

Evaluation of the Genetic Diversity for Tomato's Cultivars and Promising Lines through CBDP Marker

Sahar Amiri¹, Hooman Salari^{2,*} and Alireza Etminan³

- 1- Former M.Sc. Student, Department of Plant Genetics and Production, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Plant Genetics and Production, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

*Corresponding author ✉: hooman.salari@razi.ac.ir

Citation: Amiri, S., Salari, H. and Etminan, A. (2024). Evaluation of the genetic diversity for tomato's cultivars and promising lines through CBDP marker. *Plant Genetic Researches*, **11(1)**: 151-164. <http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.1.10>

(Received: January 21, 2024; Final Revised: May 15, 2024; Accepted: May 29, 2024; Published online: September 21, 2024)

Extended abstract

Introduction

Tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) is the second most popular cultivated vegetable in the world. In recent years, due to the development of the processing industries of agricultural products, the demand for tomatoes has also significantly increased. With a production of over 3,390,000 tons of tomatoes, Iran ranks 11th in the world for tomato production. Tomatoes are highly nutritious and have beneficial effects on human health. Understanding the genetic diversity of germplasm is essential for implementing a breeding program aimed at developing high-performing cultivars with improved quality and resistance to biotic and abiotic stresses. Therefore, it is crucial to reveal the genetic diversity in the germplasm of tomato in order to introduce new cultivars. The CBDP marker is one of the emerging molecular markers whose primers are derived from the diversity in the gene-rich regions of plant genomes and with high reproducibility. CBDP marker is easy to use and does not require knowledge of the genome sequence. It is made from the functional regions of the genome and having advantages such as low cost, high polymorphism and extensive genetic information. So, CBDP marker can be useful to assess of the genetic diversity, population structure, genotype identification and QTL mapping. In this research, the genetic diversity of commercial tomato cultivars which are currently or previously being cultivated in Iran in addition to promising lines was assessed *via* CBDP marker. Additionally, the effectiveness of the CBDP marker system was assessed for investigating the genetic diversity of tomatoes.

Materials and methods

Seventy-eight tomato cultivars were considered and their genomic DNA was extracted using fresh and young tomato leaves. CTAB method was performed to extract DNA. After checking the quantity and quality of extracted DNA, the same concentration for all samples were practiced. In order to check the polymorphism between cultivars, 20 targeted gene primers based on CAAT-box regions (CBDP) were used. Amplified parts were separated using 1.2% agarose gel electrophoresis. The band pattern of amplified DNA was scored as zero and one to check the polymorphism amongst varieties; while DARwin and GenAlEx software were used to analysis the genetic diversity among tomato cultivars.

Results and discussion



©2024 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

The practiced primers generated polymorphic and scorable bands. The number of polymorphic bands varied from three (CBDP2) to 22 (CBDP12) with an average of 8.10 bands per primer. A total of 406 genomic fragments were amplified, of which 215 were polymorphic and the average percentage of polymorphism was 51%. The CBDP2 primer had the lowest polymorphism with 18%, whereas the CBDP18 and CBDP12 primers had the highest polymorphism with 74% and 73%, respectively. The average polymorphic information content index (PIC) estimated as 0.30 and resolution power (Rp) were 4.49, which indicated to some extent appropriate efficiency of the practiced primers. The genetic distance between the pairs of studied genotypes based on the Jaccard coefficient varied from 0.16 to 0.54 and its average was estimated to be 0.38. The lowest genetic distance was observed in Matin and Sana with a value of 0.16, while the highest was examined in Hypeel 303 and Cultivar 693 with a value of 0.54. The observed genetic distance shows that there is a relatively low diversity among the investigated tomato cultivars. Cluster analysis based on the Jaccard Distance Coefficient and Neighbor Joining algorithm divided the genotypes into five groups and the results of the analysis to the main coordinates were relatively consistent with the dendrogram obtained from the cluster analysis. The first two components justified 15.04% of the total changes, which indicates the appropriate genomic coverage of the primers used. The results indicated that there was limited diversity among the studied genotypes; however, the primers used effectively revealed polymorphism and clearly distinguished the genotypes.

Conclusions

The CDBP primers were able to successfully investigate the genetic diversity in tomato. furthermore; they were able to separated genotypes competently. Consequently, the use of CDBP marker is efficient and suggested for future evolution in tomato germplasm. In general, the primers called, CBDP18 and CBDP12 had higher efficiency and are highly recommended. The result of this study claimed that there was relatively low genetic diversity among the tomato cultivars present in Iran, therefore, it is recommended to take advantage of the new and diverse resources available in tomato germplasm to breed new tomato cultivars in Iran.

Keywords: Commercial variety, Gene targeting marker, Genetic diversity, *Solanum lycopersicum* L.



ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های امیدبخش گوجه‌فرنگی با نشانگر CBDP

سحر امیری^۱، هومن سالاری^{۲*} و علیرضا اطمینان^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۳- دانشیار، گروه به‌نژادی گیاهی و بیوتکنولوژی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۹؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۳/۰۶/۳۱)

چکیده

گوجه‌فرنگی دومین محصول محبوب در میان محصولات سبزی و صیفی در جهان است؛ از این رو شناسایی میزان تنوع در ژرم‌پلاسما آن به‌عنوان پیش‌نیاز انجام فعالیت‌های به‌نژادی اهمیت زیادی دارد. هدف از این مطالعه ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام گوجه‌فرنگی بیشتر کشت‌شده، در حال کشت و لاین‌های امیدبخش، در ایران بود. برای این منظور از ۲۰ آغازگر هدفمند ژنی مبتنی بر نواحی CAAT-box (CBDP) استفاده شد. آغازگرها در مجموع ۴۰۶ قطعه ژنومی را تکثیر کردند که از این تعداد، ۲۱۵ باند چندشکل نشان دادند؛ به‌طوری که میانگین درصد چندشکلی برابر ۵۱ درصد تعیین شد. میانگین شاخص محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) و قدرت تفکیک (Rp) به ترتیب ۰/۳۰ و ۴/۴۹ برآورد گردید که بیانگر کارایی نسبتاً مناسب آغازگرهای مورد استفاده بود. فاصله ژنتیکی ارقام بر اساس ضریب جاکارد از ۰/۱۶ تا ۰/۵۴ متغیر و میانگین آن ۰/۳۸ برآورد شد. کمترین و بیشترین فاصله ژنتیکی به ترتیب در ارقام Matin و Sana برابر با ۰/۱۶ و ۰/۱۶ و ارقام Hypeel 303 و 693 برابر با ۰/۵۴ بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب فاصله جاکارد و الگوریتم اتصال همسایگی ارقام را به پنج گروه تقسیم کرد و نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی به‌طور نسبی با دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت. دو مؤلفه اول فقط ۱۵/۰۴ درصد از کل تغییرات را توجیه کردند. این پژوهش تنوع ژنتیکی ارقام گوجه‌فرنگی در ایران را تا حدودی پایین ارزیابی کرد، اما آغازگرهای مورد استفاده می‌توانند به شکل مناسبی آن‌ها را از هم تفکیک نمایند. بر همین اساس آغازگرهای CBDP18 و CBDP12 بهترین آغازگرها در تمایز ارقام بودند. با توجه به نتایج این تحقیق، بر ضرورت توجه و استفاده از منابع ژنتیکی متنوع و توسعه ارقام جدید در تولید محصول گوجه‌فرنگی از یک‌سو و بررسی‌های پیش از واردت بذور گوجه‌فرنگی از سوی دیگر برای جلوگیری از آسیب‌پذیری ژنتیکی و وقوع اپیدمی‌های خطرناک نظیر بیماری‌های قارچی تأکید می‌شود.

