heterozygosity He	شاخص تنوع ژنتیکی شانون Shannon genetic diversity index I	تعداد آلل‌های مؤثر The number of effective alleles Ne	تعداد آلل‌های مشاهده شده The number of observed alleles Na	گونه Specie	نشانگر Marker
88.31	0.30	0.45	1.52	1.87	*S. lycopersicum esculentum*	ISSR
36.36	0.15	0.22	1.28	1.14	*S. lycopersicum* cherry	
62.34	0.23	0.34	1.40	1.51	میانگین	
100.00	0.31	0.48	1.48	2.00	*S. lycopersicum esculentum*	SSR
75.00	0.28	0.41	1.50	1.50	*S. lycopersicum* cherry	
87.50	0.29	0.44	1.49	1.75	میانگین	
89.89	0.30	0.46	1.52	1.89	*S. lycopersicum esculentum*	ISSR+SSR
41.57	0.17	0.25	1.31	1.19	*S. lycopersicum* cherry	
65.73	0.24	0.35	1.41	1.54	میانگین	

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

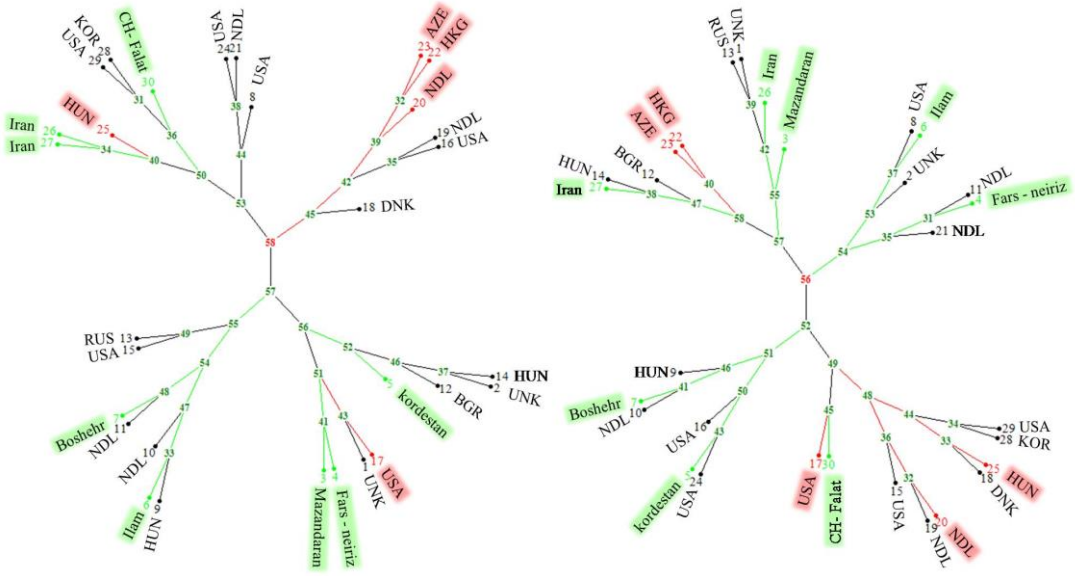
ارتباط توده‌های گوجه فرنگی به‌منظور گروه‌بندی آنها بر اساس ضرایب تشابه ژنتیکی جاکارد و به روش‌های مختلف انجام شد. بر مبنای ضریب کوفنتیک بالاتر روش Neighbor-joining (۰/۸۷۶۶ و r=۰/۸۸۳۲ به‌ترتیب برای نشانگر SSR وISSR) نسبت به روش‌های دیگر، از این روش برای تجزیه خوشه‌ای توده‌های مورد بررسی استفاده شد. مقادیر ضرایب تشابه ژنتیکی دارای دامنه تغییرات ۰/۱۹۲ تا ۰/۵۷۸ با میانگین ۰/۳۷۶ برای نشانگر ISSR و مقادیر صفر تا یک با میانگین ۰/۶۸۱ برای نشانگر SSR بود. بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای آغازگرهای ISSR کم‌ترین فاصله تشابه ژنتیکی با میزان ۰/۱۹۲ میان توده‌های شماره ۶ و ۱۱ متعلق به *S. lycopersicum* esculantum و بیشترین فاصله ژنتیکی با میزان ۰/۵۷۸ بین توده‌های ۳ و ۱۰ مشاهده شد. در تجزیه خوشه‌ای بر اساس آغازگرهای SSR، توده های ۲۵ و ۱۸، ۴ و ۱۱، ۲۰ و ۱۹، ۲۹ و ۲۸ کم‌ترین فاصله ژنتیکی را در توده‌های مورد بررسی به میزان صفر داشتند. این در حالی بود که تعداد ۵۷ مورد با بیشترین فاصله ژنتیکی به میزان یک در آنها دیده می‌شد که با بررسی اجمالی می‌توان به‌وجود فواصل مشهود نظیر توده‌های ۱۷، ۲۰، ۲۲، ۲۳ و ۲۵ (*S. lycopersicum* cherry) با توده‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۱، ۲۱ و ۳۰ متعلق به *S. lycopersicum* sculentum دست یافت. از سوی دیگر و همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود توده‌های مورد بررسی بر اساس هر دو نشانگر SSR و ISSR در چهار خوشه مختلف گروه‌بندی شدند. تفاوت در میزان پوشش ژنومی بر مبنای ماهیت و تعداد نشانگرهای مورد استفاده موجب گروه‌بندی توده‌های ایرانی یا یک گونه به‌خصوص در خوشه‌های مختلف شده است. قرار گرفتن توده‌های ایرانی در کنار توده‌های خارجی نیز مسلماً در ارتباط با شباهت بالای ریخته ژنتیکی آنها می‌باشد زیرا همان‌طور که می‌دانید گیاه گوجه فرنگی بومی ایران نبوده و از کشورهای قاره آمریکا و اروپا به ایران وارده شده و با توجه به سازگاری بالایی که دارد در طول سالیان متمادی مورد کشت و کار قرار گرفته است. با این حال پراکندگی توده‌های ایرانی بر اساس نشانگر ISSR کم‌تر بود و بر این اساس در سه گروه پراکنده شدند. هم‌چنین توزیع توده‌های *S. lycopersicum* cherry بر اساس نشانگر SSR در دو گروه و بر اساس نشانگر ISSR در سه گروه مختلف انجام شد.

