بررسی تنوع ژنتیکی برخی از توده‌های محلی طالبی ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره

Genetic Diversity Among Iranian Cantaloupe Landraces (*Cucumis melo*) Using Microsatellite Markers

اعظم مویدی‌نژاد[۱]، احمد ارشادی[۲*]، جهانگیر عباس کوهپایگانی[۳] و فرشاد دشتی[۲]

چکیده

در این بررسی تنوع ژنتیکی بین ۴۱ توده محلی طالبی (*Cucumis melo* L.) به همراه دو رقم خربزه (*Cucumis sativus* L.) از طریق تنوع در توالی‌های تکراری کوتاه با استفاده از ۱۲ جفت آغازگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت. دی ان آی ژنومی استخراج شده از نمونه‌های گیاهی با این آغازگرها تکثیر و محصولات حاصل با استفاده از ژل پلی اکریل آمید واسرشته ساز الکتروفورز شدند. در هفت توده مکان‌های ژنی سه یا چهار باندی مشاهده شد و احتمال می‌رود که این توده‌ها پلی‌پلوئید باشند. تعداد کل ۹۸ آلل با متوسط ۴/۹ آلل به ازا هر ترکیب آغازگری شناسایی شدند. فواصل ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها از صفر تا ۰/۷۶ متغیر بود. میانگین فاصله ژنتیکی (بر حسب ضریب تشابه نی) در میان ژنوتیپ ها ۰/۲۱۹ بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی برای مکان‌های ژنی تکثیر شده ۰/۵۴۲ بود. بیش‌ترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی مربوط به CMCT134b و معادل ۰/۷۷۱۶ بود، مکان‌های ژنی CMTC168، CMBR43 و CMAT141 بیش‌ترین مقدار PIC (محتوای اطلاعات چندشکلی) را به‌خود اختصاص داده بودند از مکان‌های ژنی با میزان PIC بالا می‌توان برای بررسی‌های بعدی استفاده کرد. روابط ژنتیکی بین توده‌های مورد ارزیابی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA بر اساس ماتریس ضرایب تشابه مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز خوشه‌بندی، توده‌ها را به ۱۱ گروه عمده تقسیم کرد. در دندروگرام تنوع ژنتیکی طالبی‌های ایرانی در گروه‌هایی متفاوت از رقم‌های خارجی، خصوصاً فرانسوی قرار گرفتند که تایید کننده تفاوت زیاد طالبی‌های ایران با آن‌ها می‌باشد. بیش‌ترین تفاوت بین ژنوتیپ‌های محلی داراب و آمریکایی و برابر ۷۶ درصد بود. رابطه قابل توجهی بین تنوع ژنتیکی و جغرافیایی مشاهده نشد، با این‌حال در داخل خوشه‌ها (گروه‌ها) و به‌خصوص درگروه ۲ در این زمینه ارتباطاتی دیده شد. توده‌های تتراپلوئید احتمالی عمدتاً در گروه اول قرار گرفتند. نمودار دو بعدی (تجزیه به مولفه‌های اصلی) تطابق خوبی با دندروگرام تنوع ژنتیکی داشت.

واژه‌های کلیدی: طالبی، نشانگرهای مولکولی، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره، آغازگر

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

۲. استادیاران گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

۳. استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

*: نویسنده مسوول

مقدمه

تعیین میزان تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی گام اولیه برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی و نیز پایه اساسی و اولیه برای تحقیقات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی می‌باشد *لاوی* (Lavi, 1994).

استفاده از نشانگرهای مولکولی یکی از ابزارهای بسیار مهم و قوی در این زمینه می‌باشد که در ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف کاربرد دارند. هم-چنین استفاده از این نشانگرها در مدیریت ژرم‌پلاسم و گزینش بر اساس نشانگر، برای افزایش کارایی اصلاح و تکثیر ژرم‌پلاسم مفید می‌باشد (Lefebvre & Chevre, 1995; Lebot & Lanaud, 1997). تاکنون به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین گروه‌های ملون و نیز به‌منظور ایجاد نقشه‌های لینکاژی از نشانگرهای ژنتیکی مختلفی استفاده شده است. در این میان استفاده از نشانگرهای DNA در بررسی‌های مربوط به تنوع ژنتیکی به-شدت مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از نشانگرهای DNA در ارزیابی‌های مربوط به تنوع ژنتیکی ملون از دهه ۱۹۹۰ آغاز شد. *نئوهاوسن* (Neuhausen, 1992) از RFLP برای تشخیص ارقام ملون استفاده کرد و دریافت که فقط ۳۳ درصد پروب‌های آزمایش شده برای تشخیص حداقل یکی از هفت گروه ملون آزمایش شده مفید بودند. *گارسیا* و همکاران (Garcia et al. 1998) و *استاب* و همکاران (Staub et al. 2000) با استفاده از مارکرهای RAPD ژرم-پلاسم ملون کشت شده در اروپا و آمریکای شمالی و *ملیکی* و همکاران (Mliki et al. 2001) تنوع ژنتیکی را در یک کلکسیون بزرگ از ژرم‌پلاسم ملون‌ها در آفریقا مطالعه کردند. *استپانسکی* و همکاران (Stepansky et al. 1999) طی یک مطالعه وسیع که بر روی ۵۴ نوع ملون زراعی و وحشی و با استفاده از مارکرهای RAPD و ISSR انجام دادند دو زیر گونه ملون یعنی melo و agrestis را شناسایی نمودند.