واژگان کلیدی: ارقام تجاری، تنوع ژنتیکی، نشانگر هدفمند ژنی، *Solanum lycopersicum* L.* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: hooman.salari@razi.ac.ir

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) یکی از گونه‌های مهم از خانواده سولاناسه است. ژنوم گوجه‌فرنگی تقریباً از ۹۵۰ میلیون جفت‌باز تشکیل شده است که بیش از ۷۵ درصد آن هتروکروماتین و فاقد ژن است (Zhong *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2006). این گیاه پس از سیب‌زمینی دومین محصول محبوب از نظر کشت در میان محصولات سبزی و صیفی در جهان است (Pidigam *et al.*, 2021). بر اساس آمار فائو در سال ۲۰۲۱؛ چین، آمریکا، هند، ترکیه و مصر تولیدکنندگان مهم گوجه‌فرنگی هستند و از نظر میانگین تولید این محصول، در چند دهه اخیر، ایران همواره در میان ده کشور نخست جای داشته است (FAO, 2021). در دسترس بودن ژنوم کامل و چرخه زندگی کوتاه گوجه‌فرنگی باعث شده که به‌عنوان یک گیاه مدل برای مطالعات مختلف ژنتیکی، زیست‌فناوری و به‌نژادی نیز مورد استفاده قرار گیرد (Henareh *et al.*, 2015).

تنوع ژنتیکی، تنوع در ویژگی‌های وراثتی یک جمعیت است (Osawaru, 2015). بررسی تنوع ژنتیکی فرآیندی است که در آن میزان تفاوت‌ها و یا شباهت‌های بین افراد؛ یا گروه‌هایی از افراد و یا جمعیت‌ها با یک روش خاص و یا مجموعه‌ای از روش‌های خاص مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد (Mohammadi and Prasanna, 2003). در قرن بیستم میلادی روش‌های به‌نژادی برای تولید بذر گوجه‌فرنگی توسعه یافت و ارقام هیبرید (F_1) معرفی شدند (Bai and Lindhout, 2007). برنامه‌های به‌نژادی در کنار اهلی کردن توده‌های بومی تغییرات فنولوژیکی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی چشمگیری را ایجاد کردند و سبب بهبود عملکرد و کیفیت محصول گوجه‌فرنگی شدند، اما پایه ژنتیکی آن را به‌دلیل انتخاب‌های مداوم باریک کرد (Bergougnoux, 2014; Rahimi *et al.*, 2023).

توسعه نشانگرهای مولکولی درک ما را از سازمان‌دهی و تکامل ژنوم موجودات متحول کرده است (Adhikari *et al.*, 2017; MirMohammadi Maibody and Golkar, 2019). نشانگرهای مولکولی به‌دلیل پایداری، مقرون‌به‌صرفه بودن و

سهولت استفاده، ابزارهای محبوبی را برای کاربردهای مختلف از جمله نقشه‌برداری ژنوم، برچسب‌گذاری ژن، بررسی تنوع ژنتیکی، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ارائه می‌دهند (Grover and Sharma, 2016). در بین انواع نشانگرهای مولکولی، نشانگرهای مبتنی بر DNA امکان ارزیابی کامل‌تری از ژنوم را فراهم می‌کنند؛ چرا که تنوع را در سطح توالی‌های DNA نشان می‌دهند، پایدار هستند و تحت تأثیر محیط، اثرات پلئوتروپی و اپیستازی قرار نمی‌گیرند؛ بنابراین این نشانگرها یک فن کارآمد در بررسی تنوع ژنتیکی به‌شمار می‌آیند (Ansari *et al.*, 2016). پیشرفت در زمینه ژنومیک به‌ویژه ظهور فناوری توالی‌یابی نسل جدید (Next-generation sequencing: NGS)، زمینه را برای توسعه نشانگرهای هدفمند ژنی فراهم کرده است. نشانگرهای هدفمند ژنی یک گروه از نشانگرهای مبتنی بر DNA هستند که مکان‌های چندشکلی درون ژن‌ها را شناسایی می‌کنند. نشانگرهای SRAP (Li and Quiros, 2001)، TRAP (Hu and Vick, 2003)، SCoT (Collard and Mackill, 2009a) و CDDP (Singh *et al.*, 2009b) و CDBP (Collard and Mackill, 2009b) از جمله نشانگرهای هدفمند ژنی هستند.

نشانگر CDBP (CAAT box-derived polymorphism) یکی از نشانگرهای هدفمند ژنی است که از زمان معرفی تاکنون در بررسی تنوع ژنتیکی در بسیاری از گونه‌های گیاهی به‌طور موفقیت‌آمیزی مورد استفاده قرار گرفته است. آغازگرهای CDBP توالی‌هایی با طول ۱۸ نوکلئوتید هستند؛ طول آن‌ها به اندازه‌ای است که ضمن فراهم نمودن امکان تکثیر اختصاصی با تکرارپذیری بالا، میزان قابل‌قبولی از چندشکلی را ایجاد می‌کنند. این آغازگرها توالی‌های CAAT-box پیش‌بینی ژن‌ها را مورد هدف قرار می‌دهند (Singh *et al.*, 2014). جعبه CAAT که نقش مهمی در رونویسی ژن‌ها ایفا می‌کند؛ دارای یک الگوی متمایز از نوکلئوتیدها با توالی توافقی GGCCAATCT است و حدوداً در ۸۰ جفت‌بازی بالادست کدون شروع ژن‌های یوکاریوت قرار دارد (Benoist *et al.*, 1980). استفاده از این نشانگر آسان است و نیازی به آگاهی از توالی ژنوم

از خاک مزرعه، کود حیوانی پوسیده و ماسه بادی پر شده بودند انتقال یافتند و بعد از حدود دو تا سه هفته برگ‌های تازه و جوان برداشت، در ازلت مایع منجمد و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آبیاری به‌نحوی انجام گرفت که گیاهچه‌ها هیچ‌گاه پژمردگی را تجربه نکردند.

استخراج DNA: استخراج DNA از برگ‌ها بر اساس روش CTAB (Dellaporta et al., 1983) و با اندکی تغییر در سرعت سانتریفیوژ صورت گرفت. جهت بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از دستگاه الکتروفورز (Agagel Maxi Biometra ساخت آلمان) و ژل آگارز (شرکت سیناکلون- ایران) ۰/۸ درصد و دستگاه نانودراپ (MASTERGEN نسخه ۱۹-۷۲۸) استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: برای این منظور از تعداد ۲۰ آغازگر CBDP (توسط شرکت ژن فناوری، ایران) استفاده شد (جدول ۲). این آغازگرها بر اساس گزارش سینگ و همکاران (Singh et al., 2014) انتخاب شدند که پیشتر به صورت موفقیت‌آمیزی در سایر گیاهان مورد استفاده قرار گرفته بودند. برای تمامی نمونه‌های استخراج شده DNA ژنومی، غلظت یکنواخت ۴۰ نانوگرم در میکرولیتر در نظر گرفته شد. حجم واکنش ۱۴ میکرولیتر بود که شامل ۲ میکرولیتر DNA، ۲ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر، ۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و ۷ میکرولیتر مسترمیکس (شرکت سیناکلون- ایران) با غلظت 2X بود. واکنش تکثیر توسط دستگاه ترموسایکلر (Palm cycler مدل CG-9600-000) انجام شد و چرخه حرارتی برنامه‌ریزی شده برای تکثیر نیز با یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه شروع شد؛ سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای بهینه‌سازی شده برای هر آغازگر (۴۳-۳۶ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۴۵ ثانیه و توسعه آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت به مرحله توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه ختم گردید.

