بررسی تنوع ژنتیکی توده های بومی خربزه ایرانی(*Cucumis melo* L.) با استفاده از نشانگرهای ملکولی بین ریزماهواره ای(ISSR)

صدیقه فابریکی اورنگ[1]، مسعود شمس بخش *[2]، مختار جلالی جواران[3] و جعفر احمدی[4]

[1] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

[2] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری شناسی گیاهی

[3] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

[4] قزوین، دانشگاه بین المللی امام خمینی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: 87/6/18 تاریخ پذیرش: 87/12/17

چکیده

با توجه به قدمت کشت و کار ارقام متنوعی از خربزه و طالبی در ایران، بنظر می رسد ذخایر ارزشمند و غنی ژنتیکی از این گیاه در ایران وجود داشته باشد. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی 54 توده خربزه و طالبی جمع آوری شده از یازده استان کشور شامل استانهای اصفهان، خراسان جنوبی، خراسان شمالی، خراسان رضوی، یزد، کرمان، کرمانشاه، ایلام، زنجان، اردبیل و همدان با استفاده از نشانگرهای ISSR بررسی گردید. در مجموع 11 آغازگر که دارای توالیهای ساده تکراری (ریزماهواره ای) بودند برای تکثیر قطعاتی از DNAی ژنومی گیاه استفاده شد. در این بررسی 84 مکان ژنی امتیاز بندی شدند که از این تعداد 63 مکان چند شکلی نشان دادند. برای ارزیابی شباهت ژنتیکی میان توده ها از تحلیل خوشه ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد با روش UPGMA استفاده گردید. میانگین فاصله ژنتیکی میان توده ها (با استفاده از ضریب تشابه جاکارد) 0/74 و میانگین محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) 0/84 بود. آغازگر $(AC)_8G$ بالاترین مقدار PIC (0/92) را دارا بود. بررسی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای تنوع بالایی را در بین ژنوتیپهای مورد مطالعه نشان داد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ های بیرجند و تیل زرد و کمترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپهای گرگاب و یزدی بود. نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگرهای ISSR بطور مؤثری می توانند برای مطالعه تنوع ژنتیکی توده های خربزه و طالبی استفاده شوند و از میان آغازگرهای استفاده شده، آغازگر$(AC)_8G$ مناسب ترین آغازگر برای مطالعات بعدی تشخیص داده شد.

واژه های کلیدی: خربزه، طالبی، تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: 09123201892، پست الکترونیک: shamsbakhsh@modares.ac.ir

مقدمه

گونه خربزه و طالبی (*Cucumis melo* L.) از مهمترین گیاهان جالیزی متعلق به تیره کدوئیان (Cucurbitaceae) می باشند (22). کشت گیاهان جالیزی از جمله خربزه و طالبی از زمانهای قدیم در ایران متداول بوده است و در فصل گرم هر سال مقادیر زیادی از آن کشت و مورد استفاده قرار می گیرد (1). در ایران کشت خربزه در مناطق خشک و حاشیه کویری مثل ورامین، ایوانکی، گرمسار، اصفهان و خراسان از تولید کمی و کیفی بهتری برخوردار است، ولی کشت آن به این مناطق محدود نشده و در سایر نقاط از جمله ساوه، قزوین، گیلان، آذربایجان و همدان نیز گسترش یافته است (1). بدلیل گسترش سطح زیر کشت ارقام اصلاح شده غیر بومی، روند فرسایش ژنتیکی ارقام

Archive of SID

www.SID.ir

بومی افزایش یافته است. این امر می تواند میراث چندین هزار ساله را در معرض خطر نابودی قرار دهد. مطالعه تنوع ژنتیکی نه تنها برای سازماندهی و حفاظت مواد گیاهی بلکه برای پدیده هتروزیس و تولید بذور هیبرید نیز اهمیت دارد (15). از نشانگرهای ISSR به عنوان وسیله ای در شناسایی ژنوتیپها و همچنین مطالعه ساختار جمعیتی گونه های گیاهی مانند ذرت، سیب زمینی، پرتغال، گندم و ... استفاده شده است (8، 10، 11، 14، 17، 19 و 21). استپانسکی و همکاران (1999) تنوع ژنتیکی 54 توده خربزه را که از 23 کشور از سراسر دنیا جمع آوری شده بود را با استفاده از روشهای ISSR و RAPD ارزیابی نمودند. این روشها چند شکلی بالایی را در DNA ژنوتیپهای خربزه نشان دادند. آنها نشان دادند که فیلوژنی ملکولی با طبقه‌بندی کدوئیان به دو زیر گونه منطبق است و با تقسیم‌بندی این گونه به ارقام زراعی تناقض نداشت (23). لیو و همکاران (2002) تنوع ژنتیکی 37 توده ژرم پلاسم خربزه- طالبی را با استفاده از دو نشانگر RAPD و ISSR بررسی نمودند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که هر دو نشانگر یاد شده می‌تواند برای بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه استفاده شود. از طرف دیگر تحلیل مبتنی بر نتایج به دست آمده از هر دو نشانگر همبستگی مثبت و معنی‌داری را نشان دادند (16). پاریس و همکاران (2003) نشانگرهای ملکولی AFLP و ISSR را برای بررسی ارتباط ژنتیکی دامنه وسیعی از خزانه ژنتیکی *Cucurbita pepo* L. استفاده نمودند. نتایج بدست آمده از آن نشانگرها با همدیگر همبستگی بسیار بالایی نشان دادند (18). به رغم وجود ذخایر ژنتیکی بسیار عظیم خربزه در ایران و وجود بیش از 700 جمعیت خربزه در بانک ژن ملی گیاهی ایران، تحقیقات کافی در این زمینه صورت نگرفته است. در مطالعه ای که 100 نمونه از خربزه و طالبی های جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران از لحاظ صفات مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفته، نتایج به دست آمده نشان داده است که تنوع طالبی بیشتر از خربزه است (6).

