Archive of SID

استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و طبقه بندی بخشی از ژرم‌پلاسم خربزه ایرانی

سمیه صالحی نجف آبادی، مختار جلالی جواران* و حمید دهقانی

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات.

تاریخ دریافت: ۸۷/٤/۲٤ تاریخ پذیرش: ۸۸/٤/٦

چکیده

مطالعه صفات مورفولوژیکی و میزان تنوع ژنتیکی در ذخایر توارثی گیاهی جهت طبقه‌بندی ژرم‌پلاسم و جلوگیری از فرسایش ژنتیکی از قدمهای اساسی و اولیه در اکثر برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. این مطالعه به منظور شناسایی و جمع‌آوری ژرم-پلاسم گونه خربزه–طالبی (*Cucumis melo* L.) از نقاط مختلف ایران و ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی موجود در آنها با بهره‌گیری از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی انجام گرفت. در این تحقیق ۲۱ صفت مورفولوژیکی بر روی ۳۰ توده خربزه–طالبی اندازه‌گیری شد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مورفولوژی با استفاده از روش UPGMA و نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. تکثیر مکانهای ژنی با استفاده از ۱۲ آغازگرRAPD انجام شد. گروه‌بندی توده‌ها، ۷ گروه مجزای ژنتیکی را در سطح تشابه ۸۲ درصد آشکار ساخت. درصد چندشکلی در این آزمایش ۸۲ درصد تعیین شد. این آزمایش نشان داد گرچه نشانگر مولکولی RAPD می‌تواند گروههای مختلف خربزه را تا حدودی از هم تفکیک کند، ولی نزدیکی این گروهها به یکدیگر دلیلی بر شباهت بالای ژنوم این نمونه‌ها می‌باشد.

واژه های کلیدی: خربزه–طالبی، ژرم‌پلاسم، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مورفولوژی، نشانگرهای مولکولی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۳-٤٤۱۹٦٥۲۲-۰۲۱ ، پست الکترونیکی:m_Jalali@modares.ac.ir

مقدمه

گونه *Cucumis melo* L. با ۲n= ۲x=۲٤ کروموزوم دارای گروههای زراعی مختلف شامل خربزه، طالبی، گرمک، خیار چنبر و دستنبو می‌باشد که برای سهولت در این مقاله به همه آنها خربزه–طالبی اتلاق می‌شود. خربزه–طالبی یکی از محصولات باغی دگرگشن با اهمیت اقتصادی بالا می‌باشند که به خانواده کدوئیان (*Cucurbitaceae*) تعلق دارند (۹). منشاء خربزه–طالبی هنوز مورد بحث است، به نظر برخی محققان منبع اولیه طالبی و خربزه به شکل کنونی کشور ایران، قفقاز و کشورهای همسایه ایران است (۸). از طرفی با توجه به توزیع ملونهای وحشی در مونوگراف کیرکبراید (Kirkbride) (۹) به نظر می‌رسد آفریقا مرکز اولیه تنوع باشد و هند، ایران، افغانستان و چین مراکز ثانویه تنوع ملون باشند. در مورد طبقه بندی نادین (۱۲) گیاه شناس فرانسوی انواع گونه خربزه را به ده گروه تقسیم نمود. این طبقه بندی توسط مانگر و رابینسون (۱۱) با در نظر گرفتن اسم سه قسمتی مورد تجدید نظر قرار گرفت. جدیدترین طبقه بندی توسط پیترات و همکاران (۱۳) بر پایه شناسایی تفاوت خصوصیات مترادف در زیرگروهها ارائه شده است. آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی ذخایر توارثی گونه‌های گیاهی، جهت کاهش حجم نمونه‌های ذخایر توارثی موجود در بانک ژن و بررسی خلوص بذرها در اصلاح نباتات از اهمیت خاصی برخوردار است. این موضوع خصوصاً در مورد گیاهان خانواده صیفی‌جات که در معرض فرسایش شدید ژنتیکی قرار دارند بسیار مهم

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد. نظر به اینکه در سالهای اخیر سطح زیر کشت ارقام غیر بومی خربزه در حال گسترش است، فرسایش ژنتیکی رقمهای بومی به شدت افزایش یافته است. این خطر می‌تواند میراث چند هزار ساله را در مدت کوتاهی نابود کند، بنابراین جمع آوری، طبقه‌بندی و بررسی تنوع ژنتیکی خربزه–طالبی جهت حفاظت از این ودیعه الهی و ثروت ملی بسیار مهم می‌باشد. روشهای مختلفی برای برآورد تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی اشاره کرد. اگرچه در برخی موارد، نشانگرهایی مانند AFLP و SSR در مطالعات تنوع ژنتیکی ترجیح داده می‌شوند، اما نشانگر RAPD نیز به دلایلی همچون عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد توالی DNA ژنوم جهت طراحی آغازگر، نیاز به مقدار کم DNA ژنومی، سادگی و سرعت آزمایش، جایگاه خود را در بسیاری از تحقیقات مولکولی از جمله ارزیابی تنوع ژنتیکی حفظ کرده است (۱۷). تاکنون مطالعاتی با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی RAPD جهت بررسی چندشکلی در ژرم‌پلاسم خربزه–طالبی انجام گرفته است. در تحقیقی برای بررسی تنوع ژنتیکی خربزه و طالبیهای ایران، تعداد ۱۰۰ نمونه از خربزه‌های مناطق مختلف در قالب طرح لاتیس ساده ارزیابی گردید (٤). در مطالعه‌ای ارتباط ژنتیکی ۱۲۵ خربزه اسپانیایی با استفاده از نشانگر RAPD و ۲۲ صفت زراعی با ۷۲ نمونه مرجع از کشورهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت؛ نتایج نشان داد می‌توان از نمونه‌های خربزه اسپانیا جهت ارتقای پایه ژنتیکی ژرم پلاسم خربزه استفاده کرد (۱۰). بررسی تنوع ژنتیکی ۱۷ نمونه ملون در یونان با استفاده از نشانگر RAPD و ویژگیهای مورفولوژیکی نشان داد توده‌ها از نظر خصوصیات ژنتیکی بسیار متنوع می باشند (۱٦). همچنین در تحقیقی دیگر تنوع ژنتیکی ٥٦ توده خربزه جمع آوری شده از نقاط مختلف ترکیه با استفاده نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی RAPD مورد ارزیابی قرار گرفت که هر دو نشانگر توانستند به خوبی انواع خربزه زراعی را از غیر زراعی جدا کنند (۱٤).