الکتروفورز: قطعات تکثیر شده با استفاده از دستگاه الکتروفورز افقی در مدت‌زمان دو ساعت با ولتاژ ۱۲۰ ولت

ندارد؛ از نواحی عملکردی ژنوم ساخته می‌شود و می‌تواند برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت، انگشت‌نگاری DNA، شناسایی ژنوتیپ و نقشه‌برداری صفات کمی (Quantitative trait locus: QTL) مفید باشد (Singh et al., 2014). از این نشانگر در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف گیاهی مانند کتان (Singh et al., 2014)، جوجوبا (Jojoba) (Heikrujam et al., 2015)، گلرنگ (Talebi et al., 2018)، زیتون (Fabriki-Ourang et al., 2019)، مریم‌گلی (Fabriki-Ourang and Karimi, 2019)، خوشاوندان وحشی گندم (Etminan et al., 2019)، گندم دوروم (Aslan-Parviz et al., 2020; Shaygan et al., 2021)، عدس (Sarvmeili et al., 2020)، جو (Ahmed et al., 2021) و بامیه (Puneeth et al., 2023) با موفقیت استفاده گردیده اما تاکنون و بر اساس جستجوی پژوهشگران این مطالعه، گزارشی مبنی بر استفاده از نشانگر CBDP در بررسی تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی و گیاهان هم‌خانواده آن مشاهده نشده است.

یکی از سؤالات اساسی درباره ارقامی که به صورت تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند میزان تنوع آن‌هاست. آگاهی از این تنوع می‌تواند در انتخاب راهکار برای مهار خسارت‌های ناشی از تنش‌های غیرزیستی و تنش‌های زیستی حائز اهمیت باشد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام تجاری گوجه‌فرنگی پیشتر کشت‌شده، در حال کشت و لاین‌های امیدبخش در ایران اجرا شد. همچنین در این بررسی کارایی سیستم نشانگری CBDP در بررسی تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد: تعداد ۷۸ رقم گوجه‌فرنگی از بانک بذر شرکت‌های روزین‌تاک، گلسم‌گران، فلات، بهتا و هزاره سوم مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). کشت در گلخانه با شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۲۱ درصد، متوسط طول روز ۱۵ ساعت و سیستم نور طبیعی انجام شد. بذرها با عمق کاشت نیم سانتی‌متر در سینی‌های نشاء پر شده با نسبت حجمی مساوی از کوکویت و پیت‌ماس قرار داده شدند. پس از ۲۰ روز، نشاءها به گلدان‌هایی که با نسبت حجمی ۱:۲

مؤثر، شاخص نشانگر (Kumar *et al.*, 2009) و قدرت تفکیک (Altıntaş *et al.*, 2008) برآورد گردید. برای دستیابی به بهترین دندروگرام، روش‌های مختلف محاسبه ماتریس فاصله و تجزیه خوشه‌ای با هم مقایسه شدند و بر اساس بیشترین میزان ضریب همبستگی کوفتیک ($r=0.87$) ماتریس فاصله جاکارد و الگوریتم اتصال همسایگی (Neighbor Joining) مورد استفاده قرار گرفت. محاسبه فاصله ژنتیکی بر اساس ماتریس فاصله جاکارد و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ماتریس فاصله ژنتیکی جاکارد و الگوریتم اتصال همسایگی انجام شد. به منظور انجام تجزیه‌های آماری نظیر برآورد فواصل ژنتیکی جاکارد، تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) و ترسیم بای‌پلات، تجزیه خوشه‌ای و رسم دندروگرام از نرم‌افزار DARwin (نسخه ۶) (Perrier *et al.*, 2003) استفاده شد. تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) و برآورد پارامترهای ژنتیکی درون جمعیتی بر اساس داده‌های حاصل از نشانگر با استفاده از نرم‌افزار Gen AIEx (نسخه ۷۵) (Peakall and Smouse, 2006) انجام شد.

و در بافر TAEIX بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد از هم تفکیک شدند. رنگ آمیزی ژل آگارز به صورت مستقیم با افزایش چهار میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید (شرکت سیناکلون- ایران) به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ژل انجام شد. برای آشکارسازی قطعات تفکیک شده DNA، تصویربرداری از ژل با استفاده از دستگاه ژل‌داک (Vilber Lourmat مدل DI-HD) زیر نور UV صورت گرفت و مشخص کردن اندازه قطعات تکثیر شده نیز با استفاده از نشانگر استاندارد DNA Ladder 1kb (Rang: 250-10000 bp) (شرکت سیناکلون- ایران) انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: جهت بررسی چندشکلی بین ارقام، تمامی باندهای مشاهده شده در تصاویر مربوط به آغازگرهای CBDP بر اساس حضور و عدم حضور هر باند خاص به ترتیب با اعداد صفر و یک مشخص شدند. به منظور تعیین کارایی آغازگرهای انتخاب شده مشخصاتی مانند تعداد باندهای تکثیر شده، تعداد باندهای چندشکل، درصد چندشکلی (Mohammadi and Prasanna, 2003)، محتوای اطلاعات چندشکل (Gorji *et al.*, 2011)، نسبت چندشکلی

جدول ۱- فهرست ارقام مورد بررسی گوجه‌فرنگی و شرکت‌های تأمین‌کننده

Table 1. List of investigated tomato's cultivars and their suppliers

شماره	رقم	تأمین‌کننده	شماره	رقم	تأمین‌کننده	شماره	رقم	تأمین‌کننده
No.	Cultivar	Supplier	No.	Cultivar	Supplier	No.	Cultivar	Supplier
1	Amapola	Rojin	27	23024	Rojin	53	Kismat	Falat
2	Hypeel 303	Falat	28	H 1423	Rojin	54	Sadeen 95	Behta
3	PetoMech	Rojin	29	H 1648	Rojin	55	GS 15	Golsam
4	Amperial	Rojin	30	Super urbana	Rojin	56	Oula (4320)	Falat
5	Matin	Rojin	31	H 5803	Rojin	57	692	Golsam
6	Sana	Rojin	32	Eden	Falat	58	SV 8320	Falat
7	Rock stone	Rojin	33	Arjan	Behta	59	Sereen	Golsam
8	Yaghoot	Rojin	34	Kimia	Golsam	60	Saldo	Golsam
9	Red stone	Rojin	35	Karol	Rojin	61	1230	Hezare
10	OS 376	Rojin	36	Bellariva	Falat	62	1226	Hezare
11	Ztp 11	Rojin	37	Comodoro	Falat	63	SV 1585	Falat
12	Ztp 8	Rojin	38	Jaleh	Behta	64	1232	Hezare
13	Ztp 6	Rojin	39	641	Rojin	65	1231	Hezare
14	H 1537	Rojin	40	691	Golsam	66	Stay Green	Rojin
15	H 1307	Rojin	41	JAC 8810	Falat	67	Namib	Rojin
16	8204	Rojin	42	689	Golsam	68	X 48	Rojin
17	LS 0019	Rojin	43	693	Golsam	69	Super Nemaperid	Rojin
18	H 8009	Rojin	44	Rojin	Rojin	70	LS 48	Rojin
19	Karen	Rojin	45	610	Golsam	71	X 80	Rojin
20	2206	Rojin	46	952	Golsam	72	Aras	Rojin
21	LS 79	Rojin	47	690	Golsam	73	Sivand	Rojin
22	Firen2e	Rojin	48	Super set	Falat	74	LS 80	Rojin
23	Sativa	Rojin	49	3-341	Hezare	75	Ztp 7	Rojin
24	King stone	Rojin	50	Pil ztp3	Rojin	76	Laleh	Rojin
25	H 3000	Rojin	51	Hediyeh	Golsam	77	RFT 732216	Golsam
26	NUN 0041	Rojin	52	Zomoured	Golsam	78	UC 105	Rojin

Rojin, Golsam, Falat, Behta و Hezare: به ترتیب بیانگر شرکت‌های روزین‌تاک، گلسم‌گرگان، فالات، بهتا و هزاره سوم می‌باشند.

