گل و گیاهان زینتی (۱۴۰۰)، ۶(۲): ۹۵-۱۰۶
مقاله مروری
DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.95

تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی در گیاهان زینتی

هانیه هادیزاده، لیلا سمیعی*
گروه پژوهشی گیاهان زینتی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
samiei@um.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۶، تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۶/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۲

چکیده

بهنژادی مولکولی برای بسیاری از گیاهان زینتی با چالش‌های زیادی ازجمله اندازه بزرگ ژنوم، چندگانی و یا نبود منابع ژنتیکی کافی روبه‌رو است. توالی‌یابی نسل بعدی (NGS)، روشی موثر برای گسترش تعداد زیادی از نشانگرهای DNA در یک بازه زمانی کوتاه است. درحال‌حاضر، چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) به عنوان یکی از محبوب‌ترین نشانگرهای DNA، شناخته می‌شوند و در بسیاری از بررسی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از روش‌هایی که امروزه به کمک نشانگر SNP برای ارزیابی ژرم‌پلاسم گیاهی با ژنوم‌های پیچیده و توالی‌یابی‌نشده نوآوری شده است، روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی (GBS) می‌باشد. تاکنون، از این روش برای بهنژادی و ارزیابی ژنتیکی ژرم‌پلاسم برخی از گونه‌های گیاهان زینتی از جمله رز، ارکیده و اطلسی استفاده شده است. از میان این بررسی‌ها، یک پژوهش روی ادریسی با هدف بررسی پویش کل ژنومی (GWAS)، ده پژوهش برای بررسی گوناگونی ژنتیکی گونه‌های زینتی مختلف از جمله *Gloxinia*، ارکیده *Dendrobium* و همچنین درختان زینتی *Franklinia alatamaha* Marshall و *Cornus florida* L.، چهار بررسی برای ساخت و تکمیل نقشه ژنتیکی گیاهانی از جمله رز و اطلسی و سه بررسی برای گسترش نشانگرهای مولکولی در گونه‌های رز، یاس بنفش و ادریسی و یک پژوهش برای بررسی گوناگونی ژنتیکی درون و بین‌گونه‌ای سریش‌های ایران انجام شده است. از این روش می‌توان برای شناسایی گوناگونی ژنتیکی برای ساخت نقشه‌های ژنتیکی لینکاژی با تراکم بالا و کشف نشانگرهای مولکولی لازم در بررسی‌های QTL، GWAS و همچنین برای شناسایی ژن‌های نامزد ازجمله ژن‌های کنترل‌کننده فرآیند گلدهی بهره برد. روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی با توجه به هزینه کم به ازای هر نشانگر در مقایسه با سایر روش‌های تعیین نژادگان موجود در دنیا و همچنین کارایی و دقت بالا، می‌تواند به شکل گسترده‌ای در بررسی‌های ژنتیکی، توالی‌یابی و بهنژادی گیاهان زینتی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: توالی‌یابی نسل بعد، تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی، گیاهان زینتی، نشانگرهای مولکولی.

مقدمه

گسترش ابزارهای مولکولی و ژنتیکی برای بهنژادی گیاهان زینتی، به دلایل مختلفی از جمله تعداد بسیار زیاد گونه‌های زینتی، پیچیدگی و بزرگ بودن اندازه ژنوم (لاله- لیلیوم) [۱]، فاز نونهالی طولانی، چندگانی[۲] (رز- داوودی)[۳] و هتروزیگوسیتی بالا، فرآیندی زمان‌بر می‌باشد و بنابراین بهنژادی گیاهان زینتی در مقایسه با سایر محصولات کشاورزی با سرعت کمتری پیش رفته است (Yagi, 2015).

در سالهای گذشته به دلیل پیشرفت‌های چشمگیر در روش‌های مولکولی از جمله توالی‌یابی NGS[۴]، ظهور سیستم‌های تشخیص خودکار نشانگرهای SNP[۵] برای تعیین ساختار ژنتیکی و همچنین گسترش روش‌ها و نرم‌افزارهای تحلیل داده‌ها، پتانسیل لازم جهت گسترش ابزارهای مولکولی و بهنژادی گیاهان زینتی حتی در محصولاتی که دارای چندگانی هستند و گونه‌های غیرمدل که ژنوم مرجع ندارند نیز فراهم شده است (Smulders and Arens, 2018). به‌منظور کاهش هزینه‌ها و همچنین پیشگیری از کاهش کیفیت نشانگرهای SNP، روش‌های مختلفی ابداع شده‌اند که بیشتر شامل توالی‌یابی بخشی از کل ژنوم می‌باشند. سه روش اصلی کاهش پیچیدگی ژنوم که تا به امروز معرفی شده‌اند، شامل کتابخانه‌های نماینده‌های کاهش‌یافته ژنوم (RRL[۶])، توالی‌یابی DNA مرتبط با محل‌های محدودشده (RAD)[۷] و روش تعیین ساختار ژنتیکی به‌وسیله توالی‌یابی (GBS[۸]) می‌باشند (Davey *et al*, 2011).

تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی

پیشرفت‌های حاصل از فناوری NGS، روشی جدید، به‌نسبت ساده و مقرون‌به‌صرفه در مقایسه با سایر روش‌های موجود در دنیا به نام تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی را معرفی نمود. به کمک این روش، ردیابی تفاوت توالی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در جمعیت های بزرگ به صورت مستقیم و با سرعت بیشتری انجام می‌گیرد. این آزمایش‌ها معمولا برای بررسی گوناگونی و همچنین نقشه‌یابی یک صفت یا جهش انجام می‌شود (Poland and Rife, 2012). در این رویکرد، از آنزیم‌های برشی برای هدف قراردادن نقاطی از ژنوم که پوشش کافی از توالی ژنوم را دارا می‌باشند، استفاده می‌شود. کاهش پیچیدگی ژنوم با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده در روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی به‌این معنی است که در صورت وجود هرگونه جهش در محل برش آنزیم‌های محدودکننده، DNA ژنومی این منطقه برای تکثیر PCR در دسترس نخواهد بود و درنتیجه نشانگرهای SNP این منطقه غیرقابل‌دسترس خواهند شد. رویکرد تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی، با توجه به هدف پژوهش می‌تواند بر اساس توالی‌یابی بخشی از کل ژنوم و یا توالی‌یابی کل ژنوم برنامه‌ریزی شود. تصمیم‌گیری نهایی در این خصوص، به عوامل مختلفی مانند محتوای تکراری ژنوم، چندگانی و وجود یا عدم وجود همولوگ در گیاه مورد نظر بستگی دارد (Elshire *et al*., 2011). کاهش پیچیدگی ژنوم در این روش، بر اساس الگوی متمایز متیلاسیون ژنوم گیاهان مختلف شکل گرفته است. با استفاده از آنزیم‌های برشی حساس به متیلاسیون برای هضم DNA، مناطق تکراری