جدول ۱– اسامی توده‌های خربزه ایرانی مورد ارزیابی در این تحقیق

ردیف	کد ژنوتیپ	نام محلی	محل جمع آوری	ردیف	کد ژنوتیپ	نام محلی	محل جمع آوری
۱	J1*	خربزه سیرجان	شهرستان سیرجان	۱٦	J20	رحمت آباد	شهرستان کرمان
۲	J2*	کاظم آباد	شهرستان مشهد	۱۷	J21	سیم تربت حیدریه	شهرستان تربت حیدریه
۳	J4	طاهرآباد	شهرستان کرمان	۱۸	J22*	پوبث زرد	بانک ژن گیاهی ایران
٤	J5*	جیرفت	شهرستان جیرفت	۱۹	J24*	تاشکندی	شهرستان سمنان
٥	J6	کویر کاظم آباد	شهرستان مشهد	۲۰	J25	خاتونی صاف	شهرستان کرمان
٦	J7	زرند	شهرستان زرند	۲۱	J26	جعفـرآباد	شهرستان تربت حیدریه
۷	J9*	بندر والی آباد	شهرستان کرمان	۲۲	T4*	طالبی شمشک	شهرستان گرگان
۸	J13	مشهدی سرچ۱	شهرستان مشهد	۲۳	T5*	گرگه دیم	شهرستان ایلام
۹	J13'*	مشهدی سرچ۲	شهرستان مشهد	۲٤	T6*	طالبی سوری	بانک ژن گیاهی ایران
۱۰	J14	ننه کرمان	شهرستان کرمان	۲٥	T7*	طالبی مازندران	شهرستان مازندران
۱۱	J15*	کرمان	شهرستان کرمان	۲٦	C2*	چنبر	بانک ژن گیاهی ایران
۱۲	J16	خاکستری کرمان	شهرستان کرمان	۲۷	C3*	خیار حاج جعفری	شهرستان کرمان
۱۳	J17*	زرند۲	شهرستان زرند	۲۸	C5*	خیار موشی بم	شهرستان بم
۱٤	J18*	بهار	شهرستان همدان	۲۹	C6*	خیار راور آبکوهی	شهرستان آب کوه
۱٥	J19*	کویری کاشمر	شهرستان کاشمر	۳۰	C10*	Slmituila	بانک ژن گیاهی ایران

www.SID.ir

Archive of SID

هدف از انجام این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی بذرهای جمع آوری شده با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA وخصوصیات مورفولوژیکی است که بر اساس آن توده‌های بومی مناسب برای انجام کارهای اصلاحی و تولید بذر هیبرید انتخاب شوند.

مواد و روشها

در این تحقیق تعداد ۳۰ توده خربزه–طالبی (جدول۱) که از نقاط مختلف کشور جمع‌آوری شده بود مورد بررسی قرار گرفتند. توده‌ها در اردیبهشت سال ۱۳۸۵ در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس کشت گردید. برای کشت بذرها، پس از شخم و تسطیح زمین، نهرهایی به فاصله ۳ متر از یکدیگر و عرض تقریبی ۷۰–۵۰ سانتیمتر موازی با یکدیگر و عمود بر جهت شیب زمین ایجاد گردید. سپس بذرها در بالای پشته و محل داغ آب به فاصله تقریبی ۷۰–۶۵ سانتیمتر در خاک نم‌دار کشت شدند. به دلیل کمی بذر در نمونه‌های تهیه شده، انجام تحقیق در قالب طرحهای آزمایشی تکراردار مقدور نبود. پس از سبز شدن بذرها و برطرف شدن خطر سرما عملیات تنک انجام گردید. عملیات سربرداری، هرس و گل گیری انجام شد و روی هر بوته دو میوه نگه داشته شد. کود ازته به صورت سرک یک ماه پس از کاشت به میزان ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار استفاده شد. عملیات آبیاری قبل از سبز شدن دو روز یک بار و پس از استقرار بوته ها چهار روز یک بار انجام گرفت. جهت تهیه بذرهای خالص ابتدا گلهای اضافی حذف گردیدند و سپس اطراف یک تک بوته از هر نمونه، با استفاده از قفسهایی که روی آنها تورهایی با منافذ بسیار ریز قرار داشت پوشانده شد. برداشت محصول در تابستان سال ۱۳۸۵ با بررسی علائم رسیدگی مانند روشن شدن رنگ پوست میوه، خشک شدن پیچک نزدیک میوه، نرم شدن نوک میوه و از همه مهم‌تر، راحت‌تر جدا شدن دمگل از میوه انجام گرفت (۱ و ۲).