Rojin, Golsam, Falat, Behta and Hezare represent Rojin Taak, Golsam Gorgan, Falat, Behta and Hazare Sewom companies, respectively.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای CBDP مورد استفاده

Table 2. Practiced CBDP primers and their properties

ردیف Row	نام Primer name	توالی آغازگر (۵' به ۳')	درصد GC GC%	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing temperature (°C)
1	CBDP 1	TGAGCACGATCCAATAGC	50.0	36
2	CBDP 2	TGAGCACGATCCAATAAT	39.0	36
3	CBDP 3	TGAGCACGATCCAATACC	50.0	43
4	CBDP 4	TGAGCACGATCCAATAAG	44.4	36
5	CBDP 5	TGAGCACGATCCAATCTA	44.4	40
6	CBDP 6	TGAGCACGATCCAATCAG	50.0	38
7	CBDP 7	TGAGCACGATCCAATCGA	50.0	40
8	CBDP 8	TGAGCACGATCCAATCGG	55.6	38
9	CBDP 9	TGAGCACGATCCAATGAT	44.4	38
10	CBDP 10	TGAGCACGATCCAATGTT	44.4	38
11	CBDP 11	TGAGCACGATCCAATTGC	50.0	40
12	CBDP 12	TGAGCACGATCCAATATA	39.0	38
13	CBDP 13	TGAGCACGATCCAATGAG	50.0	38
14	CBDP 14	TGAGCACGATCCAATGCG	55.6	40
15	CBDP 15	TGAGCACGATCCAATTGA	44.4	37
16	CBDP 16	TGAGCACGATCCAATTCA	44.4	42
17	CBDP 17	TGAGCACGATCCAATTTG	44.4	39
18	CBDP 18	CTGAGCACGATCCAATAG	50.0	39
19	CBDP 19	CTGAGCACGATCCAATAC	50.0	41
20	CBDP 20	CTGAGCACGATCCAATAT	44.4	37

نتایج و بحث

ژنتیکی موجود در یک جمعیت مورد مطالعه ارائه می‌دهد و مقدار آن در نشانگرهای غالب بین ۰ تا ۰/۵ متغیر است (Anderson et al., 1993; Ditta et al., 2018). در این مطالعه از مجموع ۲۰ آغازگر استفاده شده، محتوای اطلاعات چندشکل ۱۷ آغازگر بیش از ۰/۲۵ تخمین زده شد که بیانگر کارایی مناسب آغازگرهای مورد استفاده در تفکیک و تمایز ارقام است. در محاسبه شاخص نشانگر بیشترین مقدار آن به آغازگرهای CBDP18 و CBDP12 با مقدار ۶/۲۶ و ۶/۱۲ و کمترین آن به آغازگرهای CBDP2 و CBDP1 با مقدار ۰/۷۱ و ۰/۷۲ تعلق داشت. شاخص نشانگر بر اساس تعداد باندهای چندشکل و پوشش فراوان ژنوم توسط آغازگر محاسبه می‌شود؛ بنابراین آغازگرهایی که دارای مقادیر بالایی از این شاخص هستند، نشان می‌دهند که بیشترین باند چندشکل را تولید کرده و اطلاعات بیشتری از ژنوم را تخمین زده‌اند (Spooner et al., 2005). برای نسبت چندشکلی مؤثر با متوسط ۶/۱۴، آغازگرهای CBDP12 و CBDP18 به ترتیب با ۱۶/۱۳ و ۱۴/۸۱ بیشترین مقدار این شاخص را دارا بودند و آغازگر CBDP2 با ۰/۵۳ کمترین مقدار را دارا بود. بیشترین و

در بررسی کارایی آغازگرهای مورد استفاده، تعداد کل باندهای تکثیر شده، تعداد باندهای چندشکل، درصد چندشکلی و پارامترهای تنوع ژنتیکی برای هر آغازگر محاسبه شد (جدول ۳). تمامی آغازگرهای استفاده شده باندهای چندشکل و قابل امتیازدهی در محدوده بین ۲۰۰ تا ۳۵۰۰ جفت‌باز ایجاد کردند (شکل ۱). از مجموع ۴۰۶ باند تکثیر شده، ۲۱۵ مورد آن چندشکل بود. بر همین مبنا، میانگین درصد چندشکلی برای تمامی آغازگرها ۵۱ درصد به‌دست آمد. آغازگر CBDP2 با ۱۸ درصد کمترین درصد چندشکلی و در مقابل آغازگرهای CBDP18 و CBDP12 به ترتیب با ۷۴ و ۷۳ درصد بیشترین درصد چندشکلی را به خود اختصاص دادند. همچنین تعداد باندهای چندشکل از سه (CBDP2) تا ۲۲ (CBDP12) متغیر و میانگین آن به ازای هر آغازگر ۱۰/۸ بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکل ۰/۳۰ برآورد گردید که بیشترین مقدار آن را آغازگر CBDP5 با ۰/۴۹ و کمترین مقدار آن را آغازگر CBDP1 با ۰/۱۸ به خود اختصاص داد. این شاخص معیاری از چندشکلی است که اطلاعاتی را در مورد تنوع

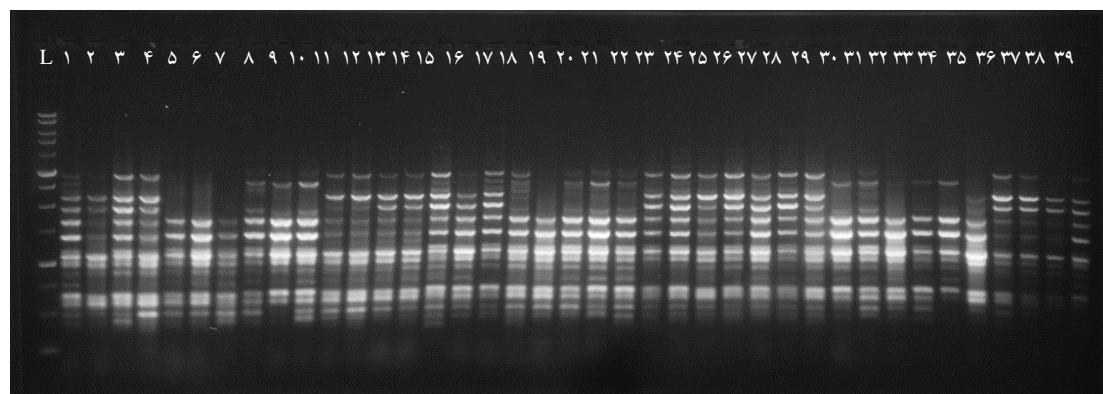
مقادیر این شاخص را دارند، دارای توانایی بیشتری در تفکیک افراد مورد بررسی نسبت به سایر آغازگرها هستند (Prevost and Wilkinson, 1999). با بررسی نتایج به دست آمده در این بخش می‌توان بیان کرد که از میان آغازگرهای مورد استفاده، آغازگرهای CBDP18 و CBDP12 کارایی بهتری در تمایز ارقام از هم داشته‌اند.