۱- Tulipa L. - Lilium L.
۲- Polyploidy
۳- Rosa L. - Chrysanthemum L.
۴- Next generation sequencing
۵- Single Nucleotide Polymorphism
۶- Reduced Representation Library
۷- Restriction Site-associated DNA
۸- Genotyping-by-Sequencing

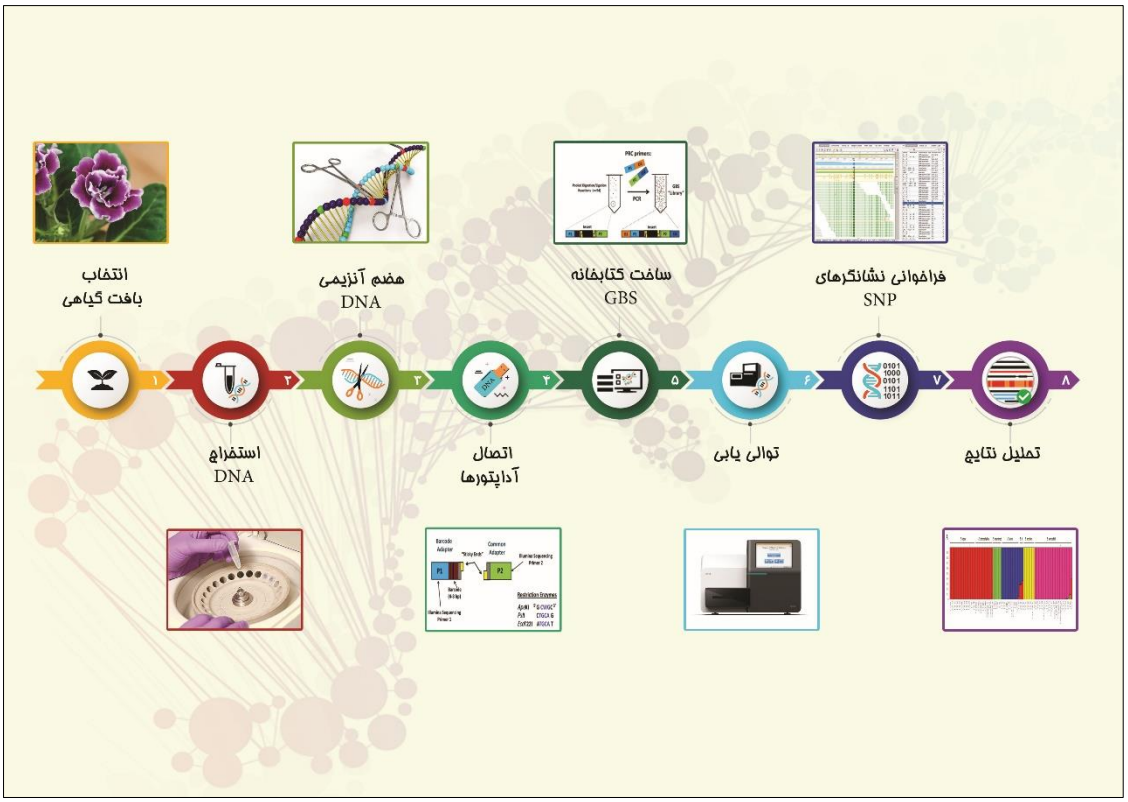
ژنوم که متیلاسیون زیادی دارند حذف می‌شوند و مناطق غنی از ژن با کارایی دو تا سه برابر مورد هدف قرار می‌گیرند (Rabinowicz *et al.*, 2005).

روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی مزایای بسیاری دارد، ازجمله این‌که نیاز به اطلاعات اولیه از ژنوم گیاه مورد نظر وجود ندارد و همچنین تمام نشانگرهای شناسایی‌شده‌ی جدید، از جمعیتی منشأ می‌گیرند که نژادگان آن تعیین شده است (Deschamps *et al.*, 2012). فن‌آوری تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی به‌دلیل شناسایی تعداد زیاد نشانگرSNP درمورد گیاهان زینتی که اطلاعات ژنتیکی کافی برای گسترش نشانگر در آنها وجود ندارد و بیشتر آنها فاقد ژنوم مرجع هستند، بسیار کارآمد می‌باشد (Chen *et al.*, 2017). روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی معایبی نیز دارد که از جمله آنها می‌توان به وجود حجم زیادی از داده‌های ازدست‌رفته به دلیل توالی‌یابی بخشی از ژنوم و همچنین پوشش نابرابر ژنوم به دلیل استفاده از آنزیم‌های محدودکننده و انتخاب قطعاتی با اندازه مشخص را اشاره نمود (Beissinger *et al.*, 2013; Davey *et al.*, 2011).

تاکنون از این روش به‌شکل موفقیت‌آمیزی برای نقشه‌یابی ژنتیکی، ارزیابی گوناگونی ژنتیکی، بررسی ساختار جمعیت و تعیین نژادگان استفاده شده است. نقشه‌های ژنتیکی ایجادشده با این روش، به شناسایی مکان‌های ژنی منحصربه‌فرد در افراد مختلف یک جمعیت درحال‌تفرق کمک خواهند کرد (Poland and Rife, 2012). همچنین تاکنون از این روش، برای شناسایی نشانگرهای SNP درون یک جنس و یا گونه‌های غیرمدل دارای ژنوم بزرگ‌تر از ۳ مگا باز استفاده نشده است (Hadizadeh *et al.*, 2020).