به‌منظور تحلیل و نمایش بهتر کارایی نشانگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های گوجه فرنگی در این مطالعه از تجزیه به مختصات اصلی استفاده و نتایج آن از جنبه‌های مختلف بر روی نمودارهای بای‌پلات به نمایش در آمد (شکل ۴ و ۵). همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود رقم CH-falat (Check) نسبت به توده‌های شماره ۵ از کردستان، ۴ از فارس و ۲۲ از انگلستان دارای فاصله ژنتیکی نسبتاً یکسان ولی متفاوت از نظر چرخش بردارهای فاصله‌ای ترسیم شده در نمودار دو بعدی می‌باشد. به‌طوریکه این توزیع بر اساس آغازگرهای SSR از ربع چهارم به سمت نواحی اول و دوم ولی بر اساس آغازگرهای ISSR به سمت نواحی دوم و سوم می‌باشد. فاصله ژنتیکی بین دو توده متعلق به *S. lycopersicum* cherry یعنی توده‌های شماره ۲۰ از کشور هلند و ۲۲ از کشور انگلستان از دیگر موارد قابل تأمل در این نمودار بود که این فاصله بر اساس آغازگرهای SSR نسبت به آغازگرهای ISSR به شکل مشهودی بیشتر بود (بردار خط–نقطه آبی رنگ، شکل ۴). توده‌های ۲۶ (ایران) و ۱۳ (روسیه) از *S. lycopersicum* sculantum نیز وضعیت مشابهی داشتند؛ با این تفاوت که فاصله ژنتیکی بین آنها بر اساس آغازگرهای ISSR

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

به مراتب بیشتر از این فاصله بر اساس آغازگرهای SSR بود (بردار خط–نقطه بنفش رنگ، شکل ۴). فاصله ژنتیکی بین توده‌های ۲۰، ۲۲ و ۲۳ متعلق به *S. lycopersicum* cherry نیز به‌وضوح کارایی آغازگرهای مورد استفاده در تفسیر تنوع ژنتیکی توده‌های بررسی شده را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، مثلث شکل گرفته بین این سه توده بر اساس آغازگرهای SSR از گستردگی بالاتری برخوردار بوده و بین دو ناحیه ۲ و ۴ امتداد یافته است. این در حالی است که نه تنها اختلاف ژنتیکی بسیار کمی بین این ۳ توده بر اساس آغازگرهای ISSR تخمین زده شده است بلکه این توده‌ها در کنار هم در ناحیه سوم قرار گرفته‌اند.