در بین انواع نشانگرهای مولکولی موجود، اخیراً ریزماهواره‌ها مورد توجه و استفاده بیشتری قرار گرفته‌اند (Ritschel et al. 2004). این نشانگرها به-دلیل سطوح بالای چندشکلی، صحت و دقت بالا و تکرار پذیری زیاد، به‌طور وسیعی برای شناسایی ارقام و تهیه نقشه‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Cipriani et al. 1999). استفاده عملی از نشانگرهای ریزماهواره در آنالیز ژنتیکی ملون خیلی محدود بوده است و تا به‌حال در حدود ۷۰ نشانگر ریزماهواره در مقالات شرح داده شده است و تعداد کمی از آن‌ها در آنالیزهای لینکاژی مورد استفاده قرار گرفته اند (Ritschel et al. 2004). *کاتزیر* و همکاران (Katzir et al. 1996) با بررسی بانک‌های اطلاعاتی و ساخت کتابخانه موفق شدند هفت مکان ژنی ریزماهواره در جنس *Cucumis* شناسایی و تعیین توالی کرده و از آن‌ها برای طراحی آغازگرهای SSR در خربزه طالبی و خیار استفاده کنند. این هفت لوکوس در هشت توده خربزه طالبی مورد آزمایش قرار گرفت و تنها ۵ تا از آن‌ها چندشکلی نشان دادند. *استاب* و همکاران (2000)، ۴۶ رقم از دو گروه ملون را با استفاده از RAPD و SSR مورد بررسی قرار دادند. *دانین پولگ* و همکاران (Danin-Poleg et al. 2001) با جستجو در بانک-های اطلاعاتی و ساخت کتابخانه و غربال کردن کتابخانه cDNA خیار، توالی‌های ریزماهواره را شناسایی و توالی‌یابی کردند و از آن‌ها برای طراحی آغازگرهای ریزماهواره بهره جستند. *لوپز-سز* و همکاران (Lopez-Sese et al. 2002) تنوع ژنتیکی در ۱۵ رقم از ژرم‌پلاسم‌های خربزه طالبی اسپانیایی را با استفاده از نشانگرهای RAPD و ۱۲ مکان ژنی SSR مورد بررسی قرار دادند. *مونفورته* و همکاران (Monforte, et al, 2003) ۱۸۰ آغازگر را در یک مجموعه از ۲۷ خربزه طالبی مورد بررسی قرار دادند.

در ایران کوهپایگانی (۱۳۸۳) به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی خربزه طالبی‌های ایران، تعداد ۱۰۰ نمونه از خربزه‌های مناطق مختلف را از لحاظ صفات مورفولوژیک مورد بررسی قرار داد. فیضیان (۱۳۸۳) با استفاده از ۱۰ آغازگر RAPD به ارزیابی تنوع ژنتیکی ۳۰ نمونه از گروه-های مختلف ملون پرداخت. زامیاد (۱۳۸۳) تنوع ژنتیکی ۳۰ نمونه از توده‌های خربزه بومی استان خراسان را با استفاده از ۱۰ آغازگر RAPD بررسی نمود. بهبهانی (۱۳۸۴) تنوع ژنتیکی ۳۵ نمونه از توده‌های خربزه بومی ایران را با ۱۵ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار داد. رضایی (۱۳۸۴) با استفاده از ۱۱ آغازگر ریزماهواره به ارزیابی تنوع ژنتیکی ۳۵ نمونه از گروه‌های مختلف ملون پرداخت.

با وجود سابقه کشت و کار طولانی توده‌ها و ارقام طالبی در ایران و وجود بیش از ۸۰۰ توده و رقم خربزه طالبی در کلکسیون بانک ژن، مطالعات چندانی بر روی آن-ها انجام نشده و اطلاعات دقیقی از تنوع ژنتیکی، روابط ژنتیکی و خویشاوندی و سطح پلوئیدی آن‌ها وجود ندارد. شناسایی و معرفی این توده‌ها و هم‌چنین بررسی میزان

قرابت آن‌ها اساسی‌ترین بخش در برنامه ریـزی‌هـای بعـدی جهت اصلاح عملکرد و کیفیت محصول به حساب می‌آید. با توجه به ارزش اقتصـادی بـالای گیاهـان جـالیزی و میـزان بالای تولیـد ایـن گیاهـان در ایـران و نیـز وجـود بازارهـای مناسب در خارج از کشور، ضرورت حمایت از ژرم پلاسم این گیاهان و تلاش برای اصلاح آنها روشن می شود که بررسـی تنوع ژنتیکی این گیاهـان بـه کمـک نشـانگرهای مولکـولی ریزماهواره گامی مهم در این امر به حساب می‌آید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