بررسی تنوع ژنتیکی 46 توده *C. melo* از استان خراسان با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و ملکولی RAPD نشان داده است که میزان چند شکلی حدود 20 درصد است، همچنین میزان همبستگی نتایج نشانگرهای RAPD و مورفولوژیکی 50 درصد می باشد (4). همچنین بررسی تنوع ژنتیکی 38 توده *C. melo* جمع آوری شده از استانهای شمالی (گیلان، مازندران و گرگان)و مرکزی (تهران، مرکزی، قزوین، سمنان، اصفهان و یزد) ایران با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و RAPD نشان داده است که نشانگر ملکولی به کار گرفته شده نتوانست گروههای مختلف را از یکدیگر تفکیک نماید (5). مطالعه تنوع ژنتیکی 22 توده بومی گونه *C. melo* با استفاده از نشانگرهای ملکولی RAPD و نشانگرهای مورفولوژیکی نشان داده است که ژنوتیپهای مورد مطالعه از تنوع بالایی برخوردارند (3). بررسی روابط خویشاوندی 43 رقم طالبی ایرانی با استفاده از نشانگرهای ملکولی SSR نشان داده است که نشانگرهای ریزماهواره روش مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در میان ژنوتیپهای طالبی است (7). همچنین بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین برخی از جمعیتهای مهم و تجاری خربزه و طالبی ایرانی با استفاده از نشانگر ملکولی AFLP نشان داده که این نشانگر به خوبی می تواند ژنوتیپهای خربزه را از هم تفکیک نماید (2). از آنجائیکه تا کنون تنوع ژنتیکی خربزه و طالبی های ایرانی در سطح وسیع و مناطق مهم کشت و کار این محصول مطالعه نشده است و همچنین نشانگر ISSR در مطالعه تنوع ژنتیکی آنها به کار گرفته نشده است، در این پژوهش تنوع ژنتیکی توده های بومی خربزه و طالبی های ایرانی، جمع آوری شده از 11 استان مهم کشت این محصول با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR بررسی شد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روشها

مواد گیاهی: بذرهای 54 ژنوتیپ از توده های مختلف خربزه و طالبی جمع آوری شده از مناطق مختلف کشت این محصول در استانهای اصفهان، خراسان جنوبی، خراسان شمالی، خراسان رضوی، یزد، کرمان، کرمانشاه، ایلام، زنجان، اردبیل و همدان در این پژوهش بررسی شد. نام محلی و محل جمع آوری ژنوتیپهای بررسی شده در این مطالعه در جدول شماره یک آمده است.

جدول 1- نام محلی، محل جمع آوری و شماره نمونه های خربزه و طالبی ایرانی مورد استفاده در این مطالعه

نام محلی	محل جمع آوری	شماره نمونه	نام محلی	محل جمع آوری	شماره نمونه
سبز خمینی شهر	اصفهان	M1	خاتونی 2	آبروان	M28
بیرجند	بیرجند	M2	خاقانی	تربت جام	M29
مگسی	نیشابور	M3	افغانی	تایباد	M30
یزدی	یزد	M4	چروک زرد	جیم آباد	M31
خاکستری خط دار	-	M5	مجدی	یزد	M32
شادگان	خوزستان	M6	اوشینی	تربت جام	M33
سیرجان	کرمان	M7	لاکی 3	کوه سرخ	M34
ایوانکی	ایوانکی	M8	رباطی	ایوانکی	M35
لاکی 1	کوه سرخ	M9	زرد صادراتی	جیم آباد	M36
لطیفه گرگاب	اصفهان	M10	خربزه-طالبی	مشهد	M37
زرد 25	خاف	M11	سمسوری	مشهد	M38
خاتونی	آبروان	M12	تو سرخ	کرمان	M39
یزدی قاچ دار	یزد	M13	زرد مشبک درشت	مشهد	M40
گرگاب	اصفهان	M14	زرد خارجی	-	M41
آناناسی شیرین	--	M15	یزدی تو قرمز	یزد	M42
یزدی بزرگ	یزد	M16	سوسکی زرد	ایوانکی	M43
دو رگه خربزه- گرمک	حبیب آباد اصفهان	M17	نهاوند	نهاوند	M44
باخرمان سرخس	مشهد	M18	زلف عروس	-	M45
میر پنجی	نهاوند	M19	صوغان	کرمان	M46
لاکی زرد	تایباد	M 20	سفید	خاف	M47
زنجان	زنجان	M21	کاشفی	تربت حیدریه	M48
زرد معطر	مشهد	M22	خارجی مشهد	مشهد	M49
تیل زرد	مشهد	M23	پوست زرد سرو فیروزان	اصفهان	M50
کرمانی	کرمان	M24	خربزه طالبی سرخس	کرمان	M51
گرگه دیم	ایلام	M25	ابرامه گرگاب	اصفهان	M52
لاکی 2	کوه سرخ	M26	علی گنگه	اصفهان	M53
زرد طلایی	کوه سرخ	M27	هانی دو	اردبیل	M54