شکل ۳. تجزیه خوشه‌ای توده‌های گوجه فرنگی با استفاده از آغازگرهای ISSR (سمت چپ) و SSR (سمت راست) بر اساس ضرایب جاکارد و روش Neighbor-joining. توده‌های جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران به رنگ سبز، توده‌های *S. lycopersicum* cherry با رنگ قرمز و توده‌های متعلق به *S. lycopersicum* esculentum با رنگ سیاه نشان داده شده است

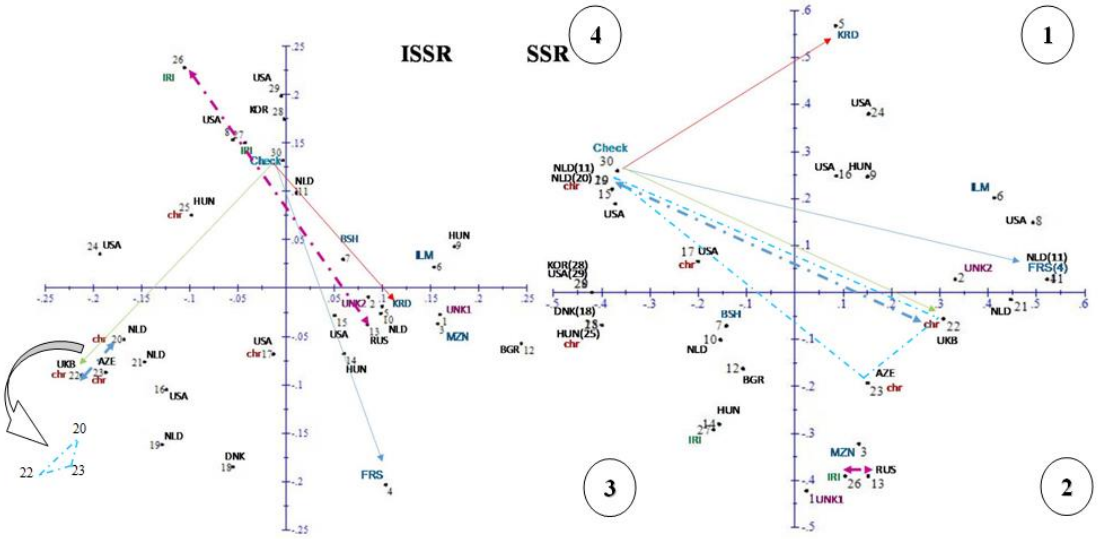
Figure 3. Cluster analysis for tomato accessions using ISSR (right) and SSR (left) markers through the Neighbor-joining method and Jaccard's coefficients. Accessions were collected from different regions of Iran and accessions belong to *S. lycopersicum* cherry and *S. lycopersicum* esculentum identified by green, red and black colors, respectively

توده‌های گوجه فرنگی ایرانی نیز بر اساس آغازگرهای SSR و ISSR مورد استفاده وجه متمایزی از تنوع ژنتیکی را نشان دادند. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود این توده‌های بر اساس آغازگرهای SSR در هر چهار ناحیه نمودار دو بعدی ترسیم شده پراکنده شده‌اند ولی این پراکنش بر اساس آغازگرهای ISSR تقریباً در دو ناحیه امتداد یافته است. توزیع توده‌های بررسی شده

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

در این مطالعه و فاصله ژنتیکی آنها از یکدیگر بر اساس نشانگرهای مورد استفاده نشان دهنده کارآیی متفاوت این نشانگرها در مطالعه تنوع ژنتیکی گوجه فرنگی دارد. این مطلب با پوشش ژنومی این نشانگرها نیز در ارتباط است، به‌طوری‌که هر چه پوشش ژنومی بیشتری توسط آغازگرهای مورد استفاده حاصل شده باشد می‌توان انتظار داشت که تنوع ژنتیکی بین توده‌ها بهتر به تصویر کشیده شده باشد. به همین دلیل می‌توان از آغازگرهایی که پوشش ژنومی بهتری دارند در اشباع نمودن نقشه‌های ژنتیکی و از آغازگرهای دیگر برای مطالعه تنوع ژنتیکی استفاده بهینه‌تری نمود. در این مطالعه هر کدام از نشانگرهای SSR و ISSR جنبه‌های متناقضی را نشان دادند. برای مثال، همانطور که گفته شد آغازگرهای SSR توده‌های ایرانی و *S. lycopersicum* Cherry را به خوبی از هم متمایز نمود ولی کارآیی آغازگرهای ISSR در توده‌های *S. lycopersicum* sculentum بیشتر بود.