تعداد ۴۱ توده محلی از بذور انواع مختلف طالبی‌های موجود در بانک ژن موسسه تحقیقات اصـلاح و تهیـه نهـال و بذر کرج تهیه شد. هم‌چنین بـه‌منظـور مقایسـه، دو نمونـه از ارقام خربزه تهیه شده از دانشـگاه تربیـت مـدرس نیـز مـورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱: ارقام و توده‌های استفاده شده در پژوهش

Table 1: Cultivars and populations used in this study

محل جمع‌آوری یا نام بومی Collection place or local name	کد بانک ژن Gene bank code	محل جمع‌آوری یا نام بومی Collection place or local name	کد بانک ژن Gene bank code
Kerman	358259	France	358209
Garmak Mashhad	358254	France	358211
Semsouri Saveh	358255	France	358212
Zard Mashad	358256	Isfahan	358214
Local Kermanshah	358257	Semsouri	358216
Sabz Mashhad	358258	Garmak Kermanshah	358219
Semsouri Isfahan	358260	Mahali Darab	358225
anonymous	358261	Shiraz	358227
Local Abadeh	358262	Semsouri	358229
Garmak (anonymous)	358263	Afraieli	358231
anonymous	358264	Afraieli	358232
Mashhad	358265	Isfahan (Gerdabad)	358234
Shahabad Isfahan	358270	Isfahan (Haji abad)	358236
Rasht	358272	Isfahan	358237
Ghale	358273	Istgah Keshavarzi	358238
Mahali Isfahan	358275	Shalaf	358239
Shiraz	358282	Amrikaei	358240
Garmak Isfahan	358285	anonymous	358241
Oshnavieh	_	Saveh	358242
Zard Shotori (winter melon)	_	Semsouri Isfahan	358243
Birjandi (winter melon)	_	Local (anonymous)	358244
		Felestini	358249

۱: دو توده‌های طالبی از بانک ژن وابسته به موسسه اصلاح و تهیه بذر و نهال و دو رقم خربزه از کلکسیون دانشگاه تربیت مدرس تهیه شده‌است.

1: Muskmelon genotypes and two winter melon cultivars were supplied from Seed and Plant Improvement Institute and University of Tarbiat Modarres, respectively.

تـوده‌هـای مـورد بررسـی همگـی از گـروه Cantaloupensis (طالبی‌ها) بودند. از هر توده تعداد ۱۰ بـذر در دستمال مرطوب و شرایط اطاق رشد گذاشته شد تا جوانه‌زنی صورت گیرد. پس از جوانه زنی، بذور مربوط به هـر تـوده

در گلدان‌های جداگانه کاشته شده و گلدان‌ها به گلخانه منتقل شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از دو برگ بالایی دانهال‌ها و به روش دویل و دویل (Doyle and Doyle, 1989) با کمی تغییر انجام شد. برای هر توده محلی نمونه برگی حداقل از ۵ گیاه تهیه شد و استخراج DNA از این مخلوط صورت گرفت (لوپز- سز و همکاران، ۲۰۰۲). به این منظور پس از پودر کردن نمونه‌ها در حضور ازت مایع، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (100mM Tris-Hcl pH 8.0، EDTA 20mM pH 8.0، Nacl 1.4M، 2٪ W/V PVP، 0.5٪ V/V β- ercaptaethanol، 1.2W/V CTAB) به آن‌ها اضافه شده و بعد از مخلوط کردن به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب‌گرم ۶۵°C نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از مخلوط کلروفورم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) و ۶ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور انجام گردید و ضمن برداشت مایع روئی DNA موجود در هر نمونه با استات آمونیوم ۵/۷ مولار به میزان ۰/۱ حجم مایع برداشت شده و سپس ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد رسوب داده‌شد و به مدت ۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. توده DNA پس از شستشو با الکل ۷۰ درصد برای خشک شدن به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و سپس در حجم مناسب بافر TE حل گردید و برای حذف RNA، ۱۰ میکرولیتر از محلول تی‌ای- اران‌آز به هر تیوب اضافه شد. غلظت DNA هر نمونه پس از سنجش کیفی و کمی با اسپکتروفتومتر، با آب مقطر استریل در حدود ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد.

تکثیر ریزماهواره‌ها

جفت آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش بر پایه مطالعات قبلی که توسط افراد مختلف انجام گرفته بود صورت پذیرفت. ۱۴ جفت از آغازگرها از کتابخانه ژنومی ملون انتخاب شد، سه جفت آغازگر CMBR56,CMBR23 و CMBR43 توسط *ریتسچلل* و همکاران (2004) از کتابخانه‌های غنی شده معرفی شده بودند و آغازگر CMAT35d نیز از بانک اطلاعاتی خربزه- طالبی به‌دست آمده بود و توسط *دانین- پولگ* (2001) معرفی شده بود. ساخت آغازگرها توسط شرکت آلمانی Tib Mol Bio صورت پذیرفت. مشخصات جفت آغازگرهای استفاده شده در جدول ۲ نشان داده شده است.

