

گزینش به کمک نشانگر SNP به منظور به نژادی صفت شیرینی میوه در طالبی

فاطمه رمضانی^۱، حسین رامشینی^{۲*}، محمود لطفی^۳، سید محمد مهدی مرتضویان^۲ و صفدر پورمبینی^۳
 ۱، ۲، ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و دانشجوی دکتری، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران، ایران
 (تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۶)

چکیده

این تحقیق باهدف به نژادی صفت شیرینی میوه در طالبی رقم ساوه انجام شد. برای این منظور تلاقی بین رقم ساوه با رقم گالیا انجام شد و نسل F₂ تشکیل شد. برای اندازه گیری شیرینی میوه طالبی در نسل والدین و نسل F₂ از دستگاه رفراکتومتر استفاده شد. در نسل F₂ ۴۲ گیاه از ۲۱۰۰ گیاه انتخاب و ارزیابی شد. همچنین سه نشانگر SNP مرتبط با شیرینی میوه در جمعیت F₂ با روش HRM با کمک دستگاه ریل تایم پی سی آر تعیین ژنوتیپ گردید. از بین سه نشانگر SNP یکی از آنها (SIE1) بین والدین چندشکلی نشان داد و رقم گالیا و ساوه به ترتیب دارای ژنوتیپ A₁A₁ و A₂A₂ بودند. پس از تعیین ژنوتیپ به ترتیب ۱۳، ۲۳ و ۶ گیاه برای سه ژنوتیپ A₁A₁، A₁A₂ و A₂A₂ به دست آمد. تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی نامتعادل نشان داد این سه گروه از نظر میزان قند، تفاوت معنی داری داشتند. میانگین میزان قند در واحد بریکس (%) برای سه ژنوتیپ A₁A₁، A₁A₂ و A₂A₂ به ترتیب ۱۱/۷۵، ۱۰/۸۵ و ۶/۶۸ به دست آمد. مقایسه میانگین با روش دانکن نشان داد تفاوت این میانگین ها در سطح احتمال p < ۰/۰۱ معنی دار بود. این نتایج نشان می دهد نشانگر SIE1-HRM به خوبی می تواند گیاهانی را گزینش کند که میزان قند آنها نسبت به والد ساوه بیشتر است.

واژه های کلیدی: روش HRM، ریل تایم پی سی آر، ساوه، گالیا.

SNP marker assisted selection for improving the sugar content in the cantaloupe

Fatemeh Ramezani¹, Hossein Ramshini^{2*}, Mahmoud Lotfi², Seyed Mohammad Mahdi Mortazavian²
and Safdar Pour-Mombeini³

1, 2, 3. M. Sc. Student, Associate Professor and Ph. D. Candidate, Abu Raihan Campus, Univesrity of Tehran, Tehran, Iran
(Received: Nov. 18, 2018 - Accepted: Feb. 15, 2019)

ABSTRACT

This research was carried out with the aim of improving fruit sugar content in cantaloupe, accession Saveh. The 'Saveh' was crossed with 'Galia' and the F₂ population was generated. The sugar content in fruits of parental generations and F₂ population was measured using a refractometer. In F₂ population 42 plants out of 2100 plants were selected and evaluated. HRM technique was used to determine the genotype of three candidate SNP markers which previously had been reported strongly associated with sugar content in fruit. The HRM analysis was carried out using Real Time PCR. Among the three SNP markers, one of them (SIE1-HRM) showed polymorphism. 'Galia' and 'Saveh' genotypes had A₁A₁ and A₂A₂ genotypes, respectively. After determining the genotypes, 13, 23 and 6 plants were obtained for three genotypes of A₁A₁, A₁A₂ and A₂A₂, respectively. Unbalanced completely randomized design analysis of variance showed that these three groups had a significant difference in sugar content. The average of sugar content in brix unit (%) for A₁A₁, A₁A₂ and A₂A₂ genotypes was 11.75, 10.85 and 6.68, respectively. The mean comparison with Duncan's method showed that the difference of these average values was significant at the probability level of p < 0.01. These results indicate that the marker can well select the plants that have higher sugar content than the parent of Saveh.

Keywords: Galia, HRM method, Realtime PCR, Saveh.

* Corresponding author E-mail: ramshini_h@ut.ac.ir

مقدمه

طالبی (*Cucumis melo* L.; Cucurbitaceae) یکی از محصولات جالیزی پرطرفدار و اقتصادی در جهان محسوب می‌شود. این گیاه یک محصول مهم باغبانی در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری است، اما به‌صورت گسترده در کشورهای مناطق معتدله نیز رشد می‌کند (Oumouloud *et al.*, 2013). طبق آمار سازمان خواروبار جهانی در سال ۲۰۱۶، تولید جهانی طالبی و خربزه بیش از ۴۷ میلیون تن بوده است و ایران با بیش از ۱ میلیون و ۶۰۰ هزار تن پس از چین و ترکیه، رتبه سوم جهان را به‌خود اختصاص داده است (www.fao.org). کشاورزان در ایران به‌طور عمده از بذر توده‌های محلی فاقد کیفیت لازم و یا رقم‌های خارجی جهت کشت طالبی استفاده می‌نمایند. با ورود رقم‌های خارجی به کشور، ضمن ایجاد وابستگی و خروج مبالغ قابل ملاحظه ارز از کشور، زمینه بیکاری برای تولیدکنندگان بذر در داخل و افزایش قیمت بذر برای کشاورزان فراهم می‌گردد. لذا ضروریست تمهیداتی اندیشیده شود تا کیفیت و یکنواختی در صفات زراعی و تجاری توده‌های داخلی افزایش یافته و با معرفی رقم‌های جدید، نیاز جامعه کشاورزی تأمین شود (Sobhani & Hamidi, 2015).