کمترین قدرت تفکیک هم به ترتیب با استفاده از آغازگرهای CBDP18 و CBDP12 با مقدار ۸/۵۱ و ۸/۱۰ و آغازگرهای CBDP1 و CBDP2 با مقدار ۰/۸۲ و ۰/۹۷ به دست آمد. در انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک بهترین شاخص می‌باشد؛ چرا که تحت تأثیر تعداد افراد دارای باند و تعداد آل محاسبه می‌شود. آغازگرهایی که بیشترین

جدول ۳- خصوصیات آغازگرهای CBDP

Table 3. Characterization of CBDP primers

نام آغازگر	تعداد کل باندها	تعداد باندهای چندشکل	درصد چندشکلی	محتوای اطلاعات چندشکل	نسبت چندشکلی مؤثر	شاخص نشانگر	قدرت تفکیک
Primer name	No. of total bands	No. of polymorphic bands	Polymorphism %	Polymorphic information content (PIC)	Effective multiplex ratio (EMR)	Marker index (MI)	Resolution power (Rp)
CBDP 1	10	4	40	0.18	1.60	0.72	0.82
CBDP 2	17	3	18	0.24	0.53	0.71	0.97
CBDP 3	20	10	50	0.26	5.00	2.59	3.44
CBDP 4	22	10	45	0.24	4.55	2.35	2.92
CBDP 5	13	4	31	0.49	1.23	1.97	3.59
CBDP 6	22	9	41	0.34	3.68	3.08	4.41
CBDP 7	19	13	68	0.32	8.89	4.20	5.82
CBDP 8	20	11	55	0.38	6.05	4.13	5.87
CBDP 9	21	11	52	0.31	5.76	3.45	5.03
CBDP 10	19	8	42	0.32	3.37	2.52	3.44
CBDP 11	21	12	57	0.29	6.86	3.50	4.38
CBDP 12	30	22	73	0.28	16.13	6.12	8.10
CBDP 13	26	17	65	0.29	11.12	4.93	6.79
CBDP 14	18	7	39	0.28	2.72	1.96	2.87
CBDP 15	20	13	65	0.30	8.45	3.95	5.69
CBDP 16	19	11	58	0.28	6.37	3.03	4.21
CBDP 17	22	13	59	0.35	7.68	4.49	6.38
CBDP 18	27	20	74	0.31	14.81	6.26	8.51
CBDP 19	22	12	55	0.30	6.55	3.56	4.95
CBDP 20	18	5	28	0.26	1.39	1.31	1.59
میانگین Mean	20.3	10.8	51	0.30	6.14	3.24	4.49
کل Total	406	215	-	-	-	-	-



شکل ۱- نمونه الگوی نواریابی آغازگر CBDP بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد، L: نشانگر استاندارد تعیین اندازه DNA.

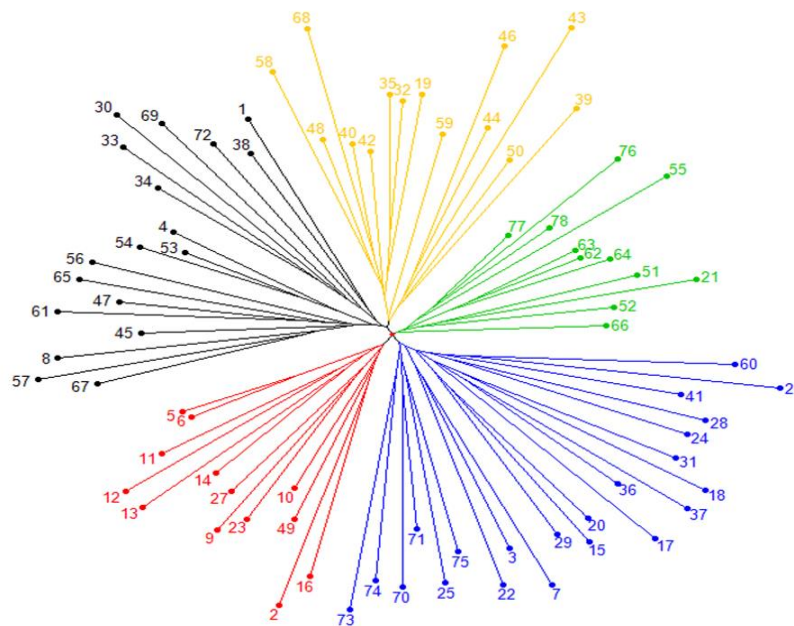
شماره‌های ۱ تا ۳۹ عبارتند از ارقام شماره ۱ تا ۳۹ در جدول ۱

Figure 1. Representative of banding pattern of CBDP primer on 1.2 % agarose gel, L: DNA Ladder 1kb; 1 to 39 numbers indicated the cultivars 1 to 39 in table 1

پژوهش حاضر وجود دارد که نشان می‌دهند تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی کشت‌شده به‌شدت کاهش یافته که سبب آسیب‌پذیر شدن محصولات در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌گردد. این کاهش تنوع را ممکن است به‌دلیل استفاده از والدین مشترک در ایجاد ارقام جدید و یا گرایشی که در جهت اصلاح ویژگی‌های میوه و گیاهی مشابه وجود دارد، نسبت داد.

در گروه‌بندی ارقام مورد مطالعه از داده‌های حاصل از ضریب فاصله جاکارد جهت رسم دندروگرام استفاده شد. پس از بررسی دندروگرام‌های حاصل از الگوریتم‌های مختلف، دندروگرام به‌دست آمده از الگوریتم اتصال همسایگی که کمترین اثر زنجیره‌ای را داشت، مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۲). از تجزیه واریانس مولکولی جهت تعیین تعداد مطلوب خوشه‌ها و بررسی میزان تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها استفاده شد. بر اساس بیشترین مقدار آماره PhiPT (۰/۰۴۲) ارقام به پنج گروه تقسیم شدند. گروه‌های اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم هرکدام به‌ترتیب دارای ۲۲، ۱۳، ۱۸، ۱۴ و ۱۱ رقم شدند. سهم تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها به‌ترتیب ۹۶ و ۴ درصد برآورد شد (جدول ۴). تنوع ۹۶ درصد در درون جمعیت‌ها نشان می‌دهد که افراد موجود در هر گروه از نظر مکان‌های ژنی تکثیر یافته اختلاف زیادی با هم دارند. بر این اساس می‌توان بیان کرد با وجود این‌که تنوع ژنتیکی پایینی در بین گروه‌ها وجود دارد اما آغازگرهای استفاده شده به‌خوبی توانسته‌اند اختلافات درون گروه‌ها را در سطح ژنوم آشکار کنند. این مسئله نشان می‌دهد که انتخاب نشانگر CBDP در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی بسیار مناسب بوده و به‌صورت توانمند عمل کرده است. همچنین تعداد زیاد آغازگرهای مورد استفاده می‌تواند توجیه دیگری برای این مسئله باشد، چرا که تعداد آغازگر رابطه مستقیمی با پوشش ژنومی و پیدا کردن تفاوت‌ها دارد.

بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی جاکارد، دامنه تغییرات فاصله ژنتیکی از ۰/۱۶ تا ۰/۵۴ متغیر و میانگین آن ۰/۳۸ به‌دست آمد. کمترین فاصله ژنتیکی را ارقام Matin (رقم شماره ۵) و Sana (رقم شماره ۶) داشتند. بیشترین فاصله ژنتیکی هم بین ارقام Hypeel 303 (رقم شماره ۲) و 693 (رقم شماره ۴۳) مشاهده شد. با توجه به دامنه اندک تغییرات فاصله ژنتیکی می‌توان بیان کرد که تنوع نسبتاً پایینی در میان ارقام مورد بررسی گوجه‌فرنگی وجود دارد، ارقام از نظر ژنتیکی خیلی به هم نزدیک هستند و همولوژی بالایی دارند. بر اساس نتیجه میرزائی و سالاری (Mirzaei and Salari, 2021) در بررسی تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی با استفاده از نشانگر SCoT ژنوتیپ‌های مورد بررسی از تنوع بسیار بالایی برخوردار نبودند. در مطالعه‌ای بر روی ۳۲۴ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی از ۵۶ آغازگر InDel جهت بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شده است، نتایج نشان داده است که ژنوتیپ‌های مورد بررسی دارای هموزیگوسیتی بالا و زمینه ژنتیکی غنی هستند (Jin et al., 2019). در تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی هشت ژنوتیپ گوجه‌فرنگی از نشانگرهای ISSR و SCoT استفاده شده است؛ درصد چندشکلی مشاهده شده توسط شش آغازگر ISSR و هفت آغازگر SCoT به‌ترتیب ۶۰/۳ و ۴۷/۳ درصد بوده است (Abdein et al., 2018). در بررسی تنوع ژنتیکی ۴۲ رقم گوجه‌فرنگی توسط نشانگر EST-SSR میانگین درصد چندشکلی ۴۹ درصد به‌دست آمده است (Korir et al., 2014). در مطالعه نبی‌پور و همکاران (Nabipour et al., 2011) جهت بررسی تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی با استفاده از نشانگر AFLP تنوع ژنتیکی پایینی مشاهده شده است. در مطالعه‌ای دیگر بررسی تنوع ژنتیکی ۴۷ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر AFLP صورت گرفته است و نشان داده که تنوع ژنتیکی پایینی در میان ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی وجود دارد (Ren et al., 2011). تحقیقات بسیاری مانند



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ماتریس فاصله جاکارد و الگوریتم اتصال همسایگی

Figure 2. Dendrogram obtained from the cluster analysis based on Jaccard distance matrix and Neighbor Joining algorithm

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بر اساس تجزیه خوشه‌ای

Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) based on cluster analysis

منبع تغییرات Source of variation (S.O.V)	درجه آزادی df	مجموع مربعات Sum of squares	اجزاء واریانس Variance component	درصد واریانس کل Percentage of total variance	Φ_{PT} PhiPT
بین جمعیت‌ها Between populations	4	212.208	53.052	4	0.042
درون جمعیت‌ها Within populations	73	2313.177	31.687	96	
کل Total	77	2525.385		100	

که تنوع ژنتیکی ارقام مورد بررسی در این پژوهش را هرکدام به ترتیب با استفاده از نشانگرهای SCoT و ISSR بررسی کرده‌اند، سهم دو مؤلفه اول در توجیه تغییرات به ترتیب ۵۶/۳۶ و ۴۰/۱۲ بود. زمانی که دو یا سه مؤلفه اول کمتر از ۲۵ درصد از کل تغییرات را توجیه کنند؛ تجزیه و تحلیل خوشه‌ای قابل‌اعتمادتر است و بیانگر پوشش ژنومی مناسب آغازگرهای مورد استفاده است (Singh and Singh, 2015). شکل ۳، صفحه مختصات مربوط به پراکنش دوبعدی و فاصله هندسی افراد را بر اساس دو مؤلفه اول نشان می‌دهد. پراکندگی ارقام در صفحه مختصات نیز تأیید می‌کند که آغازگرهای CBDP پوشش ژنومی بسیار مناسبی داشته‌اند و به خوبی توانسته‌اند آن‌ها

برای داشتن دیدگاه بهتر نسبت به فواصل ژنتیکی بین ارقام مورد مطالعه، تجزیه به مختصات اصلی بر اساس ضریب فاصله جاکارد و رسم نمودار پراکندگی بر اساس مؤلفه اصلی اول و دوم محاسبه گردید. نتایج به دست آمده از تجزیه به مختصات اصلی به‌طور نسبی با دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت. مؤلفه اصلی اول ۸/۲۶ درصد و مؤلفه اصلی دوم ۶۷/۸ درصد از کل تغییرات را به خود اختصاص داد. سهم دو مؤلفه اول در توجیه تغییرات ۱۵/۰۴ درصد و سهم سه مؤلفه اول ۲۰/۰۶ درصد بود (جدول ۵). در حالی که در مطالعه میرزائی و سالاری (Mirzaei and Salari, 2021) و حیدری توتشامی و سالاری (Heidari Tootshami and Salari, 2024)

فراوانی یکسان و توزیع مناسب در سطح ژنوم هستند. در گونه‌های گیاهی دیپلوئید (2n) مانند گوجه‌فرنگی هرچقدر تعداد آلل‌های مشاهده شده و مؤثر نشانگر به دو نزدیک‌تر باشد، بیانگر توانایی بالای آن نشانگر در ایجاد باند چندشکل یا ایجاد تعداد باندهای اختصاصی برای جمعیت مورد بررسی است (Soorni *et al.*, 2013). میانگین شاخص اطلاعات شانون، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و شاخص تصحیح شده هتروژنی به ترتیب ۰/۵۷، ۰/۳۹ و ۰/۴۰ برآورد گردید (جدول ۶).

را از هم تفکیک کنند و مناطقی از ژنوم را مورد هدف قرار دهند که در آن مناطق در میان افراد مورد بررسی تفاوت وجود داشته است.

برای جمعیت مورد بررسی، پارامترهای ژنتیکی درون جمعیتی نیز محاسبه و میانگین آن‌ها به دست آمد. تعداد آلل‌های مشاهده شده برای هر لوکوس ۲ و تعداد آلل‌های مؤثر از ۱/۰۲ تا ۲ متغیر و میانگین آن ۱/۷۱ برآورد شد (جدول ۶). آلل‌های مؤثر نسبت به آلل‌های مشاهده شده قابل‌اعتمادترند، زیرا در آلل‌های مؤثر عامل تفاوت در فراوانی آلی حذف شده و آللهایی باقی مانده‌اند که دارای

جدول ۵- نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی

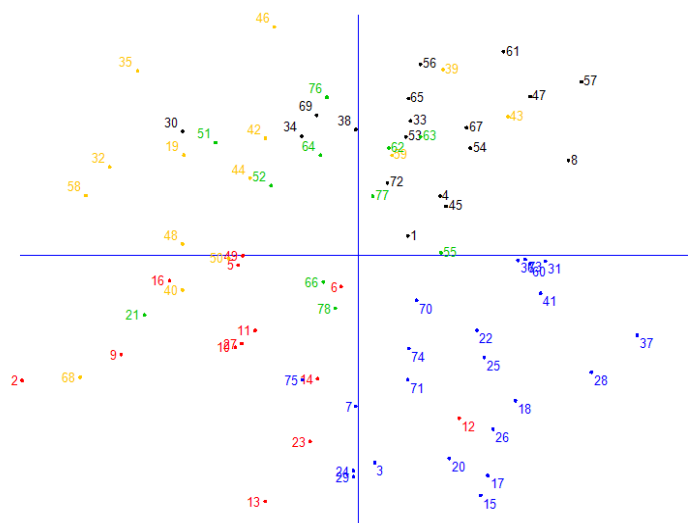
Table 5. Results of principal coordinate analysis