ارزیابی صفات مورفولوژیکی: یادداشت برداری صفات براساس توصیف نامه مؤسسه بین المللی ذخایر توارث گیاهی (IPGRI) انجام شد (۷). صفات ارزیابی شده شامل صفات کمی و کیفی بودند که در مطالعات انجام گرفته توسط کوهپایگانی و همکاران (٤)، رزمی و همکاران (۱) و فیضیان و همکاران (۲ و ۳) بیشترین تنوع را نشان داده و تأثیر بیشتری در تقسیم بندی توده‌ها داشتند. صفات کیفی شامل : رنگ پوست، نوع طرح ثانویه، رنگ طرح ثانویه، رنگ مزوکارپ، شکل میوه، قاچ روی میوه، بافت پوست، خراش و جای شکوفه، میزان عطر گوشت، رنگ پوشش دانه و صفات کمی شامل: وزن میوه، طول میوه، عرض میوه، طول و عرض حفره وسط، ضخامت گوشت، ضخامت پوست، شاخص بریکس و وزن صددانه بر روی ژنوتیپها مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است صفاتی نیز بر روی برگ اندازه‌گیری شد که شامل: کرکهای روی برگ و دمبرگ، لوبهای برگ و حاشیه برگ بودند که تفاوتهای بسیار کمی بین توده‌ها نشان داد، لذا از این صفات صرف نظر شد.

ارزیابی مولکولی: جهت ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی گروههای مختلف *Cucumis melo* L.، ۲۰ توده بومی خربزه– طالبی انتخاب شد. پس از رشد گیاهچه و در مرحله پنج تا شش برگی، از هر توده ۵ گیاه به طور تصادفی انتخاب و از برگهای سالم و سبز هر گیاه نمونه برداری انجام گرفته و به ۸۰– درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. استخراج DNA مطابق روش دلاپورتا و همکاران (٦) با تغییرات جزئی انجام گرفت. تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و همچنین آزمایش DNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد و انجام الکتروفورز صورت پذیرفت. در این مطالعه از ۱۲ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی با توالی تصادفی متعلق به شرکت اپرون استفاده شد. مشخصات کامل آغازگرها در جدول ۲ درج گردیده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای RAPD مورد استفاده در ارزیای ژنوتیپهای خربزه

ردیف	کد آغازگر	توالی آغازگر	دمای ذوب (Tm)
۱	OPF12	5'-ACGGTACCAG-3'	۳۲
۲	OPAB17	5'-TCGCATCCAG-3'	۳۲
۳	OPADO8	5'-GGCAGGCAAG-3'	۳٤
٤	OPAG11	5'-TTACGGTGGC-3'	۳۲
٥	OPAH15	5'-CTACAGCGAG-3'	۳۲
٦	OPAI14	5'-TGGTGCACTC-3'	۳۲
۷	OPAT15	5'-TGACGCACGG-3'	۳٤
۸	OPAT13	5'-CCAGCTGTGA-3'	۳۲
۹	OPAUO5	5'-GAGCTACCGT-3'	۳۲
۱۰	OPAUO16	5'-TCTTAGGCGG-3'	۳۲
۱۱	UB16	5'-GGTGGCGGGA-3'	۳٦
۱۲	#UB84	5-'GCCCGCGAGT-3'	۳٦

جدول ۳- برنامه تکثیر DNA از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مرحله	واکنش انجام شده	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد دور
۱	واسرشته سازی DNA ژنومی	۹٤	٥	۱
۲	اتصال آغازگزها به رشتهٔ الگو	٤۰-۳٤	۲	۱
۳	گسترش رشتهٔ جدید	۷۲	۲	۱
٤	واسرشته سازی	۹٤	۱	
٥	اتصال آغازگزها به رشتهٔ الگو	٤۰-۳٤	۱	٤۰ دور
٦	گسترش رشتهٔ جدید	۷۲	۲	
۷	بسط نهایی	۷۲	٥	۱

واکنش زنجیره ای پلیمراز در مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی ۳۰ نانوگرم از DNA ژنومی، آغازگر با غلظت نهایی ۱/٦ میلی مولار، کلرید منیزیم با غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار، دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات با غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار، ۲/۵ واحد آنزیم تک پلیمراز (Taq Polymerase) و یک برابر (1x) بافر واکنش صورت پذیرفت. فرایند تکثیر DNA مطابق روش ویلیامز و همکاران (۱۸) با کمی تغییر (جدول ۳) و با استفاده از ترموسایکلر اپندرف انجام گرفت. فرآورده واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) رنگ آمیزی شدند. الگوی نواری زیر نورUV مشاهده و توسط دستگاه عکسبرداری از ژل، عکسبرداری انجام شد. برای اطمینان از تکرارپذیری تکنیک رپید آزمایشات PCR برای هر پرایمر سه بار تکرار شد.