محتوای قند، رنگ و بافت گوشت و صفات ظاهری شامل شکل، رنگ پوست، شبکه‌بندی پوست و خط‌دار بودن از جمله اجزای مهم کیفیت میوه است. مطالعات زیادی برای ترکیبات عطری، انباشتگی قند و غیره در رقم‌های مختلف بر طبق رشد میوه و اثرات محیطی انجام شده است (Pitrat, 2008). در این میان، میزان قند در گوشت میوه از مهم‌ترین فاکتورهای تعیین کیفیت میوه در طالبی می‌باشد. فاکتورهای محیطی و ژنتیکی، هر دو بر محتوای قندی میوه طالبی تأثیرگذار می‌باشند. نتایج تحقیقات نشان داده است صفت تجمع قند توارث‌پذیری بالایی دارد و تفاوت بین ژنوتیپ با قند بالا و پایین توسط ژن‌ها تعیین می‌شود (Burger *et al.*, 2002). میزان قند میوه غالباً مترادف با مواد جامد محلول در نظر گرفته می‌شود و میزان بالای مواد جامد محلول معادل شیرینی بیشتر میوه است

(Baldwin *et al.*, 2002). در ملون‌ها نه تنها این پارامتر با شیرینی همبستگی مثبتی دارد، بلکه با طعم میوه نیز همبستگی نشان می‌دهد (Albuquerque *et al.*, 2006). لذا این صفت مهم‌ترین شاخص کیفیت میوه نیز محسوب می‌شود (Raghani *et al.*, 2016). از بهترین و سریع‌ترین روش‌های اندازه‌گیری میزان قند میوه استفاده از دستگاه رفراکتومتر (فام‌نگار) می‌باشد.

رقم‌های جدید، به‌صورت مصنوعی به‌دست‌آمده و حاصل تلاقی‌های کنترل‌شده و اصلاحی است (Yari, 2005). جهت اصلاح طالبی، روش‌های کلاسیک همچون روش شجره‌ای قابل استفاده می‌باشد (Pitrat, 2008). امروزه نشانگرهای مولکولی به‌عنوان ابزاری کارآمد نقش مهمی در روند اصلاح نباتات داشته و در ارزیابی تنوع ژنتیکی، شناسایی نواحی ژنومی کنترل‌کننده صفات کمی (QTL) و گزینش به کمک نشانگر کاربرد زیادی دارند (MirDrikvand, 2016; Kaviani Charati *et al.*, 2016). پیش از این تعدادی SNP مرتبط با قند گوشت میوه در طالبی شناسایی شده است. در یک تحقیق جامع مجموعه‌ای از ۱۷۵ توده طالبی از ۵۰ نقاط مختلف دنیا جهت مطالعه تغییرپذیری فنوتیپی برای وضعیت رسیدگی و تجمع قند انتخاب شده بود. تنوع چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی‌ها (SNPs) در ۵۳ ژن کاندید انتخابی شامل ژن‌های مرتبط با تجمع قند و مراحل رسیدگی و هم‌چنین تنوع شکل میوه مطالعه شد. تغییرپذیری ژن‌های کاندید برای ویژگی‌های مرتبط با قند زیاد بود. رابطه‌ای مستحکم بین ساختار ژنتیکی و تنوع فنوتیپی یافت شد. به این ترتیب اختلافات در تنوع آلی SNP‌ها در داخل گروه‌های گوناگون با خصوصیات فنوتیپی ویژه مطالعه شده است. در این مطالعه تنوع مهمی در فنوتیپ و ژن‌های کاندید برای تجمع قند و وضعیت رسیدگی در میوه طالبی یافت شد. در پایان، به‌وسیله تجزیه ارتباطی، چندین نشانگر SNP مرتبط با شیرینی در طالبی شناسایی شد (Leida *et al.*, 2015). از آنجاکه این نشانگرها SNP است می‌توان با آنالیز HRM آن‌ها را تعیین ژنوتیپ کرد. از جمله ابزارهای بیوتکنولوژی برای اصلاح کارآمد و نوین، استفاده از دستگاه ریل تایم پی‌سی‌آر به‌همراه آنالیز HRM می‌باشد (Perpiñá *et al.*, 2016). که از آن به‌عنوان ابزاری سریع، ساده و