انجام واکنش PCR

واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر مطابق توصیه *کاتزیر و همکاران* (1996) و با کمی تغییرات انجام گرفت. مخلوط PCR حاوی ۳۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۰/۳۷ میکرومولار از هر کدام از آغازگرها، کلرور منیزیم ۲/۵ میلی-مولار، dNTPs ۱۵۰ میکرومولار، ۱ واحد تک دی ان آ پلیمراز و یک برابر غلظت بافر PCR بود، بعد از اضافه کردن مخلوط PCR محتویات هر لوله با ۱۵ میکرولیتر روغن معدنی پوشیده شد. کلیه مواد به استثنای آغازگر از شرکت سیناژن تهیه شده بودند. در ابتدای واکنش واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴°C و مدت ۳ دقیقه انجام گرفت، سپس ۳۵ چرخه PCR شامل ۹۴°C یک دقیقه، اتصال در دمای مناسب برای هر جفت آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در ۷۲°C به‌مدت یک دقیقه و در پایان چرخه‌ها بسط نهایی در ۷۲°C به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. دمای اتصال مناسب هر جفت آغازگر در جدول ۲ ذکر شده‌است.

بعد از اتمام PCR، ۵ میکرولیتر دای فرمامید شامل فرمامید ۸۰٪، ای دی تی آ ۱۰ میلی‌مولار، زایلن سیانول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برموفنول بلو ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر یک از لوله‌ها اضافه شد و لوله‌ها تا انجام الکتروفورز در یخچال ۴°C نگهداری شدند.

پنج میکرولیتر از مخلوط هر نمونه در یک چاهک ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد واسرشت حاوی ۷ مولار اوره بار گذاری شد. الکتروفورز در ۶۰ وات و ۱۵۰۰ ولت و به مدت ۵۰ دقیقه انجام گرفت. جهت نمایان کردن قطعات DNA در ژل، از رنگ آمیزی نیترات نقره *باسام و همکاران* (Bassam, et al. 1991) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری (نمره گذاری آلل‌ها و ارزیابی چند شکلی)

به‌منظور امتیاز دهی باندها از حروف الفبای انگلیسی استفاده شد به‌طوری که سبک‌ترین باند به عنوان اولین آلل با A مشخص شد و با افزایش اندازه باندها از حروف دیگر استفاده گردید. داده‌های مولکولی یک‌بار دیگر بر اساس حضور باند (یک) و عدم حضور باند (صفر) برای هر نشانگر حاصل شد. از نرم‌افزار PopGene Ver. 1.32 برای تجزیه و تحلیل پارامترهای مربوط به جمعیت مانند PIC، هموزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و رسم دندروگرام براساس ضریب نی استفاده شد (Nei and Li. 1979).

جدول ۲ : مشخصات آغازگرهای ریزماهواره استفاده شده در تحقیق
Table 2: Characteristics of the microsatellite loci used in this study

مکان ژنی Locus	موتیف Motif	تعداد آلل مشاهده شده Number of observed allele	محتوای اطلاعات چند شکلی Polymorphic information content	دمای اتصال (°C) Annealing temperature (°C)
CMGA127	$(GA)_{13}A(GA)_2$	–	–	–
CMGA128	$(GA)_{10}AA(GA)_2$	–	–	–
CMGA104	$(GA)_{14}AA(GA)_3$	–	–	–
CMGT108	$(GT)_9N_{65}(CT)_7$	2	0.4985	63
CMCTT144	$(CTT)_{10}CTAC(CTT)_4$	4	0.2485	50
CMCT44	$(CT)_{10}TGTT(CT)_3$	4	0.5266	60
CMACC146	$(ACC)_9$	5	0.5390	65
CMAT141	$(AT)7(GT)_6$	4	0.5856	61
CMCCA145	$(CCA)_5$	4	0.5000	63
CMAT35 d	$(TA)_3AA(TA)_2C(AT)_7$	–	–	–
CMGA15	$(GA)_7$	2	0.5000	62
CMTC168	$(TC)_{14}$	6	0.6547	62
CMGA172	$(GA)_9$	3	0.5000	63
CMTC160a+b	$(TC)_2(TCC)_2(CT)_8N_{122}(TC)_8$	6	0.5401	60
CMCT134b	$(TA)_2(CT)_8(AT)_7$	10	0.7716	53
CMBR23	$(TC)_{26}(AT)_4$	–	–	–
CMBR56	$(CT)_3N_2(CT)_{12}(CCCT)_2N_8(CT)_3(AT)_3N_3(TC)_2$	–	–	–
CMBR43	$(CT)_{20}$	9	0.6393	60

از نرم‌افزار NT SYS-pc 2.02 نیز برای رسم دندروگرام بر اساس ضریب جاکارد و محاسبه ضریب کوفنتیک استفاده گردید. دندروگرام حاصل بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد ترسیم شد. تجزیه به مولفه‌های اصلی به‌منظور بررسی توزیع مناسب ژنومی نشانگرهای مولکولی استفاده شده انجام شد.

محتوای اطلاعات چندشکلی و یا شاخص تنوع (PIC) برای هر جفت آغازگر به‌وسیله فرمول پیشنهادی *بوتستین و همکاران* ($PIC = 1 - \sum Pi^2$) (Botstein et al. 1980) محاسبه شد. در این فرمول pi فراوانی آلل iام در یک مکان ریزماهواره است که برای n آلل بسط داده می‌شود.