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 2- شماره، توالی و دمای اتصال آغازگرها در واکنش زنجیره ای پلیمراز استفاده شده در این مطالعه

شماره آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال(°C)
P_1	TCTCTCTCTCTCTCC	52/8
P_2	AGAGAGAGAGAGAGT	50/8
P_3	GGGTGGGGTGGGGTG	58/8
P_4	ATGATGATGATGATGATG	46/9
P_5	ACACACACACACACYC	54/8
P_6	GAGAGAGAGAGAGAGA* YG	54/8
P_7	TGTGTGTGTGTGTGG	52.8
P_8	ACACACACACACACG	52/8
P_9	ACACACACACACACT	50/4
P_{10}	CACACACACACACA	48
P_{11}	ATATATATATATATAT	32

Y= Thymidine or Cytidine

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA ژنومی هر توده ژنوتیپی با استفاده از روش تغییر یافته دلاپورتا و همکاران (1983) انجام گرفت(9). به این منظور برگهای جوان بوته های سه الی چهار هفته ای پنج الی هفت گیاه مخلوط شدند. غلظت و کیفیت DNA به دست آمده، توسط دستگاه بیوفتومتر و ژل آگارز تعیین گردید و تا زمان استفاده در دمای 20- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

آغازگرها: در این پژوهش از یازده آغازگر (ساخته شده توسط شرکت هلندی Isogen Life Science) براساس مطالعات استپانسکی و همکاران (1999) استفاده شد(23). از میان آغازگرهای استفاده شده، هشت آغازگر برای آزمایشهای بعدی انتخاب شدند. سه آغازگر دیگر باندی تولید نکردند و یا باندهای ضعیف و نا مشخص تولید کردند. مشخصات آغازگرها در جدول شماره 2 آمده است.

واکنش زنجیره ای پلیمراز: تکثیر قطعات DNA در یک واکنش با حجم نهایی 25 میکرولیتر حاوی 2/5 میکرولیتر بافر PCR با ده برابر غلظت (شرکت سیناژن، ایران)، 0/2 میلی مولار از هر نوکلئوتید (dNTPs)، 1/6 میلی مولار از کلرید منیزیم، یک میکرومولار از آغازگرها، 2/5 واحد آنزیم *Taq* پلیمراز (شرکت سیناژن) و DNA رقیق شده با غلظت 15 نانوگرم انجام گرفت. بمنظور بررسی تکرار پذیری باندها، هر واکنش PCR سه مرتبه تکرار شد. برای تکثیر قطعات DNA از دستگاه حرارتی مدل Mastercycler ep Gradiant (ساخت شرکت اپندروف آلمان) استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز با واسرشت سازی اولیه DNA ژنومی در دمای 92 درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه آغاز و با 45 چرخه شامل دمای 92 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه برای واسرشت سازی، اتصال آغازگرها به رشته الگو به مدت 70 ثانیه (دمای اتصال آغازگر ها از52/8-46/9 درجه سانتی گراد متناسب با آغازگر متغیر بود که در جدول دو به تفکیک آورده شده است)، گسترش رشته جدید به مدت دو دقیقه در دمای 72 درجه سانتی گراد و گسترش نهایی در دمای72 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه دنبال شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 3- درصد چند شکلی، تعداد مکان های تکثیر شده چند شکل، محتوای اطلاعات چند شکل و شاخص نشانگری در مطالعه تنوع ژنتیکی 54 توده خربزه و طالبی ایرانی

کد آغازگر	تعداد مکان های تکثیر شده	تعداد مکان های چند شکل	در صد چند شکلی	PIC	MI
P_1	11	8	0/73	0/85	5/19
p_2	11	9	0/82	0/88	5/53
P_3	9	6	0/67	0/83	4/32
P_4	8	7	0/87	0/81	3/71
P_5	10	6	0/6	0/81	3/99
P_6	12	8	0/67	0/86	4/47
P_8	14	14	1	0/92	7/96
P_9	9	5	0/55	0/74	2/72
جمع	84	63	0/74	0/84	3/74

MI: شاخص نشانگری

PIC: محتوای اطلاعات چند شکل

محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز در ژل آگارز یک و نیم درصد و بافرTBE (90 میلی مولار تریس، 90 میلی مولار اسید بوریک و دو میلی مولار EDTA) در ولتاژ ثابت 80 ولت به مدت سه ساعت الکتروفورز شد. به منظور بر آورد جرم ملکولی قطعات DNA تکثیر شده از نشانگر با جرم ملکولی 100 الی 3000 جفت باز (GeneRuler^{TM}, 100 bp DNA Ladder, Plus Fermentase) استفاده شد. رنگ آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید به مدت نیم ساعت در دمای اتاق انجام و پس از شستشوی ژل از آن عکس برداری شد.