(Bahrami Sirmandi *et al.*, 2013). رقم گالیا که جزء گروه Reticulatus می‌باشد، رقمی خارجی، خوش‌بو و شیرین است (Pitrat, 2008). مسئله مهم این است که میوه طالبی ساوه شیرینی متوسط تا کم دارد و به دلیل اهمیت این توده بومی در ایران، افزایش کمیت و کیفیت میوه آن ضروری به نظر می‌رسد، در مقابل آن رقم گالیا برای بو و مزه بسیار خوبی که دارد، شناخته شده است (Aharoni *et al.*, 1993). بهترین مزه و بوی مورد پسند آن زمانی است که آن‌ها با رنگ زرد روشن (با نواحی کمی سبز) چیده می‌شوند و می‌توان برای مدت طولانی با حفظ کیفیت، آن‌ها را ذخیره و انبار کرد. مزه و بوی رقم گالیا می‌تواند برای اصلاح‌گران ابزاری در جهت بهبود کیفیت حسی و همچنین شیرینی باشد (Fallik *et al.*, 2001). هدف از این پژوهش، اصلاح شیرینی میوه در توده طالبی ساوه به کمک تلاقی آن با رقم گالیا می‌باشد. برای انجام کارآمدتر این برنامه اصلاحی از گزینش به کمک نشانگر SNP نیز استفاده شد. این برنامه اصلاحی به صورت شجره‌ای پیش خواهد رفت و لینه‌هایی تولید خواهند شد که ویژگی‌های فنوتیپی مطلوب توده ساوه مانند پوست مشبک و خطدار، گوشت سبز رنگ و آبدار، سازگاری به محیط و آب‌وهوای ایران به‌همراه میزان قند بالا از رقم گالیا را داشته باشند. امید است با ادامه این مراحل در نسل‌های آینده و سپس خودگشتی و خالص‌سازی بذر گیاهان دارای میوه‌های شیرین، طالبی ساوه اصلاح‌شده برای شیرینی را معرفی کرد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از طالبی ساوه و رقم گالیا و نسل F₂ آنها استفاده شد. توده بومی طالبی ساوه دارای میوه گرد تا کمی کشیده، پوست مشبک و آبدار با راه‌راه سبز و گوشت میوه سبز با شیرینی متوسط تا کم می‌باشد (Bahrami Sirmandi *et al.*, 2013). رقم گالیا، رقمی خارجی دارای میوه‌هایی گرد با پوستی شبکه‌بندی شده و گوشتی اغلب سفید تا سبز، خوش‌بو و شیرین است (Pitrat., 2008). تصاویر میوه و بوته این دو ژنوتیپ در شکل ۱ نمایش داده شده است.

حساس جهت ردیابی ژن‌ها با کم‌ترین زمان، می‌توان نام برد. شکل منحنی HRM برای توالی‌های متفاوت DNA، متغیر است و حتی می‌توانند قطعاتی که حداقل در یک جفت باز متفاوتند را از یکدیگر تفکیک کند (Taylor, 2009). روش آنالیز HRM نوعی روش لوله دربسته (closed-tube) است که خطر آلودگی محصولات PCR را به میزان زیادی کاهش می‌دهد. این روش غیرمخرب است و می‌توان محصولات واکنش HRM را بدون هیچ تکثیر و خالص‌سازی اضافی، مستقیماً تعیین توالی نمود (Liew *et al.*, 2004; Kristensen *et al.*, 2008) از سویی دیگر، خطرات زیست محیطی مواد به کاررفته در روش ژل الکتروفورز (مانند اتیدیوم بروماید)، در استفاده تکنیک HRM وجود ندارد. در HRM اساس کار پیدا کردن تفاوت‌ها در یک توالی اسیدنوکلئیکی و یا به عبارتی تعیین ژنوتیپ است (Diba Zar *et al.*, 2014). از این فن‌آوری تاکنون برای تعیین ژنوتیپ SNP در تعدادی از گیاهان استفاده شده است (Wu *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2011; Khu & Monteros, 2012). در ژنوتیپ تتراپلوئید دگرگرده‌افشان یونجه از سیستم آنالیز HRM برای تعیین ژنوتیپ SNP و نقشه‌یابی استفاده شد. حساسیت و سودمندی این تکنولوژی به‌وسیله تشخیص ژنوتیپ والدینی و نسل‌های درحال تفکیک در ۶ جمعیت یونجه براساس منحنی ذوب بی‌همتا ناشی از تفاوت در ترکیب آلی در یک یا چند مکان ژنی، اثبات شد. روش برنامه HRM شامل کشف اختلافات، آنالیز ژن‌های کاندید و غیره در برنامه‌های اصلاحی کاربرد دارد (Han *et al.*, 2012). در برنامه‌های اصلاحی با روش تلاقی برگشتی از رقمی فرانسوی به عنوان والد پذیرنده و رقم ژاپنی به عنوان والد بخشنده استفاده شد. جهت افزایش سرعت برنامه اصلاحی از ابزار بیوتکنولوژی آنالیز HRM جهت شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPها) استفاده شد. در پایان، رقم جدید طالبی، حاوی ویژگی‌های مورد نظر، معرفی شد (Perpiñá *et al.*, 2016).

گونه Melo دارای گروه‌های گیاهشناسی مختلفی است. طالبی ساوه، متعلق به گروه Cantalupensis یکی از توده‌های بومی متداول کشور ایران می‌باشد



شکل ۱. A) تصاویر بوته و میوه طالبی گالیا. B) تصاویر بوته و میوه طالبی ساوه
Figure 1. A) Plant and fruit shape of melon in 'Galia'. B) Plant and fruit shape of melon in 'Saveh'

بیماری‌ها (با ارزیابی فنوتیپی و چشمی) شناسایی و گزینش شدند.

اندازه‌گیری میزان قند میوه

میزان قند (TSS)^۱ میوه‌های گیاهان والدی و نسل F₂ با دستگاه رفاکتومتر اندازه‌گیری شد. برای این منظور چند قطره از آب میوه روی منشور ریخته شده و سپس با تنظیم عدسی شیئی میزان قند قرائت شد. آب میوه از قسمت میانی میوه نمونه‌گیری شد. میزان قند براساس بریکس (/) است.