شکل ٤. توزیع توده‌های گوجه فرنگی مورد بررسی بر اساس نمودار بای‌پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نشانگرهای ISSR (سمت چپ) و SSR (سمت راست)

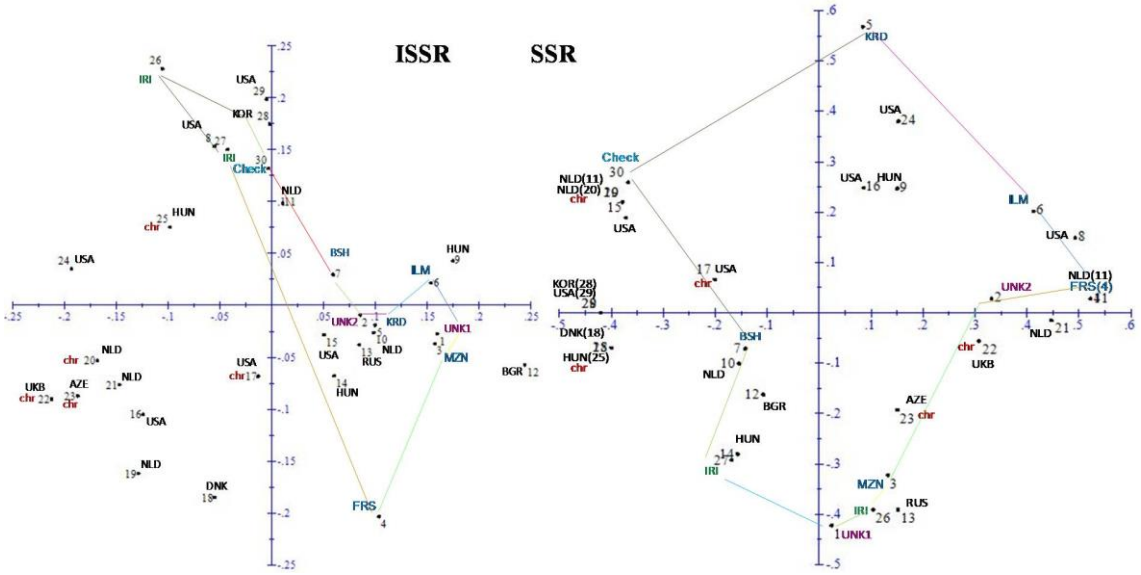
Figure 4. Distribution of tomato accessions based on biplot of Principal Coordinate Analysis (PCoA) using ISSR (left) and SSR (right) markers

به‌طور کلی و با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه مشخص شد که آغازگرهای ISSR نسبت به SSR از قابلیت بالاتری در تولید قطعات چند شکل بر خوردار بودند که این برتری در شاخص‌های قدرت نشانگر (Rp) و شاخص نشانگری (MI) نیز مشهود بود. البته با توجه به دمای اتصال پایین‌تر آغازگرهای ISSR که امکان تولید قطعات تکثیر زیادتری را منجر می‌شود این نتایج دور از انتظار نمی‌باشد. با این حال یکی از مهم‌ترین پارامترهای تعیین کننده کارآیی یک سیستم نشانگری شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) می‌باشد که در این رابطه نشانگر SSR به مراتب بهتر بود و این امر در تفسیر تنوع موجود بین توده‌های مورد بررسی به خوبی نشان داده شده است. از نظر اجزای واریانس ژنتیکی نیز اختلاف چندان زیادی مشاهده نشد و هر دو سیستم

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

نشانگری مورد استفاده توانستند تنوع درون گونه‌ای را به خوبی نشان دهند. با این حال آغازگرهای SSR از مقادیر بالاتری برای پارامترهای تنوع ژنتیکی نظیر نی (He)، شانون (I) و درصد مکان‌های چندشکلی (PPL %) نسبت به آغازگرهای ISSR برخوردار بودند. هر دو سیستم نشانگری توانستند توده‌های مورد بررسی را در چهار گروه عمده تقسیم بندی کنند. با این حال و با توجه به نتایج به‌دست آمده از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) آغازگرهای SSR از کارایی ملموس‌تری در نشان دادن تنوع ژنتیکی موجود در بین توده‌های ایرانی و چری برخوردار بودند. این در حالی بود که آغازگرهای ISSR توده‌های *S. lycopersicum* sculentum را بهتر متمایز نمودند.