تحلیل داده ها: قطعات DNA تکثیر شده بر اساس همردیفی باندها و به صورت صفر(عدم حضور باند) و یک (حضور باند) امتیاز بندی و از ضریب تشابه جاکارد (13) برای محاسبه تشابه بین هر یک از زوجهای ژنوتیپی استفاده گردید. میزان فاصله ژنتیکی ژنوتیپها با استفاده از روش Unweigthed Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) و در نرم افزار (NTSYS pc.2.02) محاسبه و ارتباط ژنوتیپها با استفاده از دندروگرام نشان داده شد. محتوای اطلاعات چند شکلی از طریق فرمول $PIC = 1 - \sum Pi^2$ (12) و شاخص نشانگری برای هر آغازگر با استفاده از رابطه MI = PIC × E محاسبه گردید (20).

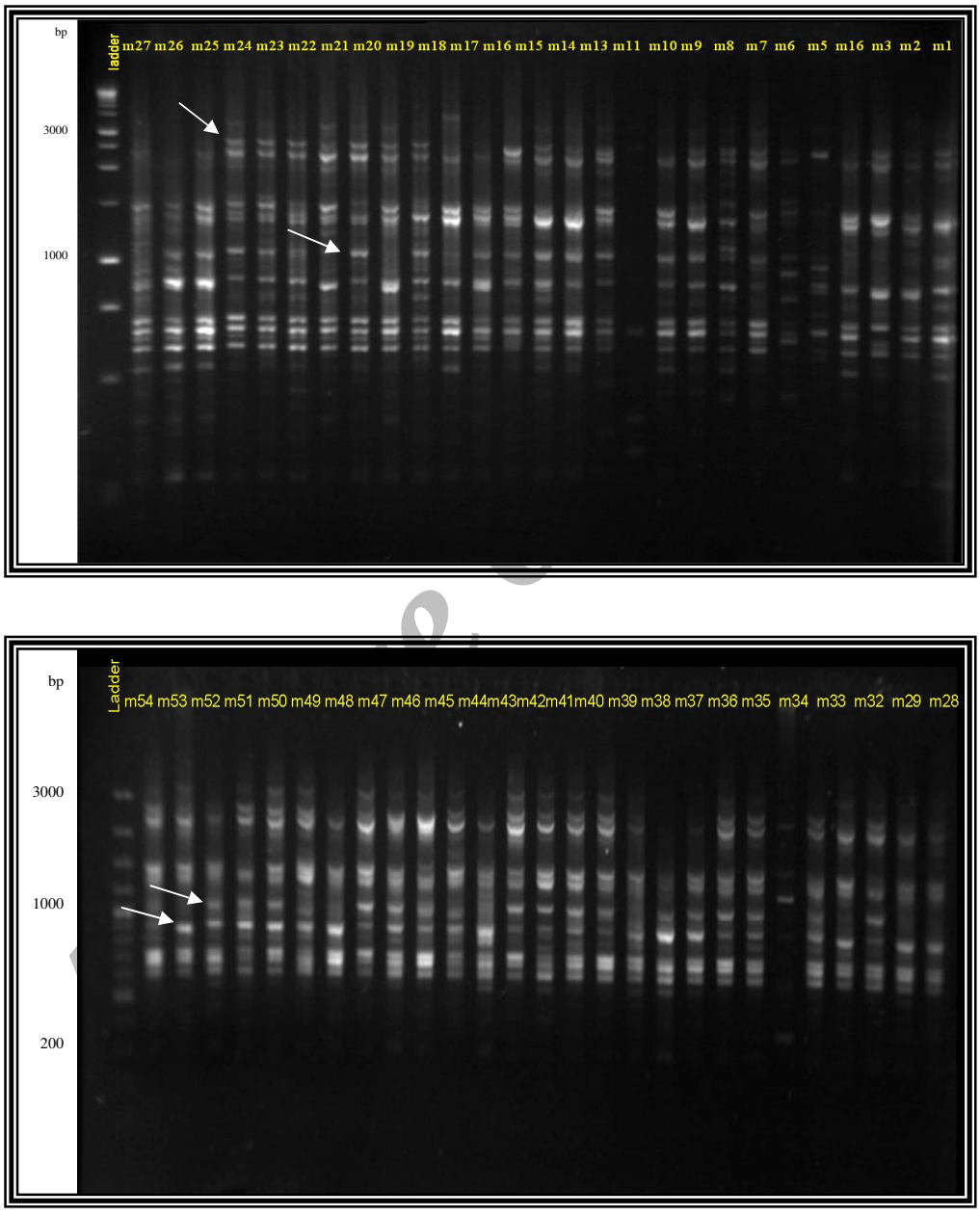
نتایج و بحث

تنوع ژنتیکی توده های خربزه و طالبی ایرانی جمع آوری شده از استانهای اصفهان، خراسان جنوبی، خراسان شمالی، خراسان رضوی، یزد، کرمان، کرمانشاه، ایلام، زنجان، اردبیل و همدان با استفاده از آغازگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از یازده آغازگر مورد بررسی، آغازگر P_7 قادر به تولید محصول نبود و آغازگرهای P_{10} و P_{11} فقط باند های یک شکل واضح و تکرار پذیر تولید نمودند. هشت آغازگر باقیمانده که الگوی باندی با وضوح