ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸
صفحه ۲۷۹ - ۲۷۵

بکارگیری نشانگر مولکولی ISSR در شناسایی لاین‌های متنوع گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) برای دو رگ‌گیری

Utilization of ISSR Molecular Markers in Identification of Diverse Tomato (*Solanum lycopersicum*) Lines for Hybridization

سیامک رسولی آذر[۱]، مهدی صیدی*[۲]، آرش فاضلی[۳]، یحیی محمدی[٤]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
۳- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
٤- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

RasoliAzar S[1], Saidi M[*2], Fazeli A[3], Mohammadi Y[4]

1. MSc, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
2. Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
4. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.saidi@ilam.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۹ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۲۷)

چکیده

گوجه‌فرنگی یکی از سبزی‌های خانواده *Solanaceae* است که به شیوه‌های مختلفی مصرف می‌شود. به‌نژادی گوجه‌فرنگی به‌منظور قدرت دورگه و مقاومت به تحمل‌پذیری خشکی یک برنامه مهم است که از سال ۱۳۹۳ در دانشگاه ایلام آغاز شده و برای این منظور شناسایی لاین‌های والدی متنوع‌تر، هدف اصلی به نژادگران بود. در این پژوهش، به‌منظور بررسی روابط لاین‌ها و فاصله‌ی ژنتیکی آن‌ها و جداسازی بهترین والدین برای دورگ‌گیری از بین ۳٦ لاین گوجه‌فرنگی (جمع-آوری شده از سراسر دنیا)، از نشانگرهای مولکولی ISSR استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از ۱۱ آغازگر انجام شد که الگوی مناسب و قابل امتیازدهی برای ۳٦ ژنوتیپ مورد مطالعه تولید کردند. در مجموع تعداد ۸۹ آلل بر روی ژل آگاروز مشخص شد. تعداد کل آلل‌ها برای هر آغازگر از هفت تا ۱۰ عدد متغیر بود. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان چندشکلی به‌ترتیب مربوط به نشانگر ISSR17 با ۹۰ درصد و نشانگر LBMB B با میزان ۷۱ درصد بود. همچنین حداکثر و حداقل PIC به‌ترتیب ۰/٤٥ (LBMB C, LBMB D, HB12) و ۰/۳۸ (ISSR17) محاسبه شد. بیش‌ترین شاخص نشانگر (MI) با مقادیر ۳/۸ (LBMBA) و ۳/۵۱ (آغازگرهای ۸۰۹) بود که قدرت تفکیک بالاتر این آغازگرها در مقایسه با سایرآغازگرها را نشان داد. دامنه ضریب تشابه ژنتیکی دایس از ۰/۱۰ تا ۰/۹٦ بود. نتایج این پژوهش نشان دادند که ژنوتیپ‌های *Solanum pimpinellifolium*، *S. chilense LA1959* و *S. chilense LA1972* بهترین گزینه‌ها برای هتروزیس و تلاقی با ارقام محلی ایرانی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی

چندشکلی
فاصله ژنتیکی
نشانگر مولکولی
هیبرید

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.7.5]