آنالیز داده ها: برای تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از بررسی مورفولوژی نمونه‌ها، ماتریس صفر و یک تشکیل گردید و سپس داده‌ها در محیط SPSS به روش UPGMA با ضریب تشابه جاکارد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نمودار خوشه‌ای برای گروه بندی داده‌ها رسم شده و برش در نمودار مذکور در ناحیه۱۰، توده‌های مورد ارزیابی را به

www.SID.ir

Archive of SID

هفت گروه تقسیم نمود. پس از انجام برش در فاصله ژنتیکی ۱۰، خوشه به عنوان تیمار و توده در خوشه به عنوان تکرار در نظر گرفته شد و تجزیه واریانس بر اساس صفات کمی انجام گرفت. در تجزیه مولکولی، با توجه به DNA تکثیر شده و باندهای حاصل، با مقایسه یک باند در نمونه های مورد بررسی در صورت حضور یک باند ارزش یک و عدم حضور باند ارزش صفر برای باند مذکور در نظر گرفته شد. پس از تشکیل ماتریس صفر و یک، ماتریس ضرایب تشابه محاسبه گردید. ضریب کوفنتیک برای تعیین مطلوبیت تجزیه خوشه‌ای اندازه گیری شد. از میان ضرایب تشابه متداول، ضریب تشابه جاکارد که بهترین ضریب کوفنتیک را نشان داد (r=0/86) انتخاب و سپس تجزیه خوشه ای با روش UPGMA و با استفاده از نرم افزار NTSYS نگارش 2.02e انجام شد و نتایج به صورت یک دندروگرام (شکل۱) خلاصه شد.

جدول٤- تجزیه واریانس خوشه برای صفات مورفولوژیک کمی توده‌های خربزه مورد ارزیابی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
صفات		طول میوه	عرض میوه	طول حفره وسط	عرض حفره وسط	وزن میوه	ضخامت پوست	ضخامت گوشت	شاخص بریکس
خوشه	٦	۲۲۸/۸۰***	۳۰/٦٥۷***	۱۷٥/۹۹***	۱۲/۸۱۲**	۲/۱۸۸**	۰/۱۸٥***	۰/۱۲۸***	۹/۳٥۸**
توده درون خوشه	۲۳	۲۰/۳٤	٤/۳۰٦	۱۹/۲۲	۲/٥٦۸	۰/٤٤۸	۰/۰۱۷	۰/۰۱۳	۲/۰۳۲
کل	۲۹								

** اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد

*** اختلاف معنی دار در سطح ۰/۱ درصد

نتایج و بحث

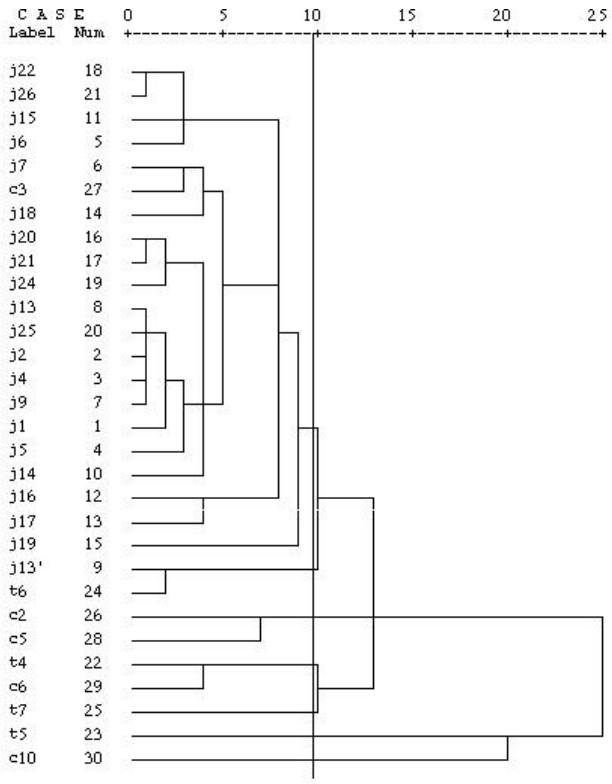
نتایج حاصل از ارزیابی مورفولوژیکی: برای گروه‌بندی و تشخیص نزدیکی و تفاوت ژنتیکی میان نمونه‌های مورد بررسی از روش ناپارامتری تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. برش در نمودار درختی حاصل از این تجزیه در ناحیه ۱۰ صورت گرفت و هفت گروه را ایجاد نمود (شکل۱). دو نمونه پوبث زرد (J22) و جعفرآباد تربت حیدریه (J26) کمترین فاصله و نمونه های گرگه دیم (T5) وجعفرآباد (J26) بیشترین فاصله را با یکدیگر داشتند. در جدول ٤ تجزیه واریانس خوشه برای صفات کمی ارائه شده است که نشان می‌دهد توده ها در خوشه های متفاوت از لحاظ صفات کمی در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی داری دارند.