و با تکرارپذیری بالا داشته و بین ارقام چند شکلی نشان دادند، برای مطالعه روابط ژنتیکی 54 ژنوتیپ خربزه و طالبی استفاده شد (شکل 1). آغازگرهای استفاده شده برای آنالیز ژرم پلاسم خربزه و طالبی، در مجموع توانستند 84 مکان را شناسایی کنند که 63 مکان از آنها چند شکلی نشان دادند. آغازگر P_8 بیشترین تعداد مکان (14 مکان) و

Archive of SID

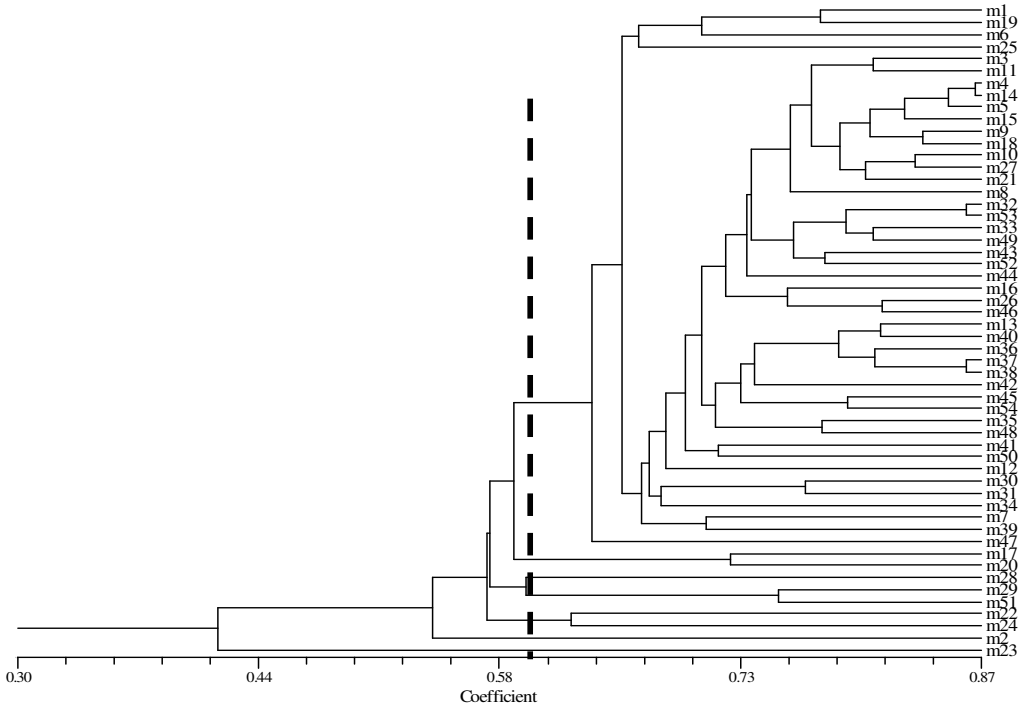
www.SID.ir

آغازگر P_4 کمترین تعداد مکان (8 مکان) را تولید نمودند. بیشترین و کمترین درصد چند شکلی به ترتیب با استفاده از آغازگرهای P_8 و P_9 تولید شد. متوسط تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر در 54 ژنوتیپ خربزه و طالبی 10/5 بدست آمد. نتایج بدست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول سه آمده است.



شکل 1- مقایسه الگوی الکتروفورزی DNA تکثیر شده از 54 ژنوتیپ خربزه و طالبی توسط آغازگر P_3 در ژل یک و نیم درصد با نشانگر اندازه 100 جفت باز (GeneRuler^{TM}, 100 bp DNA Ladder, Plus Fermentase)

www.SID.ir



شکل 2- فنوگرام ترسیم شده برای 54 ژنوتیپ خربزه و طالبی بر پایه باند های حاصل از نشانگرهای ISSR با استفاده از ضریب تشابه جاکارد