فن‌آوری تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی شامل پنج مرحله اصلی شامل آماده سازی نمونه، ساخت کتابخانه، توالی‌یابی، فراخوانی نشانگرهای SNP و آنالیز داده‌ها می‌باشد. مراحل انجام روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی در شکل ۱ نشان داده شده است (He *et al.*, 2014). ابتدا استخراج DNA از بافت گیاه موردنظر صورت گرفته وکیفیت وکمیت DNA استخراج شده بررسی می‌شود. سپس هضم DNA با استفاده از آنزیم‌های برشی انجام می‌شود. از مراحل حساس و مهم در ساخت کتابخانه ژنی، انتخاب آنزیم برشی است که انتهای آویزان با دو یا سه نوکلئوتید در DNA ایجاد کند و درعین‌حال در بخش‌های تکراری ژنوم، قطعات برش خورده زیادی تولید نشود. در این روش به دلیل حذف مرحله انتخاب اندازه قطعات کتابخانه، به حداکثر رساندن تعداد قطعات با اندازه مطلوب برای توالی‌یابی (۱۰۰ تا ۴۰۰ جفت باز) از اهمیت زیادی برخوردار است (Elshire *et al.*, 2011). آنزیم‌های *ApeK*I، *Pst*I، *Msp*I از مهم‌ترین آنزیم‌های کاربردی برای رویکرد تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی می‌باشند. در مرحله بعدی، دو نوع آداپتور شامل آداپتور معمولی و آداپتور بارکددار به صورت تصادفی به قطعات برش‌خورده متصل می‌شوند. به ازای هر نمونه، یک بارکد اختصاصی طراحی می‌شود و قطعات DNA تکثیرشده با بارکدهای مختلف، نماینده‌های کتابخانه GBS خواهند بود. سپس توالی یابی کتابخانه در دستگاه تعیین توالی NGS انجام می‌شود. در مرحله آخر، داده‌های حاصل از توالی‌یابی در پلت‌فرم‌های مختلف از جمله iseq، Miniseq، Misseq، Nextseq و Novaseq تجزیه و بسته به هدف پژوهش، کاربردهای متفاوتی از نتایج تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی حاصل می‌شود. پایپ‌لاین‌هایی که برای پردازش داده‌های GBS براساس ژنوم مرجع استفاده می شوند، شامل

TASSEL-GBS، Fast-GBS وStacks می‌باشند. همچنین پایپ‌لاین‌هایی از جمله TASSEL-UNEAK، Stacks وGBS-SNP-CROP برای تحلیل داده‌های به‌دست‌آمده ازگونه‌های فاقد ژنوم مرجع گسترش پیدا کرده‌اند (Qi *et al*, 2018).



شکل ۱- مراحل شماتیک روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی برای بهنژادی گیاهی (He و همکاران، ۲۰۱۴).

Figure 1. Schematic steps of the GBS method for plant breeding (He *et al*., 2014).

تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی در گیاهان زینتی

تا به امروز، مطالعه‌های محدودی در رابطه با استفاده از روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی در گونه‌های گیاهان زینتی صورت گرفته است که بیشتر آن‌ها روی بررسی گوناگونی ژنتیکی وتولید نقشه‌های ژنتیکی متمرکز بوده‌اند (جدول ۱).

بررسی گوناگونی ژنتیکی

نشانگرهایSNP درمقایسه با سایر نشانگرهای مولکولی به‌دلیل داشتن ویژگی‌هایی ازجمله فراوانی در ژنوم و همچنین پایداری و سهولت در نمره‌دهی، به نشانگر محبوب پژوهشگران در آزمایش‌های گوناگونی ژنتیکی تبدیل شده‌اند. روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی مزایای بسیاری در مطالعه‌های گوناگونی ژنتیکی درگیاهان زینتی دارد. از جمله قابلیت‌های این روش این است که در آن شناسایی نشانگر و تعیین نژادگان به صورت همزمان و در یک مرحله انجام می‌شود که این ویژگی منجر به سرعت بخشیدن، افزایش کارایی و کاهش هزینه‌های فرآیند ارزیابی گوناگونی ژنتیکی می‌شود (Poland and Rife, 2012). همچنین در این روش نیاز به اطلاعات قبلی از ژنوم گیاهی وجود ندارد و بنابراین برای گونه‌های زینتی غیرمدل که ژنوم آنها پیشتر توالی‌یابی نشده است نیز قابل استفاده می‌باشد. افزون‌براین، امکان تولید تعداد زیادی از داده‌های SNP در سطح گسترده‌ی ژنوم و درنتیجه نمونه‌برداری بهتر از ژنوم فراهم می‌شود (Fu *et al*, 2014).

جدول ۱- کاربردهای روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی در گیاهان زینتی بر اساس بررسی‌های موجود.

Table 1. Applications of GBS method in ornamental plants based on existing studies

منبع Reference	گونه گیاهی Plant species	کاربرد روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی GBS approach application	ردیف Row
Ahrens *et al*., 2017	*Diuris* Sm.	بررسی گوناگونی ژنتیکی Genetic diversity analysis	**1**
Ryu *et al*., 2019	*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.		
Gladfelter *et al.*, 2020	*Franklinia alatamaha* W.Bartram ex Marshall		
Pais *et al*., 2016	*Cornus florida* L.		
Hadizadeh *et al.*, 2020	*Eremurus*		
Hasing *et al*., 2019	*Sinningia speciosa* Baill.		
Wu and Alexander, 2019	*Hydrangea macrophylla* Thunb.		
Tamaki *et al*., 2017	*Rhododendron japonoheptamerum* Kitam	تهیه نقشه های ژنتیکی Genetic maps construcion	**2**
Yoichi *et al*., 2018	*Rhododendron indicum* L.		
Yadav *et al*., 2019	*Rhododendron canascens* Michx		
Buti *et al*., 2016	*Physocarpus* (Cambess.) Raf.		
Yan *et al*., 2018	*Rosa* L.		
Guo *et al*., 2017	*Petunia* Juss.		
Zhang *et al.*, 2019	*Paeonia suffruticosa* Andrews.		
Wu and Alexander, 2020	*Hydrangea macrophylla* Thunb.	پویش کل ژنوم GWAS	**3**
Heo *et al*., 2017	*Rosa* × *hybrida*	گسترش نشانگرهای مولکولی Molecular marker development	**4**
Chen *et al*., 2020	*Syringa pubescens* × *Syringa meyer*i		
Tränkner, 2019	*Hydrangea macrophylla* Thunb.		