مؤلفه	درصد واریانس نسبی	درصد واریانس تجمعی
Component	Percentage of relative variance	Percentage of cumulative variance
1	8.26	8.26
2	6.78	15.04
3	5.02	20.06
4	4.58	24.64
5	4.13	28.77

جدول ۶- پارامترهای تنوع ژنتیکی برآورد شده

Table 6. Estimated genetic diversity parameters

تعداد ارقام	تعداد آلل‌های مشاهده شده	تعداد آلل‌های مؤثر	شاخص اطلاعات شانون	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	شاخص تصحیح شده هتروژنی
Number of cultivars	Number of different alleles	Number of effective alleles	Shannon's information index	Expected heterozygosity	Unbiased expected heterozygosity
78	2.000	1.711	0.572	0.394	0.396



شکل ۳- نمودار پراکنش دو بعدی با استفاده از تجزیه به مختصات اصلی، محور افقی: مؤلفه اول، محور عمودی: مؤلفه دوم

Figure 3. Scatter biplot using principal coordinate analysis, horizontal axis: PC1, vertical axis: PC2

در این مطالعه با وجود آنکه میانگین درصد چندشکلی (۵۱ درصد) حاصل از آغازگرهای CBDP در میان ارقام مورد بررسی خیلی بالا نبود؛ اما این آغازگرها توانستند به‌طور موفقیت‌آمیزی به بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گوجه‌فرنگی پردازند و آن‌ها را از هم تفکیک کنند. بر اساس دامنه اندک تغییرات فاصله ژنتیکی (۰/۵۴ - ۰/۱۶) سطح تنوع نسبتاً کمی در میان ۷۸ رقم مورد بررسی مشاهده شد. این نتیجه ضرورت اهمیت استفاده از منابع ژنتیکی متنوع‌تر و وارد نمودن آن‌ها در برنامه‌های تلاقی جهت تولید ارقام گوجه‌فرنگی در کشور و نیز دقت بیشتر در امر واردات بذور گوجه‌فرنگی را گوشزد می‌نماید. دندروگرام و نمودار پراکنده‌گی نشان داد با وجود تنوع کم، ارقام به‌خوبی از هم تفکیک شدند. این مطلب نشان می‌دهد که نشانگر CBDP عملکرد مناسبی در تمایز ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی دارد. آغازگرهای CBDP12 و CBDP18 از نظر ایجاد باند قابل امتیازدهی، درصد چندشکلی، شاخص نشانگر، نسبت چندشکلی مؤثر و قدرت تفکیک مقادیر بالایی را از خود نشان دادند؛ بنابراین نسبت به دیگر آغازگرهای مورد

استفاده کارایی بهتری در تمایز ژنوتیپ‌ها از هم داشته‌اند و می‌توانند به‌عنوان آغازگر آگاهی‌بخش معرفی شوند. با توجه به اینکه تجزیه به مختصات اصلی (بر اساس مؤلفه اول و دوم) نتایج تجزیه خوشه‌ای (بر اساس داده‌های مولکولی) را تأیید کرد و درصد تغییرات توجیه شده حول دو مؤلفه اول (۱۵/۰۴) که کمتر از ۲۵ درصد بود؛ می‌توان نتیجه گرفت که نشانگر CBDP توانسته است ژنوتیپ‌ها را به‌خوبی از هم تفکیک کند. پژوهش‌های دیگری نیز با استفاده از نشانگرهای SCoT و ISSR بر روی همین ارقام صورت گرفته و نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که این نشانگرها در مناطق محدودی از ژنوم تجمع یافته‌اند و مانند نشانگر CBDP مورد استفاده در این پژوهش توزیع مناسبی در کل ژنوم نداشته‌اند (Mirzaei and Salari, 2021; Heidari Tootshami and Salari, 2024). پارامترهای ژنتیکی درون جمعیتی نظیر تعداد آلل‌های مشاهده شده و مؤثر، تأییدی بر توانایی بالای نشانگر CBDP در ایجاد باندهای اختصاصی برای جمعیت مورد بررسی می‌باشد. به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگر CBDP برای مطالعات آتی در ژرم‌پلاسم گوجه‌فرنگی کارآمد است.

References

- Abdein, M.A., Abd El-Moneim, D., Taha, S.S., Al-Juhani, W.S. and Mohamed, S.E. (2018). Molecular characterization and genetic relationships among some tomato genotypes as revealed by ISSR and SCoT markers. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, **47(1)**: 139-159.
- Adhikari, S., Saha, S., Biswas, A., Rana, T.S., Bandyopadhyay, T.K. and Ghosh, P. (2017). Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. *The Nucleus*, **60**: 283-297.
- Ahmed, D.A., Tahir, N.A.R., Salih, S.H. and Talebi, R. (2021). Genome diversity and population structure analysis of Iranian landrace and improved barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes using arbitrary functional gene-based molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **68(3)**: 1045-1060.
- Altıntaş, S., Toklu, F.A.R.U.K., Kafkas, S.A.L.I.H., Kilian, B., Brandolini, A. and Özkan, H. (2008). Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding*, **127(1)**: 9-14.
- Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley, S.D. and Sorrells, M.E. (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, **36(1)**: 181-186.
- Ansari, A., Sikarwar, P., Lade, S., Yadav, H. and Ranade, S. (2016). Genetic diversity clusters in germplasm of Cluster Bean (*Cyamopsis tetragonoloba* L., Taub), an important food and an industrial legume crop. *Journal of Agricultural Science and Technology*, **18(5)**: 1407-1418.
- Aslan-Parviz, M., Omid, M., Rashidi, V., Etmian, A. and Ahmadzadeh, A. (2020). Evaluation of genetic diversity of durum wheat (*Triticum durum* desf.) genotypes using inter-simple sequence repeat (ISSR) and caat box-derived polymorphism (CBDP) markers. *Genetika*, **52(3)**: 895-909.
- Bai, Y. and Lindhout, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future?. *Annals of Botany*, **100(5)**: 1085-1094.
- Benoist, C., O'hare, K., Breathnach, R. and Chambon, P. (1980). The ovalbumin gene-sequence of putative control regions. *Nucleic Acids Research*, **8(1)**: 127-142.