فاصله ژنتیکی ژنوتیپهای مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد از 0/34 الی 0/87 متغیر بود. بالا بودن دامنه فاصله ژنتیکی یاد شده نشان دهنده تنوع بالای ژنوتیپهای خربزه و طالبی های ایرانی می باشد. فنوگرام حاصل از تحلیل خوشه ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد در شکل 2 آمده است. خط برش در فنوگرام شکل 2 از محل فاصله ژنتیکی 0/67 باعث گروه بندی ژنوتیپها در شش گروه شد که اکثر ژنوتیپها در گروه اول قرار گرفتند. بمنظور بررسی راحت تر، گروه اول به شش زیر گروه "الف" تا "ز" تقسیم شد. زیر گروه "الف" شامل ژنوتیپهای پوست سبز خمینی شهر(m1)، میر پنجی (m19) و شادگان (m6) بود. گرگه دیم (m25) جدا از سایرین و در زیر گروه "ب" قرار گرفت. مطالعات انجام شده با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی نیز ژنوتیپ گرگه دیم را از سایر ژنوتیپها جدا نمود. از ویژگی های این ژنوتیپ می توان به طعم ترش- شیرین و خصوصیات دیم بودن آن مانند کوچکی میوه، زودرسی و مقاومت به خشکی اشاره نمود(5). بیشتر ژنوتیپهای گروه اول در زیر گروه "ج" قرار گرفتند که برخی از ژنوتیپهای این زیر گروه شامل ژنوتیپهای گرگاب (m14)، یزدی (m4)، لطیفه گرگاب (m10)، مجدی (m32)، علی گنگه (m53)، سوسکی (m43)، رباطی (m35)، پوست زرد سرو فیروزان (m50) بود. مطالعه انجام شده بر روی صفات میوه نیز این ژنوتیپها را در یک گروه قرار داد (5). مطالعات مورفولوژیکی بر روی برخی از ژنوتیپهای مطالعه حاضر نیز قرار گرفتن ژنوتیپهای لاکی 1(m9)، لاکی 2 (m26) و زرد 25 (m11) را در یک گروه تأیید کرد (4). در زیر گروه "د" ژنوتیپهای افغانی(m30)، چروک زرد (m31)، لاکی 3 (m34) قرار گرفتند که هر سه ژنوتیپ مربوط به استان خراسان بودند. زیر گروه "ر" شامل ژنوتیپهای سیرجان (m7) و توسرخ (m39) بود که هر دو متعلق به استان کرمان می باشند. آخرین زیرگروه"ز" نیز به تنهایی ژنوتیپ سفید (m47) را در خود جای داد. گروه دوم شامل ژنوتیپهای لاکی زرد (m20) و دو رگه خربزه گرمک (m17) بود. در گروه سوم

Archive of

www.SID.ir

ژنوتیپهای خاقانی (m29)، خاتونی (m28) و خربزه طالبی سرخس (m51) قرار گرفتند. ویژگیهای دو ژنوتیپ اول (خاقانی و خاتونی) که توسط زامیاد و همکاران (1385) ارائه شده عبارتند از کشیدگی میوه با گوشت ترد، وزن متوسط به بالا، طرح پوست نواری، جدا نشدن دمگل در زمان رسیدگی و ضخامت متوسط پوست میوه. از طرف دیگر هر سه ژنوتیپ واقع شده در گروه سوم مربوط به استان خراسان بودند. ژنوتیپهای زرد معطر (m22) و کرمانی (m24) گروه چهارم را تشکیل دادند و ژنوتیپهای بیرجند (m2) و تیل زرد (m23) به ترتیب گروههای 5 و 6 را تشکیل دادند. بیشترین فاصله ژنتیکی میان ژنوتیپهای بیرجند و تیل زرد (هر دو از استان خراسان) بود که تیل زرد متعلق به گروه کانتالوپنسیس (طالبی ها) می باشد. از این رو این میزان تفاوت بین این دو ژنوتیپ طبیعی بنظر می رسد. در صورت مناسب بودن صفات مورد نظر در برنامه به نژادی، این ژنوتیپها را می توان به عنوان والد در برنامه های دو رگ گیری برای اصلاح ژنوتیپهای خربزه و طالبی و بدست آوردن حداکثر هتروزیس در جهت سازگاری بیشتر با شرایط کشور استفاده نمود. کمترین فاصله ژنتیکی بین دو ژنوتیپ گرگاب (استان اصفهان) و یزدی (استان یزد) بود.