چند شکلی قطعات ریزماهواره در مکان ژنی CMACC146 در شکل ۱ نشان داده شده‌است.

نتایج و بحث

از ۱۸ جفت آغازگر مورد استفاده ۱۲ جفت قادر به تکثیر مکان‌های ژنی ریزماهواره شدند. شش جفت آغازگر نیز احتمالا به‌خاطر متفاوت بودن توالی‌های احاطه‌کننده جایگاه‌ها در یک یا دو جایگاه اتصال آغازگر، اشکال در طراحی، اشکال در ساخت، نامناسب بودن بافر و مواد مورد استفاده و

یا تفاوت در ارقام و توده‌ها قادر به تکثیر مکان ژنی مورد نظر نبودند (جدول ۲). در ۴۳ توده مورد مطالعه در این پژوهش ۵۹ باند با استفاده از ۱۲ جفت آغازگر تکثیر شد.

۳۶ مورد از توده‌های مورد بررسی با همه مکان‌های ژنی دو باند تولید کردند و هفت توده نیز در برخی از مکان-های ژنی ۴-۳ باند نمایان ساختند و احتمال دارد که این توده‌ها پلی پلوئید باشند. با این‌حال بررسی‌های سیتولوژیک به‌منظور تایید این نتیجه ضروری به‌نظر می‌رسد.

تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر مکان ژنی ریزماهواره بین ۱۰-۲ آلل متغیر بود (جدول ۲). میانگین تعداد آلل‌ها برای هر مکان ژنی ۴/۹۱ بود. در بررسی‌های انجام شده توسط *مونفورته و همکاران* (2003) و رضایی (۱۳۸۴) میانگین آللی مشاهده شده بیشتر از بررسی حاضر بود، زیرا در این بررسی‌ها ارقام و توده‌هایی از گروه‌های مختلف طالبی و خربزه مورد استفاده و بررسی قرار گرفت. با این حال میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده به ازای هر مکان ژنی نسبت به بسیاری از مطالعات خارجی بیشتر است (کاتزیر و همکاران، ۱۹۹۶ دانین پولگ و همکاران، ۲۰۰۱ لوپز سز و همکاران، ۲۰۰۲). این مساله یا به دلیل بیشتر بودن تعداد توده‌های مورد بررسی در این پژوهش و یا به دلیل تنوع بیشتر توده‌های ایرانی نسبت به ارقام خارجی می-باشد.

از ۱۲ مکان ژنی تکثیر شده چهار مکان ژنی CMCT134b، CMTC168، CMBR43 و CMAT14محتوای اطلاعات چند شکلی بالایی نشان دادند (جدول ۲). بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار نیز به‌ترتیب مربوط به همین مکان‌های ژنی بود، بنابراین از این مکان‌های ژنی می-توان به‌خوبی برای آنالیز مجموعه ژرم‌پلاسم‌های دیگر خربزه و طالبی بهره جست.

میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای تمام توده‌ها در بین مکان‌های ژنی مورد بررسی ۰/۸۷۹۶بود که این مقدار نسبت به میانگین‌های مشاهده شده در بررسی *لوپز و همکاران* (2002)، *ریتسچل و همکاران* (2004) و *دانین-پولگ و همکاران* (2001) بسیار بیشتر است. ملون‌های ایرانی در واقع حاصل اصلاح نژاد و نتیجه تلاقی‌های کنترل شده بین ارقام محدودی نبوده و عموماً حاصل گرده افشانی آزاد هستند که همین به افزایش هترویگوسیتی در آن‌ها منجر شده است. هم‌چنین توده‌ها به‌صورت منفرد کاشته نشده و کشت چندین توده مختلف در کنار هم زمینه را برای دگرگرده‌افشانی و افزایش هتروزیگوسیتی فراهم می‌آورد. در بررسی بهبهانی روی ۳۶ ژنوتیپ خربزه ایرانی با استفاده از ۱۶ مکان ژنی ریزماهواره میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای تمام ژنوتیپ‌ها در بین مکان‌های ژنی مورد بررسی ۰/۵۰۰۳ بود، بیشتر بودن میانگین آللی و نیز میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در طالبی‌های ایرانی نسبت به خربزه‌ها نشان دهنده تنوع بیشتر ارقام و توده‌های طالبی ایرانی نسبت به خربزه‌ها می‌باشد این امر شاید به‌دلیل انجام کارهای اصلاحی و فشار بیشتر گزینش روی خربزه‌های ایرانی باشد. خربزه‌های ایرانی عمدتاً به‌صورت رقم بوده و مجزا کاشته می‌شوند، هم‌چنین برخی ارقام خربزه دارای گل‌های کامل هستند (Robinson and Decker-Wallters, 1997)، که باعث افزایش خودگرده‌افشانی و به‌تبع آن کاهش هتروزیگوسیتی آن‌ها می‌شود. کوهپایگانی (۱۳۸۳) نیز در بررسی تنوع مورفولوژی انواع ملون‌های ایرانی اظهار داشتند که طالبی‌های ایرانی از خربزه‌ها تنوع بیشتری دارند زیرا انواع خربزه‌ها در یک خوشه و سایر ملون‌ها در چند خوشه متفاوت قرار گرفتند.