گوجه‌فرنگی با نام علمی(*Solanum lycopersicum*) از خانواده *Solanaceae* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات در حوزه کشاورزی از نظر سطح زیر کشت و اهمیت اقتصادی در داخل کشور مطرح است. با شناسایی پدیده هتروزیس، مطالعات بسیاری در ارتباط با روش‌های دورگ‌گیری، تخمین هتروزیس و قابلیت ترکیب‌پذیری در گوجه‌فرنگی آغاز شد. امروزه به اتفاق پذیرفته شده‌است که هتروزیس در هیبریدهای گوجه‌فرنگی منجر به افزایش بنیه، رشد و تکامل بهتر، زودرسی، افزایش عملکرد و تعداد میوه، مقاومت به بیماری و تحمل بیشتر شرایط نامطلوب محیطی می‌شود و به‌طورکلی قابلیت سازگاری بیش‌تری در نسل F_1 ایجاد می‌کند (Yordanov 1983). جهت بهبود کارایی برنامه‌های اصلاحی در تولید هیبریدها و صرفه‌جویی در وقت و هزینه می‌توان تلاقی‌های برتر را قبل از ارزیابی‌های مزرعه‌ای و حتی قبل از انجام تلاقی‌ها پیش‌بینی کرد. روش‌های مختلفی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی درون جوامع گیاهی وجود دارد. ارزیابی صفات ریخت‌شناسی گیاه همواره در برنامه‌های اصلاحی جهت برآورد تنوع و گروه‌بندی نژادگان‌ها مورد استفاده بوده است. ولی با توجه به اینکه اندازه‌گیری صفات ریخت‌شناسی برای تعداد زیادی نمونه، نیاز به صرف وقت و هزینه زیادی دارد. امروزه برای بررسی تنوع ژنتیکی از نشانگرهای مولکولی به‌طور گسترده استفاده می‌شود (Mohammadi Farsani et al. 2008). در سال‌های اخیر استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR به‌عنوان ابزار قدرتمندی برای شناسایی چندشکلی، مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان استفاده شده‌است (KarimiShahri et al. 2011). در طول دهه گذشته تعداد قابل‌توجهی از مطالعات وجود همبستگی بین فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مولکولی (AFLP، ISSR ، SSR ، RFLP و RAPD) یا آیزوزایم را با کارایی هیبریدها و هتروزیس تائید کرده‌اند (Mohsenifard et al. 2011). بررسی DNA گیاهی ارزیابی مستقیم تنوع ژنتیکی را ممکن می‌سازد. انتخاب بهترین نشانگر، به هدف مطالعه و سطح پلوئیدی گیاه هدف بستگی دارد. در نشانگرISSR از پرایمرهای بلندی استفاده می‌شود که قابلیت تکثیر زیاد را تضمین می‌کند (Agostini et al. 2008). نشانگرهای ISSR شباهت بسیار نزدیکی با نشانگرهایRAPD دارند و به‌طور گسترده‌ای در نواحی بین ریزماهواره‌ای در سرتاسر ژنوم پراکنده شده‌اند. پرایمرهای ISSR امکان می‌دهند قطعاتی از DNA را تکثیر کرد که بین دو توالی ریزماهواره به اندازه کافی نزدیک به هم قرار گرفته‌اند. (Gupta et al. 2000). در مطالعات مشابه تنوع ژنتیکی ۱۰ رقم گوجه‌فرنگی با استفاده از نشانگرهای SSR، ISSR، RAPD وIRAP مورد مطالعه قرار گرفت و کارآمدی این نشانگرها برای تجزیه و تحلیل روابط ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی بسیار مناسب ارزیابی شد (Li-Wang Liu et al. 2007). هم‌چنین تنوع ژنتیکی ۲٤ واریته‌ی گوجه‌فرنگی با استفاده از دو نشانگر ISSR وRAPD مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که، نشانگر ISSR دامنه ارزشPIC آن بین ۰/۱٦ تا ۰/۵ با متوسط ۰/۳۰۳و در مقابل نشانگر RAPD با دامنه ارزش PIC آن بین ۰/۲٤۳ تا ۰/٤۳۲ با متوسط ۰/۲۹بود. با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان این گونه استنباط کرد که نشانگر ISSR یک نشانگر موثرتر نسبت به نشانگر RAPD به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی می‌باشد (Kaur et al. 2018).

این تحقیق در سال ۱۳۹٤ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام صورت گرفت و از ۳٦ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی با منشاء مشخص استفاده شد. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB تغییریافته انجام گرفت. برای تعیین کمیتDNA استخراجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب محلول‌های رقیق شده DNA به نسبت ۱:٦۱ (۵ میکرولیتر محلول استوک DNA به‌علاوه ۲۹۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل) در طول موج ۲٦۱ نانومتر (طول موج جذب اسیدهای نوکلئیک) و ۲۸۰ نانومتر (طول موج جذب پروتئین‌ها) اندازه‌گیری و در نهایت نسبت جذب نوری در طول موج ۲٦۱ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (۲٦۱/۲۸۰) که شاخص میزان خلوص DNA می‌باشد، به‌دست آمد.برای تعیین کیفیت DNA ژنومی استخراج شده نیز از روش الکتروفورز DNA در روی ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. واکنش زنجیره پلیمراز با استفاده از ترموسایکلر PeqLab انجام شد. اجزاء هر واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و با استفاده از مواد جدول ۱ انجام شد. برنامه چرخه حرارتی به صورت واسرشت‌سازی اولیه در مدت ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه، واسرشت‌سازی در ۹٤درجه سانتی‌گراد به مدت

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.7.5]