شکل ۵. توزیع توده‌های گوجه فرنگی ایرانی مورد بررسی بر اساس نمودار بای‌پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نشانگرهای ISSR (سمت چپ) و SSR (سمت راست)

Figure 5. Distribution of tomato accessions based on biplot of principal coordinate analysis (PCoA) using ISSR (left) and SSR (right) markers

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در درون و بین گونه‌های گوجه فرنگی مورد مطالعه وجود داشت. با توجه به خصوصیات مشاهده شده در هر کدام از نشانگرهای مورد استفاده می‌توان انتظار داشت که کاربرد آغازگرهای ISSR برای اشباع نقشه‌های ژنتیکی و آغازگرهای SSR در بررسی ساختار جمعیت و گروه‌بندی توده‌های مختلف از کارآیی بالاتری برخوردار باشد.

سپاسگزاری: این مطالعه با حمایت مالی و اجرایی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، بخش ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران انجام شد که بدین وسیله مراتب قدردانی به عمل آورده می‌شود. از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

منابع

احمدزاده علیرضا؛ مجیدی هروان اسلام؛ علیزاده بهرام؛ امیدی امیرحسن (۱۳۸۹) بررسی عملکرد دانه، اجزای عملکرد و صفات مورفولوژیک گلرنگ بهاره با استفاده از روش‌های آماری چند متغیره. مجله دانش نوین کشاورزی سال ۱، صفحه ۸-۱۸.

رسولی آذر سیامک؛ صیدی مهدی؛ فاضلی آرش؛ محمدی یحیی (۱۳۸۹) بکارگیری نشانگر مولکولی ISSR در شناسایی لاین‌های متنوع گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) برای دورگ گیری. ژنتیک نوین ۱۴(۳)، ۲۷۳-۲۷۷.

نقوی محمدرضا؛ قره یاضی بهزاد؛ حسینی سالکده قاسم (۱۳۸۸) نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ سوم. ص. ۳۴۰.

References

Ahmadzadeh AR, Majidi A, Alizadeh B, Omidi AH (2011) Evaluate of seed yield, yield components and morphological traits of safflower using multivariate methods. J agric modern know 1, 8-18 (In Persian).

Carvalho SIC, et al. (2015) Transferability of microsatellite markers of Capsicum annuum L. Genet Mol Res 14(3), 7937-7946.

Corrado G, Caramante M, Piffanelli P, Rao R (2014) Genetic diversity in Italian tomato landraces: Implications for development of core collection. Sci Hortic 168, 138-144.

Eiadthong W, Nakatsubo F, Utsunomiya N, Subahadrandbu S (2000) Studies on some Mangifera species. Acta Hortic 509, 143-151.

Ezekiel CN, Nwangburuka CC, Ajibade OA, Odebode AC (2011) Genetic diversity in 14 Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) varities in Nigerian markets by RAPD-PCR technique. Afr J Biotech 10(25), 4961-4967.

Fan-Juan M, Xu XY, Huang FL, Li JF (2010) Analysis of Genetic Diversity in Cultivated and Wild Tomato Varieties in Chinese Market by RAPD and SSR. Agric Sci China 9(10), 1430-1437.

Figueiredo AST, Resende JTV, Faria MV et al. (2015) Prediction of industrial tomato hybrids from agronomic traits and ISSR molecular markers. Genet Mol Res 15(2), 1-13.

Foolad MR, Panthee DR (2012) Marker-Assisted selection in plant sciences. Plant Sci 31(2), 93-123.

Gonias ED, Ganopoulos I, Mellidou I et al. (2019) Exploring genetic diversity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) germplasm of genebank collection employing SSR and SCAR markers. Genet Resour Crop Evol 66, 1295-1309.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Hassan NA, Mostafa Sh, Twfik A (2013) Assessment of genetic diversity of Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) germplasm using molecular markers (RAPD and ISSR). Egypt J Genet Cytol 42, 163-182.

Henareh M, Dursun A, Abdollahi Mandoulkhani B, Haliloglu K (2016) Assessment of genetic diversity in Tomato landraces using ISSR markers. Genetika 48(1), 25-35.

Herison C, Sutjahjo SH, Sulastrini I et al. (2018) Genetic diversity analysis in 27 Tomato accessions using morphological and molecular markers. Agrivita J Agric Sci 40(1), 36-44.