فاصله ژنتیکی توده‌ها به روش *نی* (Nei, 1972) محاسبه شده و بین صفر تا ۰/۷۶ متفاوت بود. بیشترین فاصله مربوط به توده‌های محلی داراب و آمریکایی بود.

درگروه‌بندی توده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS بر اساس الگوریتم دورترین همسایه و ضریب تشابه جاکارد (شکل ۱) خط قطع از حدود ۷۱٪ تشابه رسم شد که نتیجه آن ایجاد ۱۱ گروه بود. گروه اول شامل توده‌های محلی مشکات، اصفهان (کد ۳۴)، شیراز (کد ۲۷)، اشنویه و کد ۶۳ می‌باشد. همه توده‌های این گروه بر روی ژل اکریل آمید حداقل دارای سه باند واضح و مشخص بودند و احتمالا پلی پلوئید می‌باشند. حدود ۵۰ درصد از توده‌ها (۲۱ توده) در گروه ۲ جای گرفتند به‌منظور تجزیه خوشه‌ای این گروه به ۱۱ زیر گروه تقسیم شد. حالت زنجیره‌ای موجود در دندروگرام تنوع ژنتیکی در این گروه نشانه نزدیکی و قرابت ژنوتیپ‌ها با یکدیگر است به‌طوری که به دسته‌های کاملاً مجزا قابل تفکیک نیستند. در بررسی فیضیان (۱۳۸۳) بر روی گروه‌های مختلف ملون با استفاده از نشانگرهای رپید و هم‌چنین در بررسی رضایی (۱۳۸۴) بر روی ارقام و توده‌هایی از گروه‌های مختلف با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره تجزیه خوشه‌ای نتوانست گروه‌های مختلف را از یکدیگر متمایز کند که بیانگر نزدیک بودن ژنوم این گروه‌ها است. در این بررسی توده‌های موجود در زیرگروه‌های A، B، C، D و F دارای فاصله ژنتیکی صفر بودند، لذا احتمال دارد

که این‌ها توده‌هایی یکسان باشند که به‌دلیل جابه‌جایی بین مناطق مختلف کشور نام‌های متفاوت گرفته‌اند و یا این‌که مکان‌های ژنی مورد استفاده در این بررسی قادر به تشخیص تفاوت‌های اندک موجود بین آن‌ها نبوده‌اند. چهار توده محلی قلعه، ساوه، کد ۶۴ و فلسطینی به‌صورت منفرد و به‌ترتیب در زیرگروه‌های E، G، H و I قرار گرفتند. زیرگروه J شامل توده-های محلی حاجی آباد اصفهان و مشهد (میزان تشابه ۰/۸۷) و زیرگروه K شامل گرمک کرمانشاه و آمریکایی (میزان تشابه ۰/۸۴) می‌باشد. دو زیر گروه J و K در میزان تشابه ۰/۷۷ از هم قابل تفکیک هستند.

از ۹ توده مربوط به استان اصفهان ۵ توده در گروه ۲ قرار گرفتند که حاکی از قرابت زیاد این توده‌ها می‌باشد.

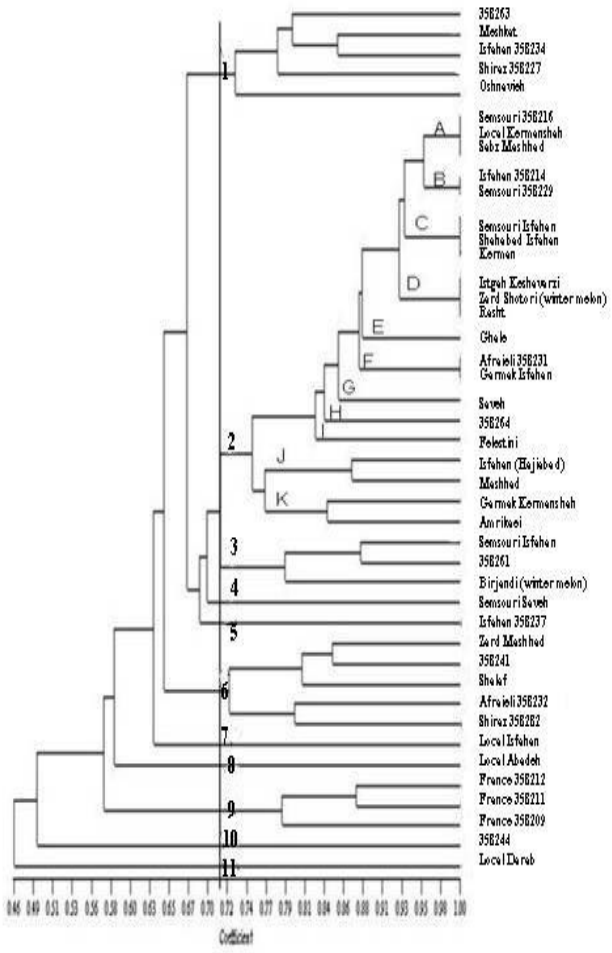
قرارگیری توده‌های محلی طالبی سمسوری ساوه، طالبی اصفهان، محلی اصفهان، محلی آباده، کد ۴۴ و محلی داراب به‌صورت منفرد و در گروه‌های جداگانه شاید حاکی از این باشد که برخلاف سایر توده‌ها، آن‌ها از توده‌های محلی متمایز بوده و سال‌ها در این مناطق به‌طور جداگانه کشت و محافظت شده‌اند.