ویژگی گروههای ایجاد شده: در گروه اول اکثر ژنوتیپها شامل خربزه کویری کاشمر (J19)، زرند۲ (J17)، خاکستری خطدار کرمان (J16)، ننه کرمان (J14)، جیرفت (J5)، سیرجان (J1)، بندر والی‌آباد (J9)، طاهر آباد (J4)، کاظم آباد(مشهدی) (J2)، خاتونی صاف (J25)، مشهدی سرچ۱ (J13)، تاشکندی (J24)، سیم تربت حیدریه (J21)، رحمت آباد (J20)، بهار همدان (J18)، زرند (J7)، کویر کاظم آباد (J6)، کرمان (J15)، جعفر آباد (J26)، پوبث زرد(J22) و خیار حاج جعفری (C3) قرار گرفتند. این گروه بزرگترین و متنوع ترین گروه بوده و می توان آن را

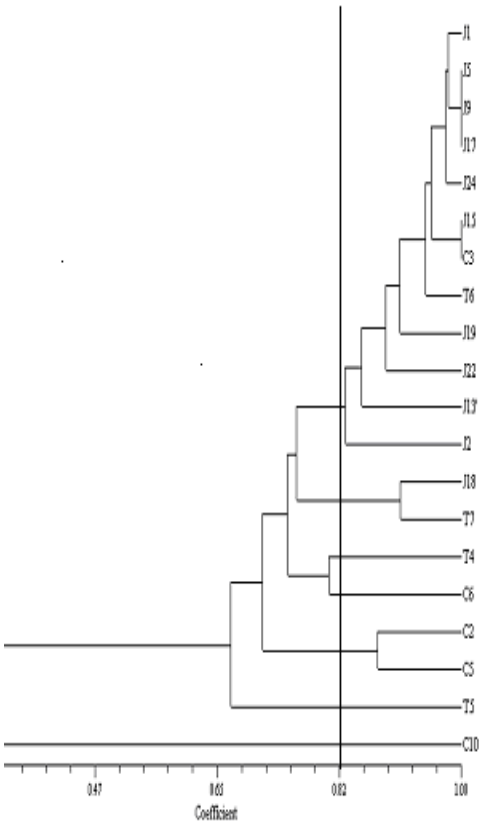
www.SID.ir

Archive of SID

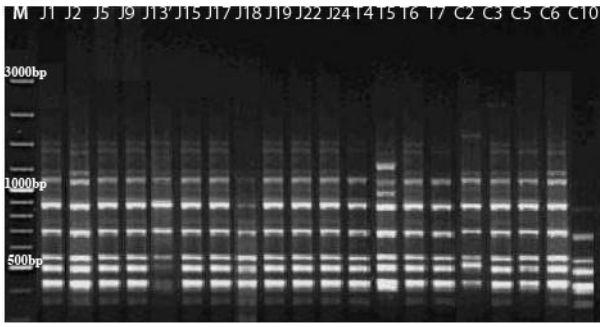
مطابق طبقه بندی مانگر و رابینسون (۱۱) عضو دسته Inodorus در گروه خربزه–طالبی دانست، که خود گروه اول به چهار زیر گروه تقسیم شد. خربزه‌هایی که در زیرگروه اول قرار گرفتند دارای بزرگترین اندازه میوه بوده و وزن میوه در آنها بین ۲۰۰۰ تا ۵۰۰۰ گرم متغیر بود. همچنین گوشتی با تردی متوسط و پوستی کرم رنگ از دیگر خصوصیات مشترک این ژنوتیپها بود.



شکل ۱– دندروگرام مربوط به صفات مورفولوژیکی میوه توده‌های خربزه براساس ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از روش UPGMA



شکل ۳– دندروگرام حاصل از تجزیه و تحلیل باندهای RAPD روی ۲۰ توده ملون با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد



شکل ۲– الگوی باندی ۲۰ توده خربزه با آغازگر OPAT13 روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (چاهک M نشانگر مولکولی وزنی 100bp)

www.SID.ir

Archive of SID

در زیرگروه دوم ژنوتیپهایی قرار گرفتند که همگی دارای خصوصیات خربزه مشهدی مانند گوشت سبز کم رنگ، ترد و پوست مشبک همراه نواربندی بودند. زیرگروه سوم ژنوتیپهایی را شامل شد که از نظر طعم نسبت به سایر توده‌های موجود در این گروه مطلوب‌تر بوده و همگی دارای رنگ پوست میوه لیمویی، بافت صاف و طرح نواری بودند. در زیرگروه چهارم خربزه کویری کاشمر به تنهایی قرار گرفته که مهمترین ویژگی متمایز کننده آن مزوکارپ نارنجی رنگ بود. در گروه دوم طالبی سوری (T6) و خربزه مشهدی۲ (سرچ) (J13′) قرار گرفتند که هر دو عضو دسته Cantalopensis در گروه خربزه–طالبی بودند. از صفات ویژه آن می توان به میوه گرد تا کمی گرد، پوست مشبک و ناهموار همراه با نواربندی و حفره بذری آبدار و نسبتاً عمیق اشاره کرد. گروه سوم متعلق به دسته Flexuosus بوده و دو ژنوتیپ موشی بم (C5) و چنبر (C2) در آن قرار گرفتند. صفاتی مانند شکل دنبلی، کشیده و باریک میوه (Elongate)، طول بلند و عرض کم این گروه را از بقیه گروهها متمایز ساخت. طالبی شمشک (T4) و راور آبکوهی (C6) در گروه چهارم قرار گرفتند که هر دو دارای شکل میوه گرد و پوست مشبک بوده، طول میوه در این گروه بین ١٤ تا ١٦/٥ سانتیمتر و شاخص بریکس در ژنوتیپ شمشک (T4) به ١١/٤ درصد رسید. در گروه پنجم تک ژنوتیپ T7 قرار گرفت که بذر آن با نام طالبی مازندران جمع آوری شده ولی ویژگیهای بارز طالبی مانند شکل گرد، حفره بذری آبدار و نسبتاً بزرگ را نداشت. در دسته ششم توده گرگه دیم (T5) به تنهایی قرار گرفت که می توان آن را عضو دسته Dudaim از گروه خربزه–طالبی دانست. از صفات متمایز کننده آن وزن، طول و عرض کم می‌باشد، به طوری که حداکثر وزن آن به ۹۰۰ گرم رسید. میوه های کوچک ولی شیرین که مشخصه این گروه است اخیراً در اصلاح نباتات بسیار مورد توجه ویژه قرار گرفته است. گروه آخر شامل ژنوتیپ Slmituila (C10) بود که در واقع خارج از گروه ملونها و متعلق به زیر جنس و گونه *Cucumis sativus* می‌باشد که همان خیار سبز است. میوه آن نسبتاً زودرس بوده، طول میوه حدود ١٥–١٢ سانتیمتر، قطر آن ٣ تا ٦ سانتیمتر و متوسط وزن آن حدود ٣٥٠ گرم بود. همچنین پوست میوه کاملاً سبز و داشتن سطحی صاف از سایر خصوصیات مشترک این گروه بود.