برخلاف مزایای بسیار روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی در بررسی‌های گوناگونی ژنتیکی گیاهان، همچنان محدودیت‌هایی در استفاده از این روش وجود دارد. ازجمله این محدودیت‌ها، سازگاری اندک ابزارهای آنالیز ژنتیک جمعیت با حجم بالای داده‌هایی است که در این روش تولید می‌شوند. به عنوان مثال نرم افزار GenAlEx تنها می‌تواند تا ۸۰۰۰ SNP را تحلیل نماید، حال‌آنکه تعدادSNP های تولیدشده در روش تعیین ساختار ژنتیکی با کمک توالی‌یابی در بسیاری از موارد بسیار بیشتر از این تعداد می‌باشد. همچنین تجزیه وتحلیل تعداد بیشتر از ۱۰۰۰۰ SNP در نرم‌افزار STRUCTURE به هفته‌ها زمان نیاز دارد (Peterson *et al*., 2014).

از روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی برای بررسی گوناگونی ژنتیکی تعداد محدودی از گونه‌های ارکیده استفاده شده است. گوناگونی ژنتیکی بین و درون گونه‌ای چهار گونه ارکیده *Diuris* Sm. در معرض خطر انقراض، با استفاده از روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی بررسی شد (Ahrens *et al*., 2017). این بررسی با گسترش ۱۱۸۷۶۴ نشانگر

SNP در ۳۳۲ نمونه ارکیده جمع آوری شده از استرالیا، به شناسایی ساختار جمعیت با وضوح نسبتا بالا کمک شایانی نمود و علاوه بر آن توانست گوناگونی ژنتیکی بالایی را بین نژادگان‌های مختلف ارکیده شناسایی نماید.

همچنین نژادگان‌های تجاری و جهش‌یافته ارکیده *Dendrobium* Sw. با استفاده از روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی مورد بررسی قرار گرفتند و در نتیجه نشانگرهای SNP اختصاصی برای گونه *D. candidum* Wall. ex Lindl. معرفی شد (Ryu *et al*., 2019). سپس با کمک نشانگرهای اختصاصی جدید، برآورد دقیقی از گوناگونی ژنتیکی این گیاهان بدست آمد و همچنین آنالیز فیلوژنتیک و گسترش نشانگر KASP[1] نیز در نمونه‌های جهش‌یافته *Dendrobium* انجام شد.

در پژوهش دیگری در رابطه با بررسی ساختار جمعیت ۱۱۵ نژادگان کشت‌شده و انواع وحشی گیاه زینتی گلوکسینیا[۲] با استفاده از روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی مشخص شد که برخلاف گوناگونی فوق‌العاده زیاد مشاهده‌شده در واریته‌های اهلی‌شده این گیاه، تمام نژادگان‌ها از یک جمعیت اولیه در برزیل منشأ گرفته‌اند و بر اساس نتایج این مطالعه، گلوکسینیا به‌عنوان گیاه مدل مناسب برای مطالعه گوناگونی ژنومی در طی اهلی‌سازی پیشنهاد شد (Hasing *et al*., 2019).

در جدیدترین پژوهشی که با استفاده از رویکرد تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی روی ادریسی[۳] انجام شد، گوناگونی ژنتیکی و ساختار جمعیت ۸۲ نژادگان از این گونه آشکار شد. همچنین با استفاده از ۵۸۰۳ نشانگر SNP به‌دست‌آمده، طبقه‌بندی دقیق ژرم‌پلاسم در این گونه مشخص شد (Wu and Alexander, 2019).

در پژوهش دیگری که برای اولین بار با استفاده از تکنیک تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی روی درخت زینتی *Franklinia alatamaha* W.Bartram ex Marshall صورت گرفت، تعداد ۹۶۰۴ نشانگر SNP شناسایی و همچنین گوناگونی ژنتیکی و ساختار جمعیت ۷۶ نمونه از این گونه بررسی و تعیین شد (Gladfelter *et al*., 2020). همچنین با استفاده از این روش، چندشکلی موجود در ۱۹ گیاه جهش‌یافته حاصل از بذرهای اشعه دیده با پرتوهای گاما نیز تشخیص داده شد. تمایز ژنتیکی شناسایی‌شده در این مطالعه می‌تواند برای گسترش ویژگی‌های جدید باغبانی در این گونه زینتی استفاده شود.

استفاده از رویکرد تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی درگونه زینتی *Cornus florida* L.، توانست اساس ژنتیکی سازگاری اکولوژیکی و جایگاه‌های کروموزومی مسئول سازگاری در سه زیستگاه مختلف این‌گونه را آشکار نماید (Pais *et al*., 2016). گوناگونی ژنتیکی بالای برآوردشده در بین افراد ۶ جمعیت مختلف از این گونه، تاثیر پراکندگی بذر توسط پرندگان را نشان می‌دهد.

همچنین برای اولین بار در ایران، استفاده از فن‌آوری تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی روی گیاه زینتی سریش[۴] از خانواده Asphodelaceae با ژنوم بسیار بزرگ با اندازه ۸ گیگا باز گزارش شد. لازم به ذکر است که درحال‌حاضر هیچ کدام از جنس‌ها و گونه‌های این خانواده توالی‌یابی نشده‌اند (Hadizadeh *et al*., 2020). برخلاف فقدان ژنوم مرجع در این گیاه، بررسی گوناگونی درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای جنس سریش با استفاده از روش‌های مختلف فراخوانیSNP روی یک مجموعه داده انجام و تعداد ۳۰۰۲ نشانگرSNP با موفقیت شناسایی شدند. همچنین ژنوم مرجع برای هفت گونه سریش شامل

1- Competitive Allele-specific PCR (KASP)

۲- *Sinningia speciosa* Baill.

۳- *Hydrangea macrophylla* Thunb.