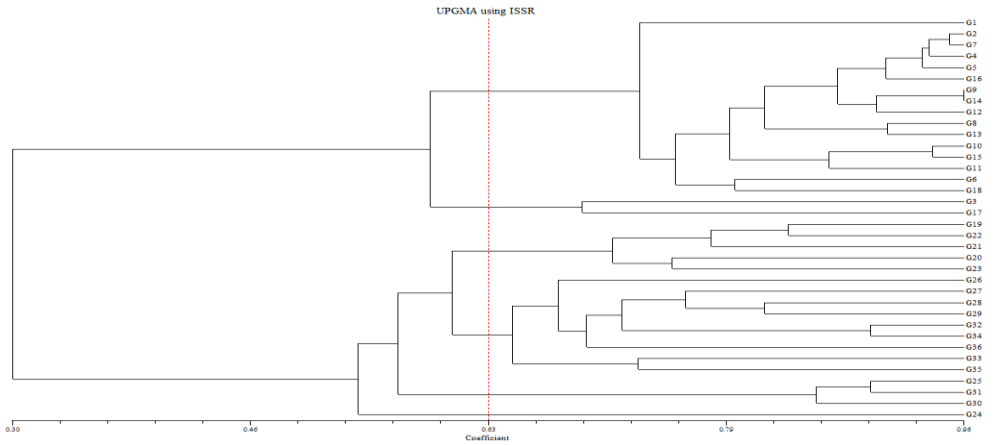
یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای اتصال واقعی آغازگر (۵۳-۴۸ درجه سانتی‌گراد) به مدت یک دقیقه در ٤٠ چرخه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه تعریف شد. به تیوب‌های حاوی نمونه به ازاء هر پنج میلی‌لیتر از نمونه موردنظر در حدود پنج میلی‌لیتر از بافر بارگذاری افزوده شد تا بخوبی مخلوط شود. سپس هر نمونه داخل چاهک ریخته شد. بافر موردنیاز برای انجام عمل الکتروفورز بافر TBE، با غلظت 1X است. جریان الکتریکی در حدود ۱۲۰ ولت به تانک متصل شد.پس از حدود ۲۰ دقیقه ژل از تانک خارج شده و سپس از سینی نیز خارج شد. به مدت ۲۰ دقیقه ژل در داخل اتیدیوم بروماید قرار داده شد. در مرحله بعد ۱۵ دقیقه برای شستشو وارد آب‌مقطر شد. سپس ژل در داخل دستگاه تصویربرداری از ژل قرار گرفته و از ژل عکس‌برداری شد. باندهای به‌دست آمده امتیازدهی شد. در محیط Excel آلل‌های مربوط به هرآغازگر در ردیف‌ها و نام ژنوتیپ‌ها در ستون‌ها قرار گرفت. بعد از تشکیل ماتریس رتبه‌های یک و صفر، ماتریس عدم تشابه جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار (Ver 5.0.158 DARWIN) و استفاده از ضریب تشابه جاکارد محاسبه شد. این ضریب شباهت‌ها را بر اساس وجود و عدم وجود نوار گروه‌بندی می‌کند. برای به‌دست آوردن بهترین الگوریتم از آزمون مانتل و ماتریس عدم تشابه با بهره‌گیری از برنامه XLstat استفاده شد. درنهایت تجزیه خوشه‌ای بر اساس ماتریس فواصل انجام شد و دندروگرام به روش نزدیک‌ترین همسایه به‌دست آمد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx(Ver 6.4) انجام شد. بهترین معیارها برای توضیح محتوای اطلاعاتی نشانگرها احتمال همسانی(PI)، محتوای اطلاعاتی چندشکلی (PIC) و قدرت تفکیک می‌باشند (Ramakrishna et al. 1994). با بررسی آلل‌های ISSR، ۱۳۷۸ آلل به‌دست آمد که از آن بین ۱۰۳۳ آلل (۷۵ درصد) چندشکل بودند و میانگین ۹٤ آلل برای هر آغازگر ثبت شد. واکنش PCR با استفاده از ۱۱ آغازگر ISSR روی ۳٦ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی انجام شد. تمام ۱۱ آغازگر مورد استفاده باند چندشکل بر روی ژنوتیپ‌ها ایجاد کردند و در مجموع ۸۹ آلل بر روی ژل آگاروز مشخص شد. سطح چندشکلی مشاهده شده با به‌کار بردن آغازگرهای مختلف ISSR مقدار بالایی از تنوع ژنتیکی را در بین جمعیت‌های مطالعه شده نشان داد. سطح قابل توجهی از تنوع میان نمونه‌های مختلف مشاهده شد و نتایج به‌دست آمده از این بخش اطلاعات کافی برای تشخیص و تفکیک ژنوتیپ‌ها از یکدیگررا فراهم نمود. تعداد کل آلل‌ها برای هر آغازگر از هفت تا ۱۰ آلل متغیر بود و محدوده اندازه قطعات تولید شده نیز از ۳۱۰ تا ۱۳۰۰ جفت‌باز متغیر بود. در بین انواع آغازگرهای ISSR استفاده شده، آغازگرهایISSR17 و 809 و LBMB E بیش‌ترین میزان چندشکلی در بین سایر آغازگرها نشان دادند. در پژوهشی مشابه ۱۲ لاین گوجه‌فرنگی با استفاده از ۸ مارکر ISSR مورد بررسی قرار گرفت و میزان پلی‌مورفیسم ٦٥٪ را نشان داد (Kiani and Siahchehre M 2017). با استفاده از فراوانی آللی، میزان PIC، میزان چند شکلی، تعداد آلل‌های چندشکل و ضریب MI برای هر آغازگر به‌طور جداگانه محاسبه گردید (جدول۱). بیش‌ترین شاخص نشانگر (MI) برای آغازگرISSR با مقادیر ۳/۸ و ۳/۵۱ به‌ترتیب مربوط به آغازگرهای LBMB A و ۸۰۹ بود که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالاتر این آغازگرها در مقایسه با سایر آغازگرهاست و کم‌ترین میزان با مقدار ۲/۰۳در آغازگر LBMB B مشاهده شد.