بالاترین میزان چند شکلی (PIC) مربوط به آغازگر P_8 و معادل 0/92 بود (جدول 3). بعد از آن آغازگرهای P_2 و P_6 بیشترین مقدار چند شکلی (PIC) را به خود اختصاص دادند و این آغازگرها بهتر از آغازگرهای دیگر توانستند فاصله ژنتیکی ژنوتیپها را مشخص کنند. بنابراین می توان از این آغازگرها (P_8، P_2 و P_6) برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسمهای دیگر خربزه و طالبی در پژوهشهای بعدی بهره گرفت. آغازگر P_9 با کمترین میزان چند شکلی (PIC) توانائی خوبی برای جداسازی ژنوتیپها را نداشت. با توجه به این که مقادیر محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) از صفر تا یک متغیر است و هر چه این عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چند شکلی برای آن جایگاه در جمعیت تحت بررسی است، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) اکثر آغازگرهای مورد استفاده عدد بزرگی بود که نشان دهنده انتخاب صحیح و کارائی بالای این آغازگرها می باشند (جدول 3). شاخص نشانگری آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه بین 2/72 تا 7/96 متغیر بود. آغازگرهای P_8 (MI=7.96)، P_1 (MI=5.19)، P_2 (MI= 5.53) و P_6 (MI= 4.47) شاخص نشانگری بالاتری را نسبت به سایر آغازگرها نشان دادند. شاخص نشانگری به عنوان معیاری مناسب برای پیشگوئی کارایی نشانگر در یک ژرم پلاسم استفاده می گردد. بنابر این، آغازگرهایی که در این مطالعه بالاترین مقدار شاخص نشانگری را به خود اختصاص دادند، می توانند برای مطالعه ژرم پلاسم خربزه و طالبی ایرانی در سطح وسیع استفاده گردند. مقدار بالای چند شکلی توده های بومی خربزه و طالبی ایرانی نشان داد که نشانگرهای مولکولی ISSR روش مفید و توانمندی برای بررسی ژرم پلاسم *C. melo* می باشند. این میزان چند شکلی از یک طرف نشان دهنده کارایی کاربرد این نشانگرها در مطالعه ژرم پلاسم خربزه و طالبی و از طرف دیگر نشان دهنده توزیع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی وسیع این گیاه در ایران می باشند. اسپانسکی و همکاران (1999) با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR تعداد 54 ژنوتیپ خربزه را بررسی نمودند، نتایج به دست آمده نشان داد که حدود 90 درصد چند شکلی بین ژنوتیپهای مورد مطالعه وجود دارد. به نظر می رسد میزان بالای چند شکلی بدست آمده در این مطالعه بدلیل جمع آوری ژنوتیپها از مناطق جغرافیایی وسیع و پراکنده (23 کشور) و همچنین روشهای استفاده شده (RAPD و ISSR) می باشد (23). همچنین مطالعه انجام شده با استفاده از نشانگرهای ISSR روی گیاه کدو، که گیاهی هم تیره خربزه می باشد، میزان چند شکلی را 74 درصد در بین ژنوتیپهای مورد مطالعه نشان داده است (18). میزان چند شکلی مشاهده شده در این مطالعه (75 درصد) نسبت به مطالعات قبلی که بر روی توده های بومی خربزه ایرانی انجام گرفته

Archive of SID

www.SID.ir

است، بالاتر می باشد (3، 4 و 5). بالا بودن چند شکلی بدست آمده در پژوهش حاضر را می توان به کارآیی بالای روش ISSR نسبت به RAPD، وسعت مناطق جغرافیایی نمونه برداری شده و به تعداد ژنوتیپهای مورد بررسی نسبت داد. ازآنجا که در روش ISSR-PCR، آغازگرها مکمل نواحی ریزماهواره ای می باشند که در یوکاریوتها با فراوانی بالا در سراسر ژنوم پراکنده اند، استفاده از این روش می تواند سطح بالایی از چند شکلی را نشان دهد.

نتایج این تحقیق نشان می دهد که تنوع ژنتیکی موجود در بین توده های بومی خربزه و طالبی ایرانی بسیار مناسب برای انجام برنامه های اصلاحی و دورگ گیری جهت افزایش عملکرد، کیفیت و سازگاری این گیاه می باشد. همچنین به نظر می رسد که روش ISSR-PCR به همراه روشهای چند متغیره آماری مثل تجزیه خوشه ای، پتانسیل قابل توجهی جهت بررسی روابط خویشاوندی، سیر تکاملی، تنوع ژنتیکی و جغرافیایی گیاهان را داراست.

منابع

1. پوستچی، ا. 1350. جالیز و جالیز کاری. موسسه فرانکلین، 340 صفحه.

2. دانش، م.، لطفی، م.، نقوی، م.، پیرسیدی، م.، و خادم نعمت الهی، ا. 1386. بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین توده ای برخی از جمعیتهای مهم و تجاری خربزه و طالبی ایرانی با استفاده از نشانگر ملکولی AFLP. خلاصه مقالات دومین همایش ملی زیست شناسی و ملکولی. صفحه 249-246.

3. رزمی، ش. 1384. بررسی تنوع ژنتیکی برخی از توده های بومی خربزه ایرانی با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و RAPD. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تربیت مدرس.

4. زامیاد، ح.، جلالی جواران، م.، شهریاری، ف.و فیضیان، ا. 1385. بررسی تنوع ژنتیکی برخی توده های خربزه بومی استان خراسان با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و ملکولی رپید (RAPD). مجله علوم و صنایع کشاورزی.20:21-13 .

5. فیضیان، ا.، جلالی جواران، م.، دهقان، ح.، زامیاد، ح. 1386. بررسی تنوع ژنتیکی برخی توده های بومی خربزه ئیان (ملون)در ایران با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و ملکولی RAPD. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. 11: 162- 151 .