۴- Foxtail lily

۲۰۱۰۹۹ Tag ساخته شد. در این مطالعه، کاربرد موفقیت‌آمیز آنزیم محدودکننده حساس به متیله‌شدن *PstI* در ترکیب با آنزیم *MspI* روی ژنوم سریش نشان داده شد.

روش جدید تعیین نژادگان چندگانه ISSR توسط توالی‌یابی بر اساس رویکرد تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی (MIG-seq[1]) برای شناسایی نشانگرهای SNP، بررسی گوناگونی ژنتیکی و تعیین ساختار جمعیت گونه‌ای از آزالیا[2] به‌کاربرده شد (Tamaki *et al*., 2017). نتایج این پژوهش، هیچ گونه ارتباطی بین تعداد قطعات گل و درصد تبار در میان افراد متعلق به جمعیت‌های متشکل از دو رقم Hondonse و Kyomaruense را مشخص نکرد.

در بررسی دیگری با استفاده از فن MIG-seq روی ۱۵۸ نژادگان ازگونه آزالیای ژاپنی[3]، ارزیابی ساختار جمعیت و شناسایی نشانگرهای SNP صورت گرفت (Yoichi *et al*, 2018). تعداد SNP های چندشکلی[4] درون جمعیت بین ۹ تا ۴۷ عدد متغیر بود و دو گروه کاملا متفاوت ژنتیکی که هر دو به طور مستقل از گونه *R. kaempferi* Planch. تکامل پیدا کرده بودند، شناسایی و سطح بالایی از گوناگونی ژنتیکی در میان جمعیت‌ها مشاهده شد.

در راستای پژوهش‌های پیشین روی گیاه آزالیا، مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹ با استفاده از روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی روی گونه دیگری از گیاه آزالیا[5] انجام شد (Yadav *et al*., 2019). ساختار ژنتیکی و گوناگونی مجموعه ژرم‌پلاسم در این گونه آشکار شد و سه جمعیت متمایز در بین نمونه‌ها به وسیله نرم‌افزار Structure و دو پلت فرم STACKS و GBS-SNP-CROP شناسایی شد. همچنین در این پژوهش، تعداد ۳۱۸۵ نشانگر SNP برای ۹۶ نمونه آزالیا تشخیص داده شد. سطح بالای گوناگونی ژنتیکی مشاهده شده در این مجموعه ژرم‌پلاسم، نشان می‌دهد که غربال‌کردن گوناگونی آللی در ژن‌های کنترل‌کننده معماری گیاه می‌تواند به عنوان یک روش توانمند در جهت سرعت بخشیدن بهنژادی گیاهان با فرم جدید مطرح شود (Yadav *et al*., 2019).

تهیه نقشه ژنتیکی و تعیین مکانهای ژنی کمی

تهیه نقشه‌های ژنتیکی با وضوح بالا در ناحیه ژنومی حاوی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده ویژگی‌های کمی[6] مرتبط با ویژگی‌های مطلوب در گیاهان زینتی می‌تواند فرایند بهنژادی و بررسی‌های ژنتیکی در این حوزه را تسهیل نماید. امروزه یکی از روش‌های محبوب برای ترسیم نقشه‌های ژنتیکی، فن‌آوری تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی می‌باشد.

در مطالعه‌ای با استفاده از روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی، برای اولین بار اطلاعات توالی بین دو جنس نزدیک به هم از تیره Rosaceae (*Physocarpus* که یک جنس زینتی است و *Prunus* که جنس خواهری آن می‌باشد) مورد مقایسه قرار گرفت و موجب گسترش نقشه لینکاژی *Physocarpus* به‌وسیله نشانگرهای SNP شد (Buti *et al*., 2016). تعداد ۲۲۲ نشانگر SNP، اورتولوگ‌های قابل اعتماد در ژنوم *Prunus* را شناسایی کردند و به این وسیله مقایسه صحیح و معنادار دو ژنوم از جنس‌های خواهری امکان پذیر شد. این مکان‌های ژنی در طول نه کروموزوم *Physocarpus* و هشت کروموزوم *Prunus* توزیع شده بودند. نتایج این بررسی نشان داد، سطح بالایی از تشابه‌های ژنومی کلی[7] بین دو ژنوم *Physocarpus* و *Prunus*

۱- Multiplexed ISSR GBS ۲- *Rhododendron japonoheptamerum* Kitam. ۳- *R. indicum* L.

۴- Polymorphic ۵- *Rhododendron canascens* Michx. ۶- Quantitative Trait Loci ۷- Macro-synteny

وجود دارد که نشان‌دهنده مدل ساده تکامل ژنتیکی در خانواده Rosaceae است و روشن شدن این مطلب به شناخت وضعیت ژنتیکی جنس *Prunus* کمک شایانی نمود.

همچنین در مطالعه‌ای دیگر با استفاده از نوع جدیدی از تکنیک تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی به نام Tunable GBS، دانشمندان توانستند نقشه‌های لینکاژی با تراکم نشانگری بالا برای دو جمعیت RIL[1] اطلسی تولید کنند (Guo *et al.*, 2017). در این پژوهش، تعداد ۶۲۹۱ نشانگر SNP برای جمعیت اول (*P. axillaris* × *P. exserta*) و ۳۲۹۷ نشانگر SNP برای جمعیت دوم (*P. integrifolia* × *P. axillaris*) شناسایی شد و نقشه‌های ژنتیکی به ترتیب با ۷ و ۱۴ گروه لینکاژی برای جمعیت اول و دوم ساخته شدند. بر اساس نتیجه‌ها و نقشه‌های ژنتیکی بدست‌آمده از این مطالعه، امکان درک مبنای ژنتیکی زمان گلدهی و میزان نمو در اطلسی فراهم شد.

در مطالعه‌ای جدید با استفاده از تکنیک تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی، نقشه‌ای با تراکم نشانگری بالا با استفاده از ۳۵۲۷ نشانگر SNP برای اولین بار در رزهای دیپلوئید ایجاد شد (Yan *et al.*, 2018). همچنین نقشه ژنتیکی با استفاده از هر دو نشانگرهای SSR و SNP تهیه شد که این نقشه ۸۹۲ سانتی‌مورگان را پوشش داده و شامل ۷ گروه لینکاژی می‌باشد. نتایج این پژوهش، سطح بالایی از همتایی را در میان ژنوم‌های دیپلوئید رز و توت‌فرنگی شناسایی نمود. از آنجایی که این رویکرد به شکل موفقیت‌آمیزی برای رزهای دوگان به‌کارگرفته شده است، به نظر می‌رسد بتوان این روش را برای رزهای چارگان نیز استفاده کرد هر چند در این مسیر، احتمال مواجهه با چالش‌های پیش‌بینی نشده نیز وجود خواهد داشت.