ارتباط میان ۳٦ نمونه از ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی بر اساس مقدار تشابه ژنتیکی دایس بوسیله تجزیه کلاستر با روش UPGMA تعیین شد (شکل ۱). آنالیز کلاستر به‌طور واضحی نمونه‌های مورد مطالعه را براساس نسبت فیلوژنتیکی آن‌ها و بر اساس سطوح ضریب تشابه جدا کرد. نتایج آنالیز کلاستر براساس فاصله ژنتیکی (Nei- Li 1979)، و به روش UPGMA نشان داد که نشانگرهای مولکولی ISSR به‌خوبی می‌توانند روابط واقعی بین لاین‌های گوجه‌فرنگی خصوصاً زمانی که تنوع ژنتیکی بین لاین‌ها پایین باشد و یا خصوصیات مورفولوژیک در شناسایی پلی‌مورفیسم بین ژنوتیپ‌ها کافی نباشد، مؤثر واقع شده و لاین‌های با منشاء و زمینه ژنتیکی مشابه تقریباً در گروه‌های مشابه قرار می‌گیرند. تجزیه خوشه‌ای به‌طور واضحی نمونه‌های مورد مطالعه را بر اساس نسبت فیلوژنتیکی آن‌ها و بر اساس سطوح ضریب تشابه جدا کرد. براساس دندروگرام به‌دست آمده از ماتریس تشابه دایس ژنوتیپ‌های مورد بررسی به شش گروه عمده تقسیم شدند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.7.5]

جدول ۱- مشخصات و اطلاعات آغازگر ISSR

ردیف	نام آغازگر	تعداد آلل‌ها	تعداد آلل های چندشکل	PIC	MI	میزان چندشکلی(درصد)	اندازه قطعات تکثیری(جفت باز)
۱	LBMB A	۸	۷	۰/٤٤	۳/۸	۸۷/۵	٤۱۰-۹۰۰
۲	LBMB B	۷	۵	۰/٤۱	۲/۰۳	۷۱	۳۵۰-۸۵۰
۳	LBMB C	۸	۷	۰/٤۵	۳/۱۵	۸۷/۵	٤۵۰-۹۰۰
٤	LBMB D	۷	٦	۰/٤۵	۲/٦۹	۸۵/۷	٤۵۰-۱۰۰۰
۵	LBMB E	۹	۸	۰/٤۱	۳/۲۷	۸۸/۸	۳۵۰-۹۵۰
٦	HB10	۸	۷	۰/٤	۲/۸	۸۷/۵	۳۹۰-۱۱۰۰
۷	HB 12	۸	۷	۰/٤۵	۳/۱۵	۸۷/۵	٤۱۰-۹۰۰
۸	HB14	۷	٦	۰/٤۲	۲/۵۱	۸۵/۷	۳۱۰-۸۰۰
۹	HB15	۸	٦	۰/٤۵	۲/٤	۷۵	۲۲۰-٦۸۰
۱۰	809	۹	۸	۰/٤٤	۱/۹٦	۸۸/۸	۱۹۰-۵۲۰
۱۱	ISSR 17	۱۰	۹	۰/۳۸	۱/٤٤	۹۰	۲۵۰-٦۳۰



شکل۱- دندروگرام به‌دست آمده از تجزیه کلاستر بین ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی براساس ضرایب تشابه دایس و روش UPGMA با استفاده از داده های نشانگر ISSR