یادداشت‌برداری و اندازه‌گیری صفات مربوط به میوه
از آنجاکه هدف از این پژوهش، اصلاح شیرینی میوه در توده طالبی ساوه بود، بنابراین باید در نسل در حال تفرق گیاهانی با ویژگی‌های مطلوب توده ساوه مانند پوست مشبک و خطدار، طول، عرض و وزن میوه مناسب با توجه به والد ساوه و همچنین گوشت سبز رنگ و آبدار گزینش شوند. همچنین زودرسی از صفات مهم مورد بررسی بود. برای این منظور نخست تاریخ برداشت ثبت شد. سپس صفات مرتبط با میوه ارزیابی شده و میوه با ترازو وزن شد. پس از آن به صورت مقطع طولی برش داده شد و طول، عرض، ضخامت گوشت و قطر حفره بذری اندازه‌گیری شد. بررسی

تلاقی والدین و تولید نسل F₂

این تحقیق در گلخانه‌ها و مزارع واقع در شهرستان پاکدشت با مختصات طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۴۱ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۲۸ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۰۲۹ متر از سطح دریا انجام و برای تولید نسل‌های در حال تفرق از روش اصلاحی شجره‌ای استفاده شد. در بهار سال ۱۳۹۶ ابتدا نشاکاری بذر در گلخانه انجام و سپس نشاهای والدی به مزرعه منتقل شدند. بوته‌های والدی با فاصله بین ردیف ۱/۵ متر و فاصله روی ردیف ۷۰ سانتی‌متر کشت و از روش آبیاری قطره‌ای با نوار برای آبیاری استفاده شد. رقم خارجی گالیا با شیرینی بالا به عنوان والد مادری با توده بومی ساوه با شیرینی متوسط تا کم به عنوان والد پدری در بهار ۹۶ تلاقی داده شد و F₁ به‌دست آمد. در پاییز همان سال در گلخانه گیاهان F₁ کاشته و خودگشن شدند و F₂ به‌دست آمد. در بهار سال ۱۳۹۷ نشاکاری بذر نسل F₂ در گلخانه انجام و سپس نشاها به مزرعه واقع در روستای فیلیستان، شهرستان پاکدشت منتقل شدند. در مجموع در نسل F₂ تعداد ۴۲ گیاه انتخاب و ارزیابی شد. این ۴۲ گیاه در مرحله رویشی از بین ۲۱۰۰ گیاه انتخاب شد. بسیاری از این ۲۱۰۰ گیاه به‌دلیل آلودگی ویروسی و قارچی انتخاب نشدند. بنابراین در مرحله رویشی گیاهان کاملاً عاری از نشانه‌های ویروس و آثار

1. Total soluble solid

مرتبط با قند میوه (ژن‌های کاندید *CMPSNP711*، *SIERF3* و *SIERF1*) (Leida et al., 2015). آغازگر مناسب با کمک نرم‌افزار Primer3 طراحی و تهیه شد (جدول ۱). با کمک آنالیز HRM تفاوت میان ژنوتیپ‌هایی با میزان قند مختلف تعیین گردید. طبق گزارش قبلی این سه ژن با میزان قند ارتباط معنی‌دار و قوی نشان داده است (Leida et al., 2015).

برای انجام روش HRM از دستگاه ریل تایم پی‌سی‌آر LightCycler® 96 System (Roche, Germany) استفاده شد. واکنش پی‌سی‌آر برای این منظور در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش دارای ۴ میکرولیتر از مستر میکس HiFi HRM (شرکت فارابین)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۱۳ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر DNA الگو (با غلظت ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر) بود. چرخه دمایی به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه جهت فعال‌سازی آنزیم بود. سپس ۴۰ بار چرخه زیر تکرار شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه. در نهایت واکنش HRM طبق پیش‌فرض دستگاه، بدون خارج‌سازی نمونه‌ها انجام شد. محصولات پی‌سی‌آر بدون خارج‌سازی از دستگاه با استفاده از مقایسه منحنی‌های ذوب هر نمونه بررسی شدند. برای تأیید وجود چندشکلی در نشانگر SNP در پایان با توجه به منحنی‌ها، چند قطعه تکثیرشده حاصل برای توالی‌یابی انتخاب شد. توالی‌یابی توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام گرفت. توالی‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار BioEdit بررسی شده و SNP موجود بین توالی رقم گالیا (با میوه شیرین) و رقم ساوه (دارای میوه‌های با شیرینی کم) شناسایی شد.

صفات رنگ پوست، رنگ گوشت و خط‌دار بودن پوست میوه به‌صورت مشاهده‌ای انجام شد. به این ترتیب براساس مشاهدات به دست آمده، صفت رنگ پوست میوه به سه گروه کرم رنگ، زرد و سبز با نواحی زرد و صفت رنگ گوشت میوه به سه گروه سبز، سفید با نواحی سبز و سفید مایل به زرد طبقه‌بندی شدند. برای هر رنگ تعداد میوه‌های آن رنگ شمارش و گزارش شد. در خصوص صفت خط‌دار بودن پوست میوه نیز میوه‌ها به دو گروه پوست دارای خط و پوست بدون خط گروه‌بندی شده و تعداد میوه‌های هر گروه شمارش و یادداشت شد. برای بررسی صفات سفتی میوه و سفتی گوشت از مقیاس رتبه‌ای استفاده شد. بر این اساس ابتدا میوه بین دو دست قرار گرفت و میزان سفتی آن سنجیده شد. برای میوه‌های سفت (Firm) عدد یک، میوه با سفتی متوسط (Medium) عدد دو و میوه نرم (Soft) عدد سه در نظر گرفته شد. در پایان تعداد میوه‌ها در هر دسته شمارش و گزارش شد. با خوردن بخشی از بافت میوه که از وسط میوه برش خورده بود، میزان سفتی گوشت میوه سنجیده و بر این اساس سفتی گوشت میوه نیز در سه رتبه یک (گوشت میوه سفت (Firm))، دو (گوشت میوه متوسط (Medium)) و سه (گوشت میوه نرم (Soft)) رتبه‌بندی شد. در پایان تعداد میوه‌ها در هر رتبه شمارش و ذکر شد.