کارایی روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی برای ساخت نقشه ژنتیکی در جنس گل صدتومانی[2] نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Zhang *et al.*, 2019). در این مطالعه، تعداد ۹۴۶۶۶۴ نشانگر SNP در جمعیت F_1 حاصل از تلاقی دو گونه *Paeonia ostti* × *Paeonia suffruticosa* تشخیص داده شد. به علاوه، نقشه یکپارچه با استفاده از ۳۸۶۸ نشانگر GBS که پوشش دهنده ۱۳۱۷۵۵ سانتی‌مورگان بود، ساخته شد. ردیابی مکان‌های ژنی انجام شده نیز شش مکان ژنی کنترل‌کننده ویژگی‌های ریختی شامل تعداد گل، تعداد گلبرگ، طول گلبرگ و مرحله گلدهی را شناسایی نمود.

پویش کل ژنوم

بررسی‌های پویش کل ژنوم (GWAS)[3] ابزار مناسبی برای تشخیص ویژگی‌های پیچیده در گیاهان با استفاده از تعداد زیادی نشانگر مولکولی توزیع شده در سراسر ژنوم مرتبط با گوناگونی ریختی می‌باشد. بنابراین هزاران نشانگر SNP گسترش‌یافته از طریق روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی برای ارزیابی ارتباط نشانگرها با ویژگی‌های مدنظر بهنژادگران قابل استفاده می‌باشند (Myles *et al.*, 2009). درسالهای گذشته، GWAS برای شناسایی آلل‌های عملکردی که منجر به صرفه‌جویی در زمان و هزینه در برنامه‌های بهنژادی می‌شوند، در بسیاری از گونه‌های زینتی از جمله رز و داوودی مورد استفاده قرار گرفته است (Rafalski, 2010).

نشانگرهای SNP مهم و مرتبط با ویژگی‌های زینتی از جمله نوع گل‌آذین و یا سایر ویژگی‌های کمی از جمله انواع مقاومت‌ها، از طریق فن‌آوری های مختلف توالی‌یابی از جمله SLAF-seq، RAD-seq، dd RAD-seq نیز قابل‌شناسایی

Genome wide association study -۳ *Paeonia* L. -۲ Recombinant Inbred Line- 1

هستند اما روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی یا GBS، روشی ساده‌تر و اقتصادی‌تر می‌باشد. نشانگرهایی که به وسیله روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی به دست می‌آیند را می‌توان به‌آسانی به نشانگرهای مولکولی قابل‌استفاده از جمله KASP و CAPSs[1] تبدیل کرد (Wu and Alexander, 2020).

در این راستا، مطالعه‌ای با هدف شناسایی نشانگرهای SNP مرتبط با نوع گل‌آذین و گلدهی بیش از یکبار در فصل رشد به وسیله پویش کل ژنوم در ادریسی انجام شد (Wu and Alexander, 2020). به این منظور از تعداد ۵۸۰۳ نشانگرSNP شناسایی‌شده در پژوهش پیشین (Wu and Alexander, 2019) برای انجام آنالیز GWAS در ۸۲ کولیتوار گل ادریسی استفاده شد. نتایج این مطالعه منجر به شناسایی یک جایگاه ژنی اصلیSNP مرتبط با نوع گل‌آذین شد که توسط یک تک ژن کنترل می‌شود.

گسترش نشانگرهای مولکولی

یکی دیگر از کاربردهای روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی، گسترش نشانگرهای مولکولی برای گونه‌های زینتی به خصوص گونه‌هایی که اطلاعات ژنومی کمتری از آنها در دسترس است، می‌باشد. برخلاف اینکه پایگاه‌های مختلف داده‌های DNA به صورت عمومی در اختیار پژوهشگران قرار دارد، همچنان نیاز به گسترش انواع نشانگر برای گونه‌های زینتی مدل و غیرمدل وجود دارد. با توجه به پیشرفت‌های گسترده در توالی‌یابی نسل بعد، گسترش نشانگرهای مولکولی با هزینه‌های کمتری حتی در گونه‌های با ژنوم بزرگ و میزان هتروزیگوسیتی و چندگانی بالا امکان‌پذیر شده است. همچنین نشانگرهای مولکولی را می‌توان برای هدایت مطالعات نقشه‌یابی برای مکان‌یابی ژن‌های موثر در ویژگی‌های مطلوب گل‌دهی استفاده کرد (Bagheri and Saki, 2017) .

به عنوان مثال با استفاده از روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی، تعداد ۱۷۷۸ نشانگرSNP برای ۷۹ رقم *Rosa hybrida*، گسترش پیدا کرد (Heo *et al*., 2017). هرچند در این آزمایش پژوهشگران با چالش‌هایی مانند مشکل در طراحی پرایمر، کیفیت پایین بازسازی توالی‌ها و تعداد زیاد داده‌های گم‌شده نیز روبه‌رو بوده‌اند.

در آزمایشی مشابه، از روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی برای گسترش نشانگرهای مولکولی در جمعیت F_1 گونه زینتی یاس بنفش حاصل از تلاقی بین 'Palibin' *Syringa meyer*i و 'Penda' *S. pubescens* استفاده شد (Chen, 2020). با توجه به نتایج این پژوهش، دو نشانگرSNP مرتبط با صفت چندبار گلدهی در جمعیت پاکوتاه این گیاه شناسایی شد. این مطالعه، کاربرد موفق روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی در گسترش نشانگر برای این گونه که فاقد ژنوم مرجع بود را نشان داد. بنابراین مطالعه حاضر در مسیر برنامه‌های بهنژادی آینده این گونه موثر خواهد بود.