ژنوتیپ پاکستانی *Punjab chaura* در گروه اول وارقام هندی بجز ژنوتیپ‌های 50-11-41 و M-1-2-β در خوشه دوم قرار گرفتند که برخی از ارقام آن قرابت نزدیکی با هم داشتند. ژنوتیپ‌های ایرانی و تجاری هریک در خوشه مجزا قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های پروئی، برزیلی و آمریکایی نیز در یک خوشه جدا گرفت. این عدم شباهت برخی لاین‌های با منشاء جغرافیایی نزدیک را شاید بتوان به فرآیندهای اصلاحی که در نهایت منجر به تولید این لاین‌ها شده ارتباط داد. از آنجا که معمولاً برای اصلاح هر لاین خصوصیات خاصی، با توجه به نظر اصلاح‌گر مورد توجه قرار می‌گیرد، فرآیند اصلاح می تواند به تولید لاین‌های با شباهت بسیار کم منجر شود (Mohsenifard et al. 2008). ژنوتیپ‌های پرو و آمریکایی و برزیلی دارای تفکیک بیشتری هستند و این نشان می‌دهد که کارهای اصلاحی بیشتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برروی این ارقام صورت گرفته است. با توجه به گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این تحقیق مشخص شد که برخی تقسیم‌بندی‌ها مطابق با منشاء ژنوتیپ‌ها از مناطق مختلف بودند که با منطقه پراکنش این ژنوتیپ‌ها هم‌خوانی دارد. همچنین نتایج کلاستربندی نشان داد که ژنوتیپ‌های ایرانی روابط فیلوژنتیکی نزدیکی با ژنوتیپ‌های هندی و تجاری داشته که قابلیت بازارپسندی و تجاری خوبی دارا می‌باشند. لذا چنانچه روی این ارقام کارهای اصلاحی در راستای افزایش کیفیت و کمیت صورت گیرد نتایج خوبی در آینده نزدیک، در تولید ارقام

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.7.5]

اصلاح شده ایرانی به‌دست خواهد آمد. با بررسی نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از نشانگر ISSR، اطلاعات کافی جهت مقایسه نشانگرهای ISSR حاصل شد.

منابع

Agostini G, Echeverrigaray S and Souza-chies T T (2008) Genetic relationships among south American species of *CunilaD. Royen* ex L. bassed ISSR. Plant system Evolution 274: 135.

Gupta Pk, Varshang P (2000) The development and use of microsatellite marker for genetic analysis and plant breeding with emphasis on breed wheat. Euphytica 113: 163.

KarimiShahri M R, Dehvari V, HajianShahri M and Mokhtarian E (2011) A few grape varieties genetic diversity based on molecular markers RAPD and ISSR Razavi Khorasan Province. Seed and Plant Breeding Journal 2: 152- 179. (In Farsi).

Kaur S, Singh A K, and Bagati S (2018) Assessment of genetic diversity in cultivated Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotype using molecular markers. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 7: 2129- 2143.

Kiani G, Siahchehreh M (2017) Genetic Diversity in Tomato Varieties Assessed by ISSR Markers, International Journal of Vegetable Science 24: 353-360.

Li-Wang Liu, Yan Wang, Yi-Qin Gong, Tong-Min Zhao, Guang Liu, Xiao-Yan Li, Fan-Min Yu and Fan-Min,Yu (2007**)**. Assessment of genetic purity of tomato (*Lycopersicon Esculentum* L.) hybrid using molecular markers Scientia Horticulturae. 115: 7-12

Mohseni Fard A, Farsi M, Nemati H and MalekZade K (2008) Evaluation of the genetic diversity of 16 genotypes of tomato (*Lycopersicon Esculentum*) using SSR molecular marker correlation with the heterosis (Abs.). Horticulture science journal of Iran, Tehran University. Abs. (In Farsi).

Mohammadi Farsani T, Etemadi N and SeiedTabatabaei B (2008) Evaluation samples of genetic Cynodon dactylon diversity using morphological and ISSR molecular markers. Horticulture Techniques Journal of Iran 2: 86-93. (In Farsi).

Mohammadi SA (2006) The analysis of molecular data from the perspective of genetic diversity. Key articles Crop Science Congress of Iran 96-119. (In Farsi)

Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction end nucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 76: 5269-5273.

Ramakrishna W, Lagu WD, Gupta VS and Ranjekar PK (1994) DNA fingerprinting in rice using oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. Theoretical and Applied Genetics 88: 402-6.

Yordanov M (1983) Heterosis in tomato. In: R. Frankel (Ed), Monographs on theoretical and applied genetics, 6. Heterosis. (pp. 188-214). Springer Verlag Berlin Heidelberg.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.7.5]