تعیین ژنوتیپ گیاهان با نشانگر SNP

جهت تأیید حضور و بررسی وجود چندشکلی در ژن‌های کاندید مرتبط با شیرینی در گیاهان، در مرحله ۲-۳ برگی نمونه‌برداری از برگ گیاهان والدی، نسل اول و نسل دوم و استخراج DNA با روش CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Murray & Thompson, 1980) انجام شد. برای SNP‌های از پیش شناسایی شده

جدول ۱. آغازگرهای طراحی شده برای انجام روش HRM

Table 1. Primers designed to perform the HRM method

Candidate gene	Primer name	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)
<i>CMPSNP711</i>	CMP-HRM	CCGAGAAGCAGACGGGTTAC ACTGAACTACTATGGTTTTGCTCT	61
<i>SIERF3</i>	RF3-HRM	CGGGACCCCACTGATTTTGA CTGGACCACCGCCTTTACAC	61
<i>SIERF1</i>	SIE1-HRM	TCGAAACGGCTGAAGATGCT CCATACAGCAACGGTGGAGT	61

نتایج و بحث

تعیین ژنوتیپ گیاهان نسل F_1 و F_2 با روش HRMژن *CMPSNP711*

با توجه به آغازگر (CMP-HRM) طراحی شده برای آنالیز HRM، گیاهان نسل والدی، F_1 ، F_2 از نظر این ژن کاندید مرتبط با شیرینی فاقد چندشکلی بودند و این نتیجه حاصل شد که تفاوت شیرینی در این گیاهان به علت تفاوت در این ژن نبوده است. به دلیل عدم وجود تنوع در خصوص این ژن، نسبت ژنی در نسل دوم برای آن خواهد بود.

ژن *SIERF3*

با توجه به آغازگر (RF3-HRM) طراحی شده برای آنالیز HRM گیاهان نسل والدی، F_1 ، F_2 از نظر این ژن کاندید مرتبط با شیرینی فاقد چندشکلی بودند و این نتیجه حاصل شد که تفاوت شیرینی در این گیاهان به علت تفاوت در این ژن نبوده است. به دلیل عدم وجود تنوع در خصوص این ژن، نسبت ژنی در نسل F_2 برای آن خواهد بود.

ژن *SIERF1*

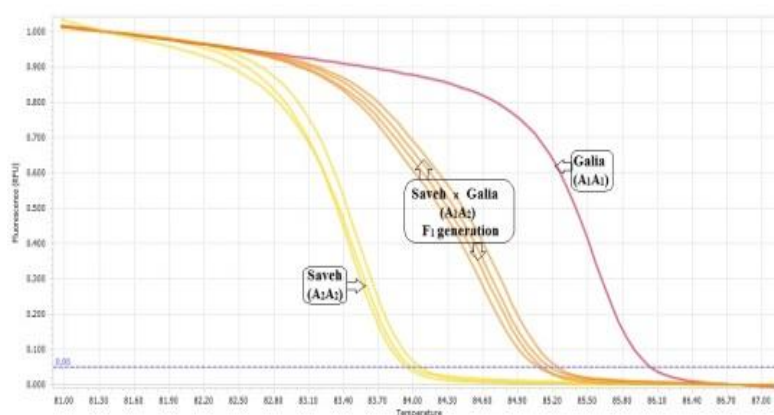
برای ژن *SIERF1* دو آلل (A_1 و A_2) دیده شد. ژنوتیپ گالیا A_1A_1 و ژنوتیپ ساوه A_2A_2 بودند. نسل F_2 نیز تفرق نشان داده و هر سه ژنوتیپ A_1A_1 ، A_2A_2 و A_1A_2 دیده شد. با توجه به آغازگر SIERF1-HRM

طراحی شده برای آنالیز HRM همه گیاهان نسل F_1 از نظر این ژن کاندید مرتبط با شیرینی هتروزیگوت (A_1A_2) بودند (شکل ۲).

در خصوص گیاهان نسل F_2 از نظر این ژن کاندید مرتبط با شیرینی سه ژنوتیپ خالص شیرین (A_1A_1)، هتروزیگوت (A_1A_2)، خالص دارای شیرینی کم (A_2A_2) به دست آمد (شکل ۳). در این نسل میزان قند میوه با دستگاه رفاکتومتر نیز اندازه‌گیری شد و ارتباط بین ژنوتیپ به دست آمده و میزان قند نیز مورد بررسی قرار گرفت.