در این دندروگرام ارقام خارجی فرانسه در یک گروه و در کنار هم جای گرفتند عدم قرارگیری توده‌ها ایرانی در این گروه بار دیگر بر فاصله بیشتر ارقام و توده‌های ایرانی و خارجی تاکید می‌کند.

از دیگر نکات قابل توجه در این نمودار تفکیک توده-های احتمالاً پلی‌پلوئید از بقیه است به‌طوری‌که هفت توده موجود در گروه‌های ۱، ۸ و ۱۰ بیش از سه باند واضح و مشخص را در برخی از مکان‌های ژنی مورد بررسی نشان دادند.

در ارزیابی توده‌ها مورد مطالعه، سطح هتروزیگوسیتی توده‌های طالبی بومی ایران نسبت به ارقام خارجی مورد بررسی بالاتر بود که نشان می‌دهد طالبی‌های ایرانی به‌دلیل این‌که در برنامه‌های اصلاح نباتات قرار نگرفته‌اند، زمینه ژنتیکی متنوع‌تری دارند و می‌توان از آن‌ها برای انتخاب ژنوتیپ‌های متنوع به منظور تولید ارقام جدید استفاده کرد.

این بررسی به‌خوبی نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهواره ابزار مناسبی برای ارزیابی تنوع و روابط ژنتیکی جمعیت‌ها می‌باشند. هرچند که ارزیابی دقیق تنوع ژنتیکی با استفاده از تعداد زیاد نشانگرها همراه با صفات مورفولوژیک تحقق می‌یابد، با وجود این نتایج نشان دادند که مجموعه نشانگرهای استفاده شده در این پژوهش برای اهدافی نظیر تمایز، شناسایی، ارزیابی تنوع و روابط ژنتیکی جمعیت‌های طالبی و خربزه سودمند بوده و هم‌چنین می‌توانند برای مدیریت ذخایر توارثی از طریق شناسایی نمونه‌های تکراری و هم‌نام کارآمد باشند. از آن‌جائی‌که تلاقی ارقام و توده‌هایی که از نظر مولکولی دورتر می‌باشند می‌تواند ارقامی با تنوع بیشتر را ایجاد نماید، نتایج این پژوهش می‌تواند در جهت برنامه-ریزی‌های اصلاحی به‌منظور ایجاد ارقام متنوع‌تر برای صفات مختلف مد نظر قرار گیرد. هم‌چنین با توجه به وجود تعداد زیادی توده محلی طالبی در بانک ژن، لازم است بررسی‌های دقیق‌تر ملکولی برای اطلاع از ذخایر ژنتیکی موجود در بانک ژن به عمل آید. این بررسی ها می‌تواند به منظور حذف نمونه‌های تکراری مفید واقع شود. بهتر است برای مشخص شدن گروه‌ها، نشانگرهای دیگر به همراه خصوصیات مورفولوژیک و رابطه خویشاوندی آن‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گیرند.



شکل ۱ : نمودار تنوع ژنتیکی بر حسب ضریب جاکارد و روش UPGMA

Figure 1: Dendrogram of genetic diversity among cultivars and populations based on Jackard Similarity Coefficient and UPGMA method

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۵۱-۵۲ متن انگلیسی مراجعه شود.

Genetic Diversity Among Iranian Cantaloupe Landraces (*Cucumis melo* L.) Using Microsatellite Markers

Moaiedi nejad[1], A., Ershadi[2]*, A., Abas kohpaigani[3], J. and Dashti[2], F.

Abstract

The genetic diversity among 43 accessions of melon (*C.melo* L.), 41 from Cantaloupensis group alongside two from Indorus group, was assessed by variation at simple sequence repeats marker bands using 18 pair primers. The extracted genomic DNA was amplified with 12 pair primers and PCR products were separated on a DNA sequencing gels. A total of 98 alleles were identified with an average of 4.90 alleles per primer combination. Genetic distances among the accessions ranged from 0.0 for the most similar to 0.76 for the most-diverged ones. The mean GD (Nei's coefficient) among accessions was 0.219. The average of polymorphic information contents (PIC) for the 12 melon SSR markers was 0.542. CMCT134b, CMTC168, CMBR43 and CMAT141 loci had respectively the highest PICs, which could be used for further analysis. Genetic relationships among accessions were represented by a dendrogram based on similarity coefficient matrix with UPGMA method. Cluster analysis classified the accessions into 11 major groups. Cluster analysis indicated wide range of diversity across the Iranian and foreign accessions. The most distance was detected between Mahali e Darab and Amrikaie (76%). In general, poor relation was found between geographical and genetic diversity, whereas some relations was observed in cluster 2. The tetraploid accessions were mainly placed in the group 1. Principle component analysis had a very good co-ordination with dendrogram of genetic diversity. These results suggest that the SSR markers are valuable tools for identification and diversity analysis in cantaloupensis.