در آزمایشی دیگر، نشانگرهای مرتبط با صفت نوع گل‌آذین از طریق آنالیز ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی در جمعیت F_1 گونه غیرمدل گل ادریسی گسترش یافت (Tränkner, 2019). نشانگرهایSNP بدست‌آمده در این مطالعه به میزان ۹۹/۷٪ با فنوتیپ گل‌آذین مرتبط بودند. افزون‌براین نشانگرهای به‌دست‌آمده از این پژوهش برای استفاده در برنامه‌های بهنژادی و انتخاب گونه‌های ادریسی پیشنهاد شدند.

۱- Cleaved Amplified Polymorphic Sequences

چشم انداز آینده

در حال حاضر، فن‌آوری‌های توالی‌یابی و تعیین نژادگان به سرعت در حال گسترش هستند و بر اساس آنها ابزارهای مولکولی مانند روش تعیین ساختار ژنتیکی به کمک توالی‌یابی نیز گسترش یافته‌اند. چنین روش‌هایی منجر به تسهیل و سرعت بخشیدن بهنژادی گیاهان حتی در گونه‌های زینتی با سطح هتروزیگوسیتی و چندگانی بالا و اطلاعات ژنتیکی پایه اندک می‌شود و به نظر می‌رسد که در آینده بهنژادی گیاهان زینتی نیز مانند گیاهان زراعی با سرعت بالاتری انجام شود و شاهد گیاهان زینتی با گوناگونی ریختی بالاتر و ویژگی‌های ویژه و برتر باشیم.

چالش سال‌های پیش‌رو، به‌کارگیری ابزارهای جدید مولکولی و استفاده از نرم افزارهای به روز تحلیل داده‌های حجیم حاصل از توالی‌یابی درجهت سرعت بخشیدن به بهنژادی گیاهان زینتی خواهد بود. با دردسترس قرارگرفتن توالی‌های بیشتری از ژنوم گونه‌های زینتی یا گونه‌های نزدیک به آنها، محققین قادرخواهند بود که از نشانگرهای مرتبط با یک صفت یا ناحیه ژنی کنترل‌کننده ویژگی‌های کمی به گوناگونی نهفته در ژن‌های نامزد دسترسی پیدا نمایند.

منابع

Ahrens, C.W., Supple, M.A., Aitken, N.C., Cantrill, D.J., Borevitz, J.O., James, E.A. (2017). Genomic diversity guides conservation strategies among rare terrestrial orchid species when taxonomy remains uncertain. *Annals of Botany*, *119*(8), 1267-1277.

Bagheri, H., Saki, S. (2017). Requirements and guidelines for the preservation of genetic resources of ornamental plants in Iran. *Journal of Flower and Ornamental Plants*, *1*(2), 24-33 (In Persian).

Beissinger, T.M., Hirsch, C.N., Sekhon, R.S., Foerster, J.M., Johnson, J.M., Muttoni, G., de Leon, N. (2013). Marker density and read depth for genotyping populations using genotyping-by-sequencing. *Genetics*, *193*(4), 1073-1081.

Buti, M., Sargent, D.J., Mhelembe, K.G., Delfino, P., Tobutt, K.R., Velasco, R. (2016). Genotyping-by-sequencing in an orphan plant species *Physocarpus opulifolius* helps identify the evolutionary origins of the genus *Prunus*. *BMC Research Notes*, *9*(1), 268-276.

Chen, H., Lattier, J.D., Vining, K., Contreras, R.N. (2020). Two SNP markers identified using genotyping-by-sequencing are associated with remontancy in a segregating F1 population of *Syringa meyeri* 'Palibin'× *S. pubescens* 'Penda'Bloomerang®. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *145*(2), 104-109.

Chen, W., Hou, L., Zhang, Z., Pang, X., Li, Y. (2017). Genetic diversity, population structure, and linkage disequilibrium of a core collection of *Ziziphus jujuba* assessed with genome-wide SNPs developed by genotyping-by-sequencing and SSR markers. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 575.

Davey, J.W, Hohenlohe, P.A, Etter, P.D, Boone, J.Q, Catchen, J.M. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*. *12* (7): 499–510.

Deschamps, S., Llaca, V., May, G.D. Genotyping-by-sequencing in plants. (2012). *Biology*. *1*(3), 460–483.

Elshire, R.J. Glaubits, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S., Mitchell, S.E. (2011). A robust, simple genotyping by sequencing approach for high diversity species. *PLoSONE*, *6*(5), e19379.

Fu, Y.B., Cheng, B., Peterson, G.W. (2014). Genetic diversity analysis of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) germplasm based on genotyping by sequencing. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *61*(3), 579-594

Gladfelter, H.J., Yadav, L.K., Merkle, S.A., Wilde, H.D. (2020). Genetic diversity and population structure analysis of *Franklinia alatamaha*, a tree species existing only in cultivation. *Tree Genetics & Genomes*, *16*(4), 1-9.

Guo, Y., Lin, W.K., Chen, Q., Vallejo, V.A., Warner, R.M. (2017). Genetic determinants of crop timing and quality traits in two interspecific Petunia recombinant inbred line populations. *Scientific Reports*, *7*(1), 1-12

Hadizadeh, H., Bahri, B.A., Qi, P., Wilde, H.D., Devos, K.M. (2020). Intra-and interspecific diversity analyses in the genus Eremurus in Iran using genotyping-by-sequencing reveal geographic population structure. *Horticulture Research*, *7*(1), 1-13.

Hasing, T., Rinaldi, E., Manrique, S., Colombo, L., Haak, D., Zaitlin, D., Bobarely, A. (2019). Extensive phenotypic diversity in the cultivated Florist's Gloxinia, *Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern, is derived from the domestication of a single founder population. *Plants, People, Planet Journal, 1* (4), 363-374.

He, J., Zhao, X., Laroche, A., Lu, Zh., Liu, H., Li., Z. (2014). Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 484

Heo, M.S., Han, K., Kwon, J.K., Kang, B.C. (2017). Development of SNP markers using genotyping-by sequencing for cultivar identification in rose (Rosa hybrida). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, *58*(3), 292-302.

Myles, S., Peiffer, J., Brown, P.J., Ersoz, E.S., Zhang, Z., Costich, D.E., Buckler, E.S. (2009). Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design. *The Plant Cell*, *21*(8), 2194-2202.