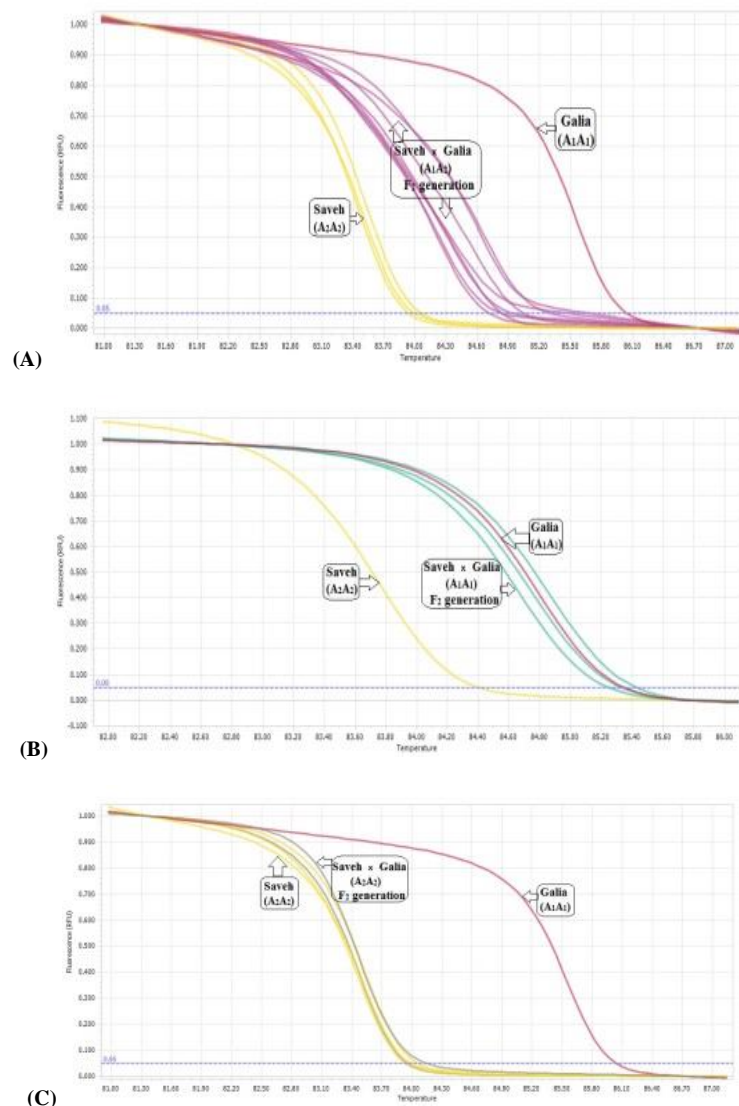
ارتباط بین ژن *SIERF1* و میزان قند

میزان قند میوه در ۴۸ گیاه با دستگاه رفاکتومتر اندازه‌گیری شد. این گیاهان شامل نسل والدی رقم گالیا (۱ گیاه)، توده بومی ساوه (۵ گیاه) و نسل F_2 (۴۲ گیاه) حاصل از تلاقی این والدین بودند. به منظور پیدا کردن ارتباط بین این مکان ژنی و میزان قند تجزیه واریانس انجام شد. به این ترتیب که کل ۴۸ گیاه از نظر این مکان ژنی با روش HRM تعیین ژنوتیپ شدند. سه ژنوتیپ گوناگون به عنوان تیمار در نظر گرفته شد و تجزیه واریانس به صورت طرح کاملاً تصادفی نامتعادل انجام گرفت. جدول ۲ نتیجه این تجزیه را نشان می‌دهد. همان‌گونه که از نتایج این جدول مشخص می‌شود تفاوت بین سه ژنوتیپ از نظر مقدار قند میوه در سطح یک درصد معنی‌دار است.



شکل ۲. منحنی تغییرات در فلئورسنس به ازای تغییر در دما در ژنوتیپ‌های گالیا، ساوه و ۴ عدد از F_1 آن‌ها با آغازگر SIE1-HRM. تفاوت الگوی منحنی در ژنوتیپ‌ها کاملاً آشکار است.

Figure 2. Changes in fluorescence curve for temperature change in the genotypes of Galia, Saveh and 4 of their F_1 with SIE1-HRM primer. The difference in curve pattern in the genotypes is quite obvious.



شکل ۳. منحنی تغییرات در فلئورسنس به‌زای تغییر در دما در ژنوتیپ‌های ژنوتیپ گالیا، ساوه و ۱۳ عدد از F_2 آن‌ها با آغازگر SIE1-HRM (A) گیاهان هتروزایگوت (A_1A_2) در نسل F_2 ، (B) گیاهان هموزیگوت شیرین (A_1A_1) در نسل F_2 و (C) گیاهان هموزیگوت دارای شیرینی کم (A_2A_2) در نسل F_2 . در همه شکل‌ها نمودار مربوط به رقم ساوه و گالیا به عنوان شاهد نمایش داده شده است.
Figure 3. Changes in fluorescence curve for temperature change in the genotypes of Galia, Saveh and 13 of their F_2 with (SIE1-HRM) primer. (A- Heterozygote (A_1A_2) plants in F_2 population), (B- Sweet Hemozygote (A_1A_1) in F_2 population) and (C- Hemozygote with low sweetness (A_2A_2) in F_2 population). In all graphs the curve obtained from Galia and Saveh genotypes are presented as control.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس مقدار قند میوه طالبی بین سه ژنوتیپ A_1A_1 ، A_2A_2 و A_1A_2

سطح احتمال ۰/۰۱ انجام شد (شکل ۴). میانگین میزان قند برای سه ژنوتیپ A_1A_1 ، A_1A_2 و A_2A_2 به ترتیب ۱۱/۷۵، ۱۰/۸۵ و ۶/۶۸ به دست آمد. دامنه میزان قند گیاهان A_1A_1 از ۸/۵ تا ۱۴ متغیر بود، درحالی‌که دامنه میزان قند در گیاهان A_2A_2 بین ۴ تا ۱۰ بود. به این ترتیب مشخص شد عمل ژن در این مکان ژنی به صورت غالبیت کامل بود که در آن آلل A_1 بر آلل A_2 غلبه داشت، زیرا بین دو ژنوتیپ A_1A_1 و