- Bergougnoux, V.** (2014). The history of tomato: from domestication biopharming. *Biotechnology Advances*, **32(1)**: 170-189.
- Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J.** (2009a). Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, **27(1)**: 86-93.
- Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J.** (2009b). Conserved DNA-derived polymorphism (CDDP): a simple and novel method for generating DNA markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, **27(4)**: 558-562.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B.** (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1(4)**: 19-21.
- Ditta, A., Zhou, Z., Cai, X., Wang, X., Okubazghi, K.W., Shehzad, M., Xu, Y., Hou, Y., Sajid Iqbal, M., Khan, M.K.R. and Wang, K.** (2018). Assessment of genetic diversity, population structure, and evolutionary relationship of uncharacterized genes in a novel germplasm collection of diploid and allotetraploid *Gossypium* accessions using EST and genomic SSR markers. *International Journal of Molecular Sciences*, **19(8)**: 2401.
- Etminan, A., Pour-Aboughadareh, A., Mehrabi, A.A., Shooshtari, L., Ahmadi-Rad, A. and Moradkhani, H.** (2019). Molecular characterization of the wild relatives of wheat using CAAT-box derived polymorphism. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, **153(3)**: 398-405.
- Fabriki-Ourang, S., Golmohammadi, M. and Karimi, H.** (2019). Evaluation of genetic relationships among promising and commercial olive varieties using gene-targeted CAAT box-derived polymorphism (CBDP) markers. *Agricultural Biotechnology Journal*, **10(4)**: 93-109 (In Persian).
- Fabriki-Ourang, S. and Karimi, H.** (2019). Assessment of genetic diversity and relationships among *Salvia* species using gene targeted CAAT box-derived polymorphism markers. *Journal of Genetics*, **98(3)**: 1-10.
- FAO.** (2021). Food and Agriculture Organization, Statistics: FAOSTAT agriculture From <http://faostat.fao.org>.
- Korir, N.K., Diao, W., Tao, R., Li, X., Kayesh, E., Li, A., Zhen, W. and Wang, S.** (2014). Genetic diversity and relationships among different tomato varieties revealed by EST-SSR markers. *Genetics and Molecular Research*, **13(1)**: 43-53.
- Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A.K., Modi, D.R. and Pandey, B.K.** (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*, **2(4)**: 141-162.
- Gorji, A.M., Poczai, P., Polgar, Z. and Taller, J.** (2011). Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *American Journal of Potato Research*, **88(3)**: 226-237.
- Grover, A. and Sharma, P.C.** (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, **36(2)**: 290-302.
- Heidari Tootshami, Z. and Salari, H.** (2024). Genetic diversity of tomato's cultivars assessed through ISSR marker. *Agricultural Biotechnology Journal*, **16(1)**: 175-194 (In Persian).
- Heikrujam, M., Kumar, J. and Agrawal, V.** (2015). Genetic diversity analysis among male and female Jojoba genotypes employing gene targeted molecular markers, start codon targeted (SCoT) polymorphism and CAAT box-derived polymorphism (CBDP) markers. *Meta Gene*, **5**: 90-97.
- Henareh, M., Dursun, A. and Mandoulakani, B.A.** (2015). Genetic diversity in tomato landraces collected from Turkey and Iran revealed by morphological characters. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, **14(2)**: 87-96.
- Hu, J. and Vick, B.A.** (2003). Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter*, **21(3)**: 289-294.
- Jin, L., Zhao, L., Wang, Y., Zhou, R., Song, L., Xu, L., Cui, X., Li, R., Yu, W. and Zhao, T.** (2019). Genetic diversity of 324 cultivated tomato germplasm resources using agronomic traits and InDel markers. *Euphytica*, **215(4)**: 1-16.
- Li, G. and Quiros, C.F.** (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, **103(2)**: 455-461.
- MirMohammadi Maibody, S.A.M. and Golkar, P.** (2019). Application of DNA molecular markers in plant breeding. *Plant Genetic Researches*, **6(1)**: 1-30 (In Persian).
- Mirzaei, S. and Salari, H.** (2021). Study on the genetic diversity of tomato's cultivars via SCoT Marker. *Agricultural Biotechnology Journal*, **13(4)**: 101-120 (In Persian).

- Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M.** (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, **43(4)**: 1235-1248.
- Nabipour, M., Farsi, M., Nemmati, H. and Malekzadeh, S.** (2011). Study of genetic diversity of tomato genotypes using AFLP molecular markers and its relationship with heterosis. *Iranian Journal of Field Crops Research*, **10**: 354-360 (In Persian).
- Osawaru, M.E., Ogwu, M.C. and Aiwansoba, R.O.** (2015). Hierarchical approaches to the analysis of genetic diversity in plants: a systematic overview. *University of Mauritius Research Journal*, **21**: 1-36.
- Peakall, R.O.D. and Smouse, P.E.** (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6(1)**: 288-295.
- Perrier, X.A.F.P., Flori, A. and Bonnot, F.** (2003). Data analysis methods. *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*, **43**: 76.
- Pidigam, S., Thuraga, V., Munnam, S.B., Amarapalli, G., Kuraba, G., Pandravada, S.R., Nimmarajula, S. and Sudini, H.K.** (2021). Genetic diversity, population structure and validation of SSR markers linked to Sw-5 and I-2 genes in tomato germplasm. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **27(8)**: 1695-1710.
- Prevost, A. and Wilkinson, M.J.** (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, **98(1)**: 107-112.
- Puneeth, P.V., Lata, S., Yadav, R.K., Wankhede, D.P., Tomar, B.S., Choudary, H., Tomer, A., Bidaramali, V. and Talukdar, A.** (2023). Exploring the genetic diversity using CAAT box-derived polymorphism (CBDP) and start codon targeted (SCoT) markers in cultivated and wild species of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Genetic Resources and Crop Evolution*, **70(3)**: 749-761.
- Rahimi, J., Amini, F., Ramshini, H., Abedi, M. and Lotfi, M.** (2023). Estimation of gene action and genetic parameters for morphological traits in F1, F2 and F3 generations of tomato (*Lycopersicon esculantum* L.). *Plant Genetic Researches*, **9(2)**: 71-82 (In Persian).
- Ren, X., Zhang, X. and Wang, S.** (2011). Genetic diversity and relationship in 47 accessions of tomato by AFLP markers. In *2011 International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering*, 7605-7609. IEEE, Nanjing, China.
- Sarvmeili, J., Saidi, A., Farrokhi, N., Pouresmael, M. and Talebi, R.** (2020). Genetic diversity and population structure analysis of landrace and wild relatives of lentil germplasm using CBDP marker. *Cytology and Genetics*, **54(6)**: 566-573.
- Shaygan, N., Etminan, A., Majidi Hervan, I., Azizinezhad, R. and Mohammadi, R.** (2021). The study of genetic diversity in a minicore collection of durum wheat genotypes using agro-morphological traits and molecular markers. *Cereal Research Communications*, **49**: 141-147.
- Singh, A.K., Rana, M.K., Singh, S., Kumar, S., Kumar, R. and Singh, R.** (2014). CAAT box-derived polymorphism (CBDP): a novel promoter-targeted molecular marker for plants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **23(2)**: 175-183.
- Singh, B.D. and Singh, A.K.** (2015). Phylogenetic Relationships and Genetic Diversity. In: Singh, B.D. and Singh, A.K., Eds., *Marker-Assisted Plant Breeding: Principles and Practices*, pp. 319-321. Springer New Delhi Publisher, Heidelberg, DE.
- Soorni, A., Nazeri, V., Fatahi, R. and Ahadi, E.** (2013). Study of genetic diversity of medicinal plant *Leonurus cardiac* some population in Iran using RAPD Marker. *Agricultural Biotechnology Journal*, **5(2)**: 101-118 (In Persian).
- Spooner, D., Van Treuren, R. and De Vicente, M.C.** (2005). Genbank Management. In: Spooner, D., Van Treuren, R. and De Vicente, M.C., Eds., *Molecular Markers for Genebank Management*, pp. 36-39. Bioversity International Publisher, Rome, IT
- Talebi, R., Nosrati, S., Etminan, A. and Naji, A.M.** (2018). Genetic diversity and population structure analysis of landrace and improved safflower (*Cartamus tinctorious* L.) germplasm using arbitrary functional gene-based molecular markers. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, **32(5)**: 1183-1194.
- Wang, Y., Tang, X., Cheng, Z., Mueller, L., Giovannoni, J. and Tanksley, S.D.** (2006). Euchromatin and pericentromeric heterochromatin: comparative composition in the tomato genome. *Genetics*, **172(4)**: 2529-2540.
- Zhong, X.B., Fransz, P.F., Wennekes-van Eden, J., Ramanna, M.S., van Kammen, A., Zabel, P. and Hans de Jong, J.** (1998). FISH studies reveal the molecular and chromosomal organization of individual telomere domains in tomato. *Plant Journal*, **13(4)**: 507-517.