Hu X, Wang H, Chen J, Yang W (2012) Genetic diversity of Argentina Tomato varieties revealed by morphological traits, simple sequence repeat, and single nucleotide polymorphism markers. Pak J Bot 44(2), 485-492.

Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan A (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. Euphytica 177(3), 309-334.

Kiani G, Siahchehreh M (2018) Genetic diversity in tomato varieties assessed by ISSR markers. Int J Veg Sci 24(4), 353-360.

Kumar PA, Reddy KR, Reedy RVSK et al. (2016) Genetic divergence studies in Tomato genotypes. Genet Plant Breed 11(4), 3071-3074.

Leonardi C, Ambrosino P, Esposito F, Fogliano V (2000) Antioxidative activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes. J Agric Food Chem 48, 4723-4727.

Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF, Reisch BI (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* Species. Plant Mol Biol Rep 12(1), 6-13.

Lotti C, Marcotrigiano AR, De Giovanni C, et al. (2008) Univariate and multivariate analysis performed on bio-agronomical traits of *Cucumis melo* L. germplasm. Genet Resour Crop Evol 55, 511-522.

Marefatzadeh-Khameneh M, Fabriki-Ourang S, Sorkhilalehloo B et al. (2021) Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) germplasm using fruit variation implemented by tomato analyzer software based on high throughput phenotyping. Genet Resour Crop Evol 68(6), 2611-2625.

Mazzucato A, Bitocchi E, Mosconi P et al. (2008) Genetic diversity, structure and marker-trait associations in a collection of Italian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. Theor Appl Genet 116, 657-669.

Mirzaei S (2021) Application of molecular markers in plant sciences; an overview. Central Asian J Plant Sci 1(14): 192-200.

Naghavi MR, Gharehyazi B, Hoseini Salekdeh (2009) Molecular markers. Tehran university press, Iran.Third Edition, pp. 340 (In Persian).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Naz S, Zafrullah A, Shahzadhi, Munir N (2013) Assesment of genetic diversity within germplasm accessions in Tomato using morphological and molecular markers. J Anim Plant Sci 23(4), 1099-1106.

Oliveira CMB, Souza LC, Santos JO, Moulin MM, et al. (2022) Dominant versus codominant marker aiming to characterize Capsicum spp. Sci Hortic 303, 111226.

Perrier X, Flori A, Bonnot F (2003) Data analysis methods. In: Hamon, P. Seguin, M. Perrier, X. Glaszmann, J.C. editors. Genetic diversity of cultivated tropical plants, Boca Raton FL (USA), CRC Press, 2003. P. 360.

Powell WW, Koput KW, Smith-Doerr L (1996) Interorganizational collaboration and the locus of innovation: Networks of learning in biotechnology. Adm Sci Q 41(1), 116-145.

Priya VV, Saravanan KR, Prakash M, Anandan R (2019) Assessment of molecular diversity in Tomato genotypes using RAPD and SSR markers. Plant Arch 19(2), 3437-3445.

RasoliAzar S, Saidi M, Fazeli A, Mohammadi Y (2020) Utilization of ISSR Molecular Markers in Identification of Diverse Tomato (*Solanum lycopersicum*) Lines for Hybridization. Modern Genet 14(3), 273-277 (In Persian).

Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128, 9–17.

Robertson LD, Labate JA (2007) Genetic resources of tomato (*Lycopersicon esculentum var. esculentum*) and wild relatives. Genet Improv Sol crop 2, 25-75.

Sato S, et al. (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. Nature 485, 635–641.

Sazmosi C, Solmaz I, Sari N, Barsony C (2010) Morphological evaluation and comparison of Hungarian and Turkish melon (*cucumis melo* L.) germplasm. Sci Hortic 124, 170-182.

Shahlaei A, Torabi S, Khosroshahli M (2014) Efficiacy of SCoT and ISSR marekers in assesment of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) genetic diversity. Int J Biosci 5(2), 14-22.

Sharifova SS, Mehdiyeva SP, Abbasov MA (2017) Analysis of genetic diversity among different Tomato genotypes using ISSR DNA marker. Genetika 49(1), 31-42.

Tikunov YM, Khrustaleva LI, Karlov GI (2003) Application of ISSR markers in the genus Lycopersicon. Euphytica 131, 71-80.

USDA (2021) https://fdc.nal.usda.gov/download-datasets.html.

Vargas JEE, Aguirre NC, Coronado YM (2020) Study of the genetic diversity of tomato (*Solanum* spp.) with ISSR markers. Rev Ceres Vicosa 67(3), 199-206.

Archive of SID.ir