Table 2. The results of analysis of variance of fruit sugar content of melon between the three genotypes (A_1A_1 , A_2A_2 & A_1A_2)

SOV	df	SS	MS	P-value
Genotype	2	179.3	89.7**	p<0.01
Error	45	155.22	3.45	

** تفاوت بین سه ژنوتیپ از نظر میزان قند (بریکس) بسیار معنی‌دار است.

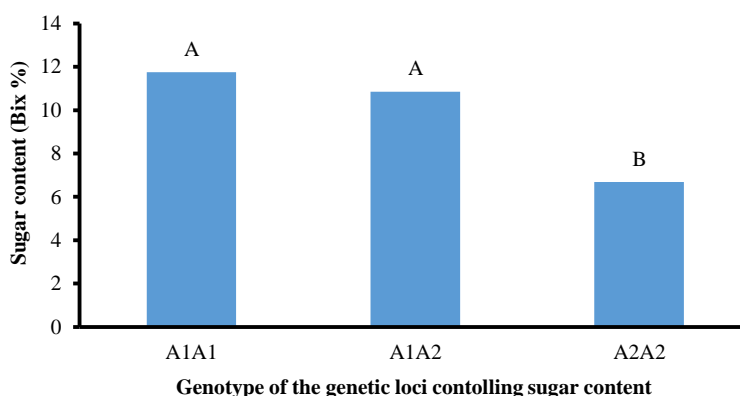
مقایسه میانگین این سه ژنوتیپ با روش دانکن در

قطعه تکثیر شده حاصل برای توالی‌یابی انتخاب شدند. توالی‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار BioEdit بررسی شده و SNP موجود بین توالی گیاه با میوه شیرین (گالیا) و گیاه دارای میوه با شیرینی کم (ساوه) شناسایی شد. ناحیه‌ای از توالی به طول ۱۶۵ جفت باز شناسایی که در آن تفاوت بین ژنوتیپ شیرین و دارای شیرینی کم یک نوکلئوتید بود (شکل ۵). در آلل رقم گالیا (شیرین) در این نقطه جفت باز GC و در آلل توده ساوه (دارای شیرینی کم) در این نقطه جفت باز AT وجود دارد.

A₁A₂ از نظر میزان قند تفاوت معنی‌داری دیده نشد. مقدار اثر افزایشی در این مکان ژنی ۲/۵۳ برآورد شد. بنابراین گزینش ژنوتیپ‌های A₁A₁ در نسل‌های در حال تفرق موجب بهبود حدود ۵ واحد افزایش در میزان قند به‌طور متوسط نسبت به میانگین میزان قند در توده ایرانی خواهد شد، که قابل توجه است.

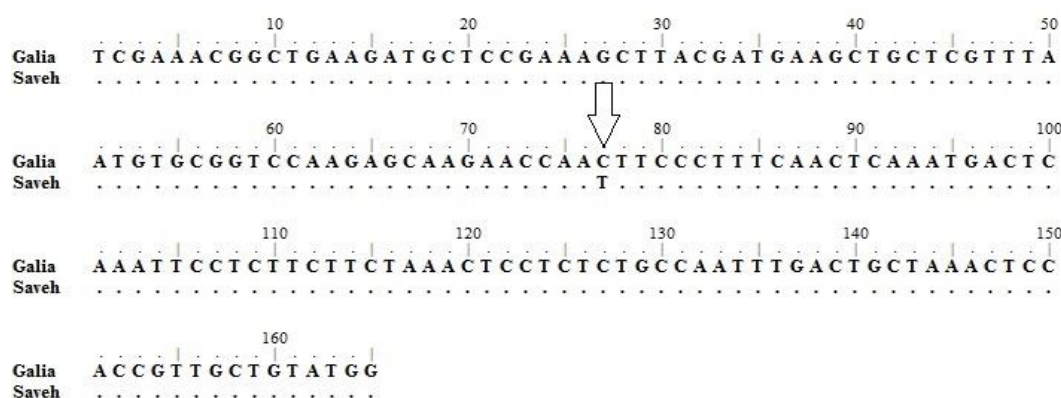
توالی‌یابی

همان‌گونه که ذکر شد، برای تأیید نشانگر SNP (SIE1-HRM) در پایان با توجه به منحنی‌ها، چند



شکل ۴. مقایسه میانگین میزان قند طالبی در سه ژنوتیپ ارزیابی شده از نسل والدین و نسل F₂ (حروف بالای هر ستون نشان می‌دهد ستون‌های دارای حروف متفاوت در سطح احتمال ۰/۰۱ نسبت به هم از نظر میزان قند تفاوت معنی‌دار دارند).

Figure 4. Comparison mean of the sugar content of melon in three genotypes evaluated from parental and F₂ generation (The letters above the column indicate that columns with different letters at the probability level of 0.01 there is a significant difference in sugar content)



شکل ۵. توالی بخشی از ژن *SIERF1* در دو ژنوتیپ طالبی گالیا و ساوه. در این محدوده یک SNP وجود دارد. این محدوده توسط آغازگر SIE1-HRM تکثیر شد که طولی برابر ۱۶۵ جفت باز داشت. به دلیل وجود SNP الگوی منحنی ذوب در افراد شیرین هموزیگوت، شیرین هتروزیگوت و هموزیگوت دارای شیرینی کم متفاوت خواهد بود که از این روش می‌توان به ژنوتیپ فرد پی برد.