انتخاب صفات مورفولوژیکی جهت طبقه‌بندی توده‌های خربزه بر اساس تنوع مشاهده شده در مطالعات قبلی و معنی‌دار بودن تفاوت توده‌ها در صفات ارزیابی شده بود که در سایر صفات این تنوع مشاهده نشد (١، ٣ و ٤). برخی از صفات مورفولوژیکی، ممکن است به دلیل ماهیت چند ژنی(Poly genic) تحت تاثیر محیط قرار گیرند و با توجه به شرایط محیطی و رشدی مختلف، تنوع نشان دهند. به همین دلیل گروه بندی بر اساس این صفات به دلیل عدم بیان دقیق تغییرات ژنتیکی در سطح ژنوم همواره ممکن است با خطا همراه باشد. بنابراین در نتایج حاصل از گروه بندی توده‌های مورد ارزیابی در این مطالعه، ممکن است تحت شرایط محیطی متفاوت تغییراتی ایجاد و نتایج متفاوتی حاصل شود.

نتایج حاصل از ارزیابی مولکولی: از مجموع ١٢ آغازگر استفاده شده برای بررسی تنوع ژنتیکی ٢٠ توده خربزه، ٧ آغازگر OPAT15 ,OPAUO16, OPADO8, OPAH15, OPAG11, OPAT13 و OPAUO5 دارای تکرارپذیری و پلی مورفیسم بالایی بودند. شکل۲ نشان دهنده الگوی ژل الکتروفورزی DNA تکثیر شده با استفاده از آغازگر OPAT13 می‌باشد. تعداد کل باندهای تکثیر شده توسط این ٧ آغازگر ١٩٢٠ عدد بوده و اندازه محصولات تکثیر شده از٣٠٠ تا٢٥٠٠ جفت باز متغیر بود. از مجموع ٩٦ لوکوس تکثیر شده (١٩٢٠ باند)، ٨٢ درصد لوکوس ها (١٥٨٠ باند) چند شکل و ١٨ درصد لوکوس‌ها (٣٤٠ باند) هم شکل بودند. درصد بالای چند شکلی در این آزمایش به دلیل وارد شدن یک توده از گونه *C. sativus* داخل نمونه‌های مورد بررسی بوده است، به طوری که میزان چند

www.SID.ir

Archive of SID

شکلی داخل گونه *C. melo* به تنهایی، ٤٠ درصد بود. همچنین در این آزمایش مشاهده شد که بیشترین لوکوس یک شکل متعلق به آغازگر OPAT15 با ۵ لوکوس (از ۱۹ لوکوس) بوده و آغازگر OPAT13 دارای بیشترین تعداد لوکوس چند شکل بود.

تکرارپذیری داده های حاصل از رپید: پیش شرط استفاده از داده های رپید برای تعیین تنوع ژنتیکی و تخمین فواصل و تشابه ژنوتیپها، تکرارپذیری الگوی باندی رپید می باشد. برای این منظور اقدام به تعیین تکرارپذیری آزمایش گردید و آزمایشات PCR برای هر پرایمر سه بار تکرار شد. نتایج به دست آمده تکرار پذیری کل آزمایش را حدود ۰/۹٤ درصد نشان داد؛ لذا با رعایت نکات فنی، به خصوص درجه حرارت مناسب برای اتصال آغازگر به رشته الگو، تکرارپذیری بسیار بالا بود.