Novembre, J. (2014). Variations on a common STRUCTURE: new algorithms for a valuable model. *Genetics*, *197*(3), 809-811.

Pais, A.L., Whetten, R.W., Xiang, Q.J. (2016). Ecological genomics of local adaptation in *Cornus florida* L. by genotyping by sequencing. *Ecology and Evolution*, *7*(1): 441–465.

Peterson, G.W., Dong, Y., Horbach, C., Fu, Y.B. (2014). Genotyping-by-sequencing for plant genetic diversity analysis: a lab guide for SNP genotyping. *Diversity*, *6*(4), 665-680.

Poland, J.A., Rife, T.W. (2012). Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. *Plant Genome*. 5: 92-102.

Qi, P., Gimode, D., Saha, D., Schröder, S., Chakraborty, D., Wang, X., Devos, K.M. (2018). UGbS-Flex, a novel bioinformatics pipeline for imputation-free SNP discovery in polyploids without a reference genome: finger millet as a case study. *BMC Plant Biology*, *18*(1), 1-19.

Rabinowicz, P.D., Citek, R., Budiman, M.A., Nunberg, A., Bedell, J.A., Lakey, N., O'Shaughnessy, A.L., Nascimento, L.U., McCombie, W.R., Martienssen, R.A. (2005). Differential methylation of genes and repeats in land plants. *Genome Research*, *15*, 1431-1440.

Rafalski, J.A. (2010). Association genetics in crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, *13*(2), 174-180.

Ryu, J., Kim, W. J., Im, J., Kang, K.W., Kim, S.H., Jo, Y.D., Ha, B.K. (2019). Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery through genotyping-by-sequencing (GBS) and genetic characterization of *Dendrobium* mutants and cultivars. *Scientia Horticulturae*, *244*, 225-233.

Smulders, M. J., Arens, P. (2018). New Developments in Molecular Techniques for Breeding in Ornamentals. In *Ornamental Crops*. Johan Van Huylenbroeck. (pp. 213-230). Springer, Cham.

Tamaki, I., Yoichi, W., Matsuki, Y., Suyama, Y., Mizuno, M. (2017). Inconsistency between morphological traits and ancestry of individuals in the hybrid zone between two *Rhododendron japonoheptamerum* varieties revealed by a genotyping-by-sequencing approach. *Tree Genetics & Genomes*, *13*(1), 1-10.

Tränkner, C., Krüger, J., Wanke, S., Naumann, J., Wenke, T., Engel, F. (2019). Rapid identification of inflorescence type markers by genotyping-by-sequencing of diploid and triploid F 1 plants of Hydrangea macrophylla. *BMC Genetics*, *20*(1), 1-12.

Wu, X., Alexander, L. (2019). Genetic diversity and population structure analysis of Bigleaf *Hydrangea* using genotyping by sequencing. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *144* (4), 257-263

Wu, X., Alexander, L.W. (2020). Genome-wide association studies for inflorescence type and remontancy in *Hydrangea macrophylla*. *Horticulture Research*, *7*(1), 1-9.

Yadav, L.K., McAssey, E.V., Wilde, H.D. (2019). Genetic diversity and population structure of *Rhododendron canescens*, a native *Azalea* for urban landscaping. *HortScience*, *54*(4), 647-651.

Yagi, M. (2015). Recent progress in genomic analysis of ornamental plants, with a focus on carnation. *The Horticulture Journal*, *84*(1), 3-13.

Yan, M. Byrne, David, H. Klein, P., Yang, J., Dong, Q. (2018). Genotyping-by-sequencing application on diploid rose and a resulting high-density SNP-based consensus map. *Horticulture Research*, *5*(17), 1-14.

Yoichi, W., Kawamata, I., Matsuki, Y., Suyama, Y., Uehara, K., Ito, M. (2018). Phylogeographic analysis suggests two origins for the riparian azalea *Rhododendron indicum* (L.) Sweet. *Heredity*, *121*(6), 594-604.

Zhang, L., Guo, D., Guo, L., Guo, Q., Wang, H., Hou, X. (2019). Construction of a high-density genetic map and QTLs mapping with GBS from the interspecific F1 population of *P. ostii* 'Fengdan Bai'and *P. suffruticosa* 'Xin Riyuejin'. *Scientia Horticulturae*, *246*, 190-200.

Flower and Ornamental Plants (2021), 6(2): 95-106
Review article
DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.95

Application of GBS profiling in ornamental plants

Hanieh Hadizadeh, Leila Samiei*
Department of Ornamental Plants, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad
samiei@um.ac.ir
Received: 2021/04/26, Revised: 2021/09/11, Accepted: 2021/09/13

Abstract
The lack of sufficient genomic information of ornamental plants besides their polyploidy and large genome size are the main challenges ahead of their molecular breeding. Next-generation sequencing (NGS) is a viable method capable of developing a large number of DNA markers in a short course of time. Currently, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are recognized as one of the most studied and popular DNA markers using for various purposes in plant breeding. GBS (genotyping-by-sequencing) approach is one of the leading techniques that has emerged to evaluate the molecular characteristics of plants possessing complex or non-sequenced genomes using SNP markers. This method has so far been used for breeding and germplasm evaluation of some ornamental plant species including *Rosa*, *Petunia*, *Hydrangea*, and *Gloxinia*. Among these studies, one study is done to perform GWAS on *Hydrangea macrophylla* L., ten studies to investigate the genetic diversity of various ornamental species including *Gloxinia*, *Dendrobium* orchid, as well as ornamental trees *Franklinia alatamaha* Marshall and *Cornus florida* L., four studies to construct and elaborate the genetic map of plants species including *Rosa* and *Petunia*, three studies to develop molecular markers in rose, lilac and *Hydrangea* species and one study to investigate the genetic diversity within and between Iranian *Eremurus* spp. This is a potential method for examination of genetic diversity of plants, assembling high density genetic linkage maps, discovering the required molecular markers in QTL and GWAS studies, and verifying candidate genes including genes controlling the flowering process. Owing to the high efficiency and accuracy as well as the low cost per marker of this method compared to other genotyping techniques, GBS can be widely used in genetic studies, sequencing and breeding of ornamental plants.
Keywords: Next generation sequencing, Genotyping-by-sequencing, Ornamental plants, Molecular markers.