Keywords: Melon, Molecular markers, Genetic diversity, Microsatellites, Primer

References

Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P. T. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry. 196: 80-83.

Behbahanei, M. 2005. Genetic diversity among Iranian melons (*Cucumis melo* L.) via SSR markers. M.Sc. thesis, Bu-Ali Sina University, Iran.

Botstein, D., White, R. L. Skolnick M. and Davis, R. W. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Gentics. 32: 314-331.

Cipriani, G., Lot, G. Huang, W. G. Marrazzo, M. T. Peterlunger, E. and Testolin, R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeates in peach (*Prunus persica*) : Isolation , characterization and cross-species amplification in Prunus. Theoretical and Applted Gentics. 99:65-72.

Danin-Poleg, Y., Reis, N., Tzuri, G. and Katzir, N. 2001. Development and characterization of microsatellite markers in Cucumis. Theoretical and Applted Gentics. 102:61–72.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phtichem. Bull. 19 : 11-15.

Feizian, E. 2004. Germplasm Collection of Some of the *Cucumis melo* Landraces in the north and center of Iran and Study on Their Genetic Diversity by Morphological and Molecular (RAPD) Markers. M.Sc thesis, Tarbiat Modarres University, Iran.

Garcia, E., Jamilena, M., Alvarez, J. I., Arnedo, T., Oliver, J. L. and Lozano, R. 1998. Genetic relationships among melon breeding lines revealed by RAPD markers and agronomic traits. Theoretical and Applted Gentics. 96: 878-885.

Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Tzuri, G., Karchi, Z., Lavi, U., Cregan, P. B. 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several cucurbitacean species. Theoretical and Applted Gentics. 93: 1282–1290.

Kohpayegani, J. A. 2004. Study of diversity of some Iranian Melons and effects of seed production on genetic erosion . Ph.D. thesis, Tehran University, Iran.

Lanaud, C. and Lebot, V. 1997. Molecular techniques for increased use of genetic resources. In: Ayad W. G., Hodgkin T., Jaradat A. and Rao V. R. (Eds), Molecular Genetic Techniques for Plant Genetic Resources". International Plant Genetic Resources Institue, Rome, pp. 92-97.

Lavi, U., Cregan, P. Schaap, T., and Hillel, J. 1994. Application of DNA markers for identification and breeding of perennial fruit crops. Plant Breeding. Rev. 12: 195-226.

Lefebvre, V. and Chevre A. M. 1995. Tools for making plant disease and pest resistance genes. Agron. 15: 3-19.

1. Former M.Sc student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan

2. Assistant professors, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan

3. Assistant professor, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj

∗: Corresponding author

Lopez-Sese, A. I., Staub, J. E., Katzir, N. and Gomez-Guillamon, M. L. 2002. Estimation of between and within accession variation in selected Spanish melon germplasm using RAPD and SSR markers to assess strategies for large collection evaluation. Euphytica 127: 41-51.

Mliki, A., Staub, J. E., Zhangyong, S. and Ghorbel, A. 2001. Geneic diversity in melon (*Cucumis melo* L.) :an evaluation of African germplasm Genet. Res. Crop. Evol. 48: 587-597.

Monforte, A. J., Garcia-Mas, J. and Arius, P. 2003. Genetic variability in melon based on microsatellite variation. Plant Breed. 122: 153- 157.

Nei, M. and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5269-5273.

Neuhausen, S. L. 1992. Evaluation of restriction fragment length polymorphism in *Cucumis melo*. Theor. Appl. Genet. 83: 379-384.

Rezaei, L. 2006. Genetic diversity among Iranian melons (*Cucumis melo* L.) via SSR molecular markers. M.Sc. thesis, Bu-Ali Sina University, Iran.

Ritschel, P. S., de Lima Lins, T. C., Tristan, R. L., Buso, G. S. C., Buso, A. and Ferreira, M. E. 2004. Development of microsatellite markers from an enriched genomic

library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). BMC Plant Biologycal. 4:1-14.

Robinson, R. W. and Decker-Wallters, D. S. 1997. Cucurbits. CABi. Pp 662

Staub, J. E., Danin-Poleg, Y., Fazio, G., Horejsi, T., Reis, N., Katzir, N. 2000. Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. Euphytica 115: 225-241.

Stepansky, A., Kovalski, I. and Perl-Treves, R. 1999. Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. Plant Systematics and Evolution. 217: 313-332.

Yeh, F. C., Young, R. C. Timothy, B. Boyle, T. B. Ye, Z. H. and Mao, J. X. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Mol. Biol. Biotech. Cent. University of Alberta, Canada.

Zamiad, H. 2004. Germplasm Collection of Some of the *Cucumis melo* Landraces in the Khorasan Province,Iran and Study on Their Genetic Diversity by Morphological and Molecular (RAPD) Markers. M.Sc. thesis, Tarbiat Modarres University, Iran.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 1-8= ۱-۸).