قبل از انجام تجزیه کلاستر ابتدا ماتریس تشابه تشکیل شد، بیشترین میزان تشابه ژنتیکی بین خربزه جیرفت (J5)، بندر والی آباد (J9) و زرند۲ (J17) و همچنین خربزه کرمان (J15) با حاج جعفری (C3) با مقدار ۱۰۰ درصد و کمترین میزان تشابه ژنتیکی (داخل گونه *C. melo*) بین ژنوتیپهای گرگه دیم (T5) و موشی بم (C5)، بهار (J18) و چنبر (C2) مشاهده شد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ماتریس فاصله، توده ها را به ۷ گروه مجزا در سطح تشابه ۸۲ درصد تقسیم نمود (شکل ۳). درگروه اول همانند تقسیم بندی مورفولوژیکی اکثر توده‌ها شامل توده‌های خربزه سیرجان (J1)، کاظم آباد (J2)، جیرفت (J5)، بندر والی‌آباد (J9)، مشهدی سرچ۲ (J13′)، زرند۲ (J17)، تاشکندی (J24)، کرمان (J15)، خیار حاج جعفری (C3)، طالبی سوری (T6)، کویری کاشمر (J19) و پوبث زرد (J22) قرار گرفتند. گروه دوم توده های بهار (J18) و طالبی مازندران (T7)، گروه سوم طالبی شمشک (T4)، گروه چهارم خیار راور آبکوهی (C6)، گروه پنجم خیار موشی بم (C5) و چنبر (C2)، گروه شـشم گرگـه دیم (T5) و گروه هفتم تک ژنوتیـپ Slmituila (C10) را در بر گرفت که متـعلق به گونـه *C. sativus* می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط رزمی و همکاران (۱) و فیضیان و همکاران (۲ و ۳) با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی و مارکر مولکولی RAPD، بر روی چندین توده خربزه انجام شده بود نیز توده گرگه دیم (T5) در گروه جداگانه-ای قرار گرفت که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت.

نتایج حاصل از این تحقیق مناسب بودن نشانگر RAPD را برای بررسی اولیه تنوع ژنتیکی توده‌های بومی خربزه نشان می دهد. لوکوسهای RAPD در ژنوم خربزه–طالبی به طور گسترده‌ای توزیع شده‌اند که تعداد زیاد جایگاه ژنی تکثیر شده این نکته را نشان می‌دهد. قطعات تکثیر شده فراوان با وزنهای مولکولی متفاوت نشان می‌دهد که آغازگرهای RAPD جایگاههای زیادی را جهت اتصال به ژنوم پیدا کرده‌اند و دامنه تفاوت وزن مولکولی قطعات بیانگر توزیع جایگاه RAPD در طول ژنوم می‌باشد. تحقیقات بودراکو و پیترات (۵) و لوپز–سز و همکاران (۱۰) نیز این نکته را تائید می‌کند. خوشه بندی صورت پذیرفته در این بررسی توانست گروههای طالبی و خربزه را تا حدودی از یکدیگر جدا کند، ولی فاصله کم آنها با یکدیگر نشان می‌دهد ژنوم واریته های بوتانیکی ملونها (*Cucumis melo* L.) علی رغم تفاوت زیاد در شکل ظاهری، بسیار به هم نزدیک است. لوپز–سز و همکاران (۱۰) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی در اسپانیا با وجود استفاده از ٤۹ آغازگر نتوانستند واریته‌های بوتانیکی خربزه را به صورت کامل از یکدیگر تفکیک نمایند. در مطالعه سیلبسترین و همکاران (۱۵) واریته های طالبی و خربزه علی رغم تفاوتهای زیاد ظاهری، در تجزیه مولکولی به طور کامل از یکدیگر تفکیک نشدند. علاوه بر این نشانگر RAPD توده‌ها را بر اساس محل کاشت مطابق یک روال منطقی تفکیک ننموده است. لوپز–سز و همکاران (۱۰) نیز نتوانستند توده‌های بومی اسپانیا را بر اساس روال منطقی و مطابق منطقه

www.SID.ir

Archive of SID

کاشت از هم تفکیک کنند. بنابراین می‌توان گفت که جغرافیای منطقه کشت تأثیر قابل توجهی بر ژنتیک این محصول ندارد و ظاهر متنوع این محصول مربوط به تفاوت در ژنهای تنظیمی در مناطق کوچکی از ژنوم می‌باشد که بهتر است با نشانگرهای دقیق تری مطالعه شود. درصد بالای چند شکلی در این آزمایش را می‌توان به دلیل وارد شدن یک توده از گونه *C. sativus* داخل نمونه‌های مورد بررسی دانست، طوری که میزان چند شکلی داخل گونه *C. melo* به تنهایی ٤٠ درصد بود. همچنین انتخاب آغازگرها، از بین تعداد زیادی آغازگر بررسی شده به طور تصادفی نیز می‌تواند دلیل این ادعا باشد، به طوری که در تحقیقی که توسط رزمی و همکاران (۱) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD بر روی ۲۰ توده خربزه صورت گرفت، میزان چندشکلی ٦٤ درصد بود. هدف از تجزیه کلاستر، گروه‌بندی افراد مورد مطالعه بر اساس تشابه یا تفاوتهایشان می‌باشد. افرادی که در یک گروه قرار می‌گیرند از نظر ژنتیکی مشابه بوده و افرادی که در دو طرف دندروگرام گروه بندی قرار می‌گیرند دارای اختلاف و تفاوت زیادی هستند. با توجه به اینکه میزان تشابه از بالا به پایین کلاستر کاهش می‌یابد، لذا افراد دورتر با داشتن چند شکلی بالا تفاوت بیشتری از نظر مولکولی خواهند داشت و از طرف دیگر امکان دورگ گیری بین ارقام با بیشترین تفاوت ژنتیکی، امکان ایجاد هتروزیس بیشتر و یا امکان انتقال صفات نادر را خواهند داشت. لذا بر اساس اطلاعات حاصل از کلاستر داده‌های نشانگر RAPD و مورفولوژیکی و میزان تشابه آنها بر اساس جدول ماتریس تشابه و با علم بر اینکه تلاقی بین افراد موجود در یک گروه به دلیل شباهت زیاد آنها به هم بهتر است صورت نگیرد، جهت استفاده از تنوع موجود، می‌توان از تلاقی توده گرگه دیم (T5) با یکی از توده‌های موشی بم (C5)، چنبر (C2) و بهار (J18) با توجه به خصوصیات زراعی و مورفولوژیکی مطلوب آنها در برنامه‌های دورگ گیری و غیره استفاده نمود.