6. کوهپایگانی، ج. 1383. بررسی تنوع ژنتیکی توده های خربزه طالبی ایرانی و اثر روش تولید بذر بر فرسایش آنها. پایان نامه دکتری باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

7. مویدی نژاد، ا.، ارشادی، ا. و کوهپایگانی، ج. 1386. تعیین روابط خویشاوندی برخی از ارقام طالبی ایرانی با استفاده از نشانگرهای ملکولی SSR. خلاصه مقالات دومین همایش ملی زیست شناسی و ملکولی. صفحه 43-41.

8. Bornet, B. and Branchard, M. 2001. Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant molecular biology. 19:209-215.

9. Dellaporta, S. L., Wood, J. and Hicks, V. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant. Mol. Biol. Reporter. 1: 19-21.

10. Fang, D. Q., Roose, M. L. and Fredric, C. T. 1997. Fingerprinting trifoliate orange germplasm acssessions with isozyme, RFLP and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Theor. Appl. Genet. 95:211-219.

11. Godwin, L. A., Aitken, E. A. Smith, L. A.1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. Electrophoresis. 18:1524-1528.

12. Hou, Y., Yan, Z., Wei, Y. 2005. Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR analysis.Barely Genetics Newsletter. 35:9-22

13. Jaccard, p. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin Societe Vaud. Sciences Naturates. 44: 223-270.

14. Kantety, R. V., Zeng, X. P., Bennetzen, J. L. and Zehr, B. E. 1995. Assessment of genetic diversity in Dent and Popcorn (Zea mays L.) inbred lines using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) amplification. Mol. Breed. 1:365-373.

15. Liliya, K. 2000. Organization of plant genetic resources in Bulgaria. Acta. Hort. 510:247-25.

16. Liu, B. and Song, M. 2002 . Assesment of genetic diversity in melon germplasm based on RAPD and ISSR. Journal of Agricultural Biotechnology. 10:231-236.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Nagaoka, T. and Ogihara, Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theor Appl Genet. 94:597-602.

18. Paris, H. S., Yonash, N., Portony, V., Mozes-Daube, N., Tzuri, G. and Katzir, N. 2003. Assesment of genetic relationship in cucurbita pepo using DNA markers. Theor. Apple. Genet. 106: 971-978.

19. Pejic, I., Ajmone-Marsan, P., Morgante, M., Castiglioni, P., Taramino, G. and Motto, M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. Theor Appl Genet. 97:1248-1255.

20. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A.1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding. 2: 225–238.

21. Prevost, A. and Wikinson, M. J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor Appl Genet. 98:107-112.

22. Robinson, R. W., and Decker- Walters, D. S. 1997. Cucurbits. CAB International. Cambridge. 226 pp.

23. Stepansky, A., Kovalski, I., Schaffer, A. A. and Prel-Treves, R.1999. Variation in sugar levels and invertase activity in mature fruit representing a broad spectrum of cucumis melo gentypes.Genet Res. Crop Evol. 46:53-62.

Archive of SID

www.SID.ir

Analysis of Genetic Diversity of Iranian Melons (*Cucumis melo L.*) Using ISSR Markers

Fabriki Ourang S. [1], Shams-Bakhsh M.[2], Jalali Javaran M.[2],and Ahmadi J.[3]

[1] Plant Breeding Dept., Tarbiat modares Univ., Tehran, I.R. of IRAN.

[2] Agriculture faculty, Tarbiat modares Univ., Tehran, I.R. of IRAN.

[3] Biotechnology Dept., International University of Imam Khomeini, Qazvin, I.R. of IRAN.

Abstract

As primitive culturing of variant cultivars of melon, there is probably valuable melon gene pool in Iran. the genetic diversity of fifty four Iranian melon (*Cucumis melo* L.) accessions which were collected from Yazd, Hamedan, Zanjan, Ilam, Kerman, Kermanshah, Isfahan, Ardebil, Khorasan-e-Shomali, Khorasan-e-Jonobi and Khorasan-e-Razavi provinces, were analyzed using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Collectively 11 primers which contained different simple sequence repeat (microsatellite) were used as single primer, and tested for PCR amplification. 63 polymorphic bands of 84 loci were scored. They were then used to estimate the genetic similarity among accessions using cluster analysis based on similarity coefficient matrix using Unweigthed Pair Group Method with Arithmetic mean method (UPGMA). The results showed that among accessions mean genetic distances (Jaccard's coefficient) and mean polymorphism information content (PIC) were 0.74 and 0.84, respective. The primer $(AC)_8G$ had the highest PIC (0.92). Cluster analysis indicated wide range of diversity across the genotypes used. The least of genetic distance was observed between Gorgab and Yazdi accessions revealing closer genetic relationship of two accessions with each other than with others. The highest genetic distance was observed between Birjand and Till-e-Zard. The results of this study revealed that ISSR markers could be efficiently used for genetic differentiation of the melon accessions. The primer $(AC)_8G$ with the higher PIC is recommended for further analysis.

Keywords: melon, genetic diversity, marker, ISSR

Archive of SID

www.SID.ir