منابع

۱- رزمی، ش. (۱۳۸۵). بررسی تنوع ژنتیکی در برخی از توده های خربزه ایرانی با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی، پایان نامه کارشناسی ارشد گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، ۷۸ ص

۲- فیضیان، ا. (۱۳۸۳). جمع آوری بذرهای توده های بومی خربزه شمال و مرکز ایران و بررسی تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از مارکرهای مورفولوژیکی و مولکولی رپید. پایان نامه کارشناسی ارشد گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، ۸۳ص

۳- فیضیان، ا.، جلالی جواران، م.، دهقانی، ح. و زامیاد، ح. (۱۳۸٦). بررسی تنوع ژنتیکی برخی از توده‌های بومی خربزه‌ئیان (ملون‌ها) در ایران با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی RAPD. مجله علوم و فنون دانشگاه صنعتی اصفهان. ۱٦۳-۱۵۱: ٤١

٤- کوهپایگانی، ج.، کاشی، ع.، وزرایی، ع.، مظفری، ج. و آقایی، م. (۱۳۸۲). بررسی تنوع ژنتیکی بر اساس صفات میوه در برخی از توده های خربزه ایرانی. مجله علوم و فنون باغبانی ۸۲-۷۱: ۳

5- Baudracco-Arans, S. and M. Pitrat, (1996), A Genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) With RFLP, RAPD, Isozyme, disease resistance and morphological marker. Theoretical and Applied Genetics 93 (1-2): 57-64.

6- Dellaporta, S.L., J. Wood and J. Hicks, (1983), A plant DNA minipreparation. Plant Molecular Biology Report 1:19-21

7- Esquinas-Alcazar, J. and P. Gulick, (1983), Genetic Resources of Cucurbitaceae. IBPGR, Rome.

8- Kerje, T. and M. Grum, (2000), The origin of melon, *cucumis melo*: a review of the titreature. Acta Horticulture 510: 37-44.

9- Kirkbride, J. (1993), Biostematic monogreph of the genus cucumis (*Cucurbitaceae*). Parkway, North Carolina.

www.SID.ir

Archive of SID

10- Lopez-Sese, A.I., J. Staub and M.L. Gomez-Guillamon, (2003), Genetic analysis of Spanish melon (*Cucumis melo* L.) germplasm using a standardized molecular marker array and geographically diverse reference accessions. Theorethical and Applied Genetics 108:41-52.

11- Munger, H. and R. Robinson, (1991), Nomenclature of *Cucumis melo* L. Cucurbit Genetic Cooprative Report 14: 43-44

12- Naudin, C. (1859), Review des cucurbitaceae cultivares on Museum. Annals Science National Series 4 Botany 12: 79–164.

13- Pitrat, M., P. Hanelt and K. Hammer, (2000), Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon. Acta Horticulture 510: 29-36.

14- Sensory, S., S. Buyukalaca and K. Abak, (2007), Evalution of genetic diversity in Turkish melons (*Cucumis melo* L.) based on phenotypic characters and RAPD markers. Genetics Resource and Crop Evolution 54: 1351-1365.

15- Silberstein, L., I. Kovalski, R. Haung, K. Anagnostou, M. Jahn and R. Perl-Treves, (2003), Molecular variation in melon as revealed by RFLP and RAPD markers. Scientica Horticulturae 79: 101-111.

16- Staub, J., A. Lopez-Sease and N. Fanourakis, (2004), Diversity among melon landraces (*Cucumis melo* L.) from Greece and their genetic relationships with other melon germplasm of diverse origins. Euphytica 136: 151-166.

17- Weising, K., H. Nybon, K. Wolff and K. Gunter, (2005), DNA fingerprinting in plants, principle, methods, and applications. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton Florida, USA.

18- Williams, J., A.R. Kubliik, K.J. Livak, J. Rafalski and S.V. Tingey, (1990), DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 18: 5631-6535.

Using Morphological and Molecular Markeres aims to Assessment of the Genetic Diversity and Division Partiol of Germplasm of Iranian Melon

Salehi Najafabadi S.[1], Jalali Javaran M., and Dehghani H.

Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Study of the morphological characteristics and genetic diversity in plant inherited stores in order to classify the germplasm and preventing from genetic erosion is one of the basic and fundamental steps in the most breeding programs. This study aims to gather and identify the germplasm of *Cucumis melo* L. species from different areas of Iran and assessment of genetic diversity using morphological and molecular markers. Twenty one morphological traits were measured on 30 accession of *Cucumis melo* L. The cluster analysis of morphological data was down using UPGMA method and SPSS software. RAPD analysis was performed using 12 primers. Regimentation of accessiones, display 7 groups of separable of genetic in similarity of 82 percent. The polymorphism was determined 82 percent. Results showed that RAPD marker could slightly segregate the botanic variety of melon, and little genetic distance between them showed high similarity in this genomes.

Keywords: Melon, Germplasm, Genetic diversity, Morphological markers, Molecular markers.

www.SID.ir