Figure 5. The selected part of *SIERF1* sequence in two melon genotypes of 'Galia' and 'Saveh'. In this part of the gene, there is one SNP. This fragment with the length of 165 bp was amplified by HRM-SIE1 primer. Due to existence of SNP, the pattern of melting curve among sweet hemozygote, Sweet heterozygote and hemozygote with low sweetness would be different. This feature was used for genotyping of different genotypes.

به شرایط آب‌وهوایی کشور ایران مناسب نیست. نکته مهم دیگر این است که گالیا، رقم هیبرید خارجی است و علاوه بر ظاهر میوه متفاوت با سلیقه بازار در ایران، بذر آن گران است و برای خرید آن ارز از کشور خارج و وابستگی خرید بذر از خارج برای کشاورز به وجود می‌آید (کشاورز باید هر ساله بذر رقم هیبرید را خریداری کند). پس تولید میوه طالبی با مشخصات فنوتیپی مطلوب توده ایرانی به همراه شیرینی رقم خارجی از نظر اقتصادی هم به صرفه است. با توجه به این که هدف از این پژوهش اصلاح رقمی است که مشخصات مطلوب رقم گالیا و توده ایرانی ساوه را به صورت نوترکیب و هم‌زمان داشته باشد، بنابراین در نسل F_2 گیاهانی گزینش شدند که علاوه بر دارا بودن آلل ژن شیرینی از رقم گالیا، مشخصات ظاهری مانند خطدار بودن پوست و رنگ گوشت سبز و غیره را از توده ساوه داشته باشند. نتایج حاصل از یادداشت برداری و اندازه‌گیری صفات مربوط به میوه در جدول‌های ۳، ۴ و ۵ ارائه شده است. با توجه به نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ برای نشانگر *SIERF1* و صفات مربوط به میوه بهترین ژنوتیپ‌ها برای ادامه برنامه اصلاحی گزینش شدند (جدول ۶).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری صفات وزن میوه، طول و عرض میوه، ضخامت گوشت، قطر حفره بذری و روز تا برداشت (از تاریخ ۵ فروردین) در نسل والدی گالیا و ساوه و جمعیت F_2 (میانگین، بیشترین و کمترین اعداد در نسل F_2) در جدول ۳ ارائه شده است. در نسل F_2 برای این صفات تفرق دیده شد، به طوریکه برای مثال برای صفتی مانند وزن میوه، میوه‌ای دارای وزن کم (۷۸۵ گرم) تا میوه‌ای دارای وزن نسبتاً زیاد (۳۰۶۱ گرم) مشاهده شد. از میان بوته‌های ارزیابی‌شده، بهترین میوه‌ها انتخاب شدند.

بنابراین در ژنوتیپ شیرین خالص که به صورت A_1A_1 بود همه قطعات تکثیر شده در PCR در این نقطه GC خواهند داشت. از طرفی در ژنوتیپ دارای شیرینی کم که به صورت A_2A_2 بود همه قطعات تکثیر شده در PCR دارای جفت باز AT در این نقطه هستند که منحنی ذوب مخصوص به خود را خواهند داشت و منحنی ذوب آن‌ها با منحنی ذوب ژنوتیپ شیرین متفاوت خواهد بود. در فرد هتروزیگوت یا هیبرید که هر دو آلل GC و AT وجود دارد به دلیل تشکیل هترودوبلکس‌ها و همودوبلکس‌ها در فرآیند ذوب، منحنی منحصر به فردی به دست می‌آید که از دو منحنی قبلی کاملاً قابل تمایز است. به این ترتیب هر کدام از سه ژنوتیپ را می‌توان با دقت بالا تعیین کرد.

در نقطه وجود این SNP، پیش از این چندین QTL که میزان قند میوه را کنترل می‌کنند، نقشه‌یابی شده است (Diaz et al., 2011). اما در یک پژوهش که با استفاده از تجزیه ارتباطی روی ۱۷۵ ژنوتیپ مختلف ملون از سراسر دنیا انجام شده، به صورت دقیق مشخص شده است که این نشانگر روی کروموزوم شماره ۳ قرار دارد و به تنهایی بیش از ۱۱ درصد تغییرات در میزان ساکارز را به خود اختصاص داده است (Leida et al., 2015). نشانگر *SIERF1* در واقع ارتولوگ ژن عامل پاسخ‌دهنده به اتیلن (ethylene responsive factor) در گیاه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) است. به نظر می‌رسد این ژن در رسیدگی میوه و تجمع قند نقش داشته باشد (Leida et al., 2015).

نتایج صفات مربوط به میوه

اگرچه رقم گالیا دارای مشخصات خوبی از جمله شیرینی بالا است، ولی از نظر ظاهر میوه و سازگاری

جدول ۳. نتایج اندازه‌گیری صفات مربوط به میوه طالبی (وزن، طول و عرض میوه، ضخامت گوشت، قطر حفره بذری و روز تا برداشت (از تاریخ ۵ فروردین)) در نسل والدی و جمعیت F_2

Table 3. Results of measurement of fruit related traits in melon (Weight, Length, Width, Flesh-width, Cavity & Maturity (From 5th of Farvardin)) in parental generation and F_2 population

Population	Weight (g)	Length (cm)	Width (cm)	Flesh-width (cm)	Cavity (cm)	Maturity (From 5 th of Farvardin)
Galia	1190	13	14	4	5	99
Saveh	1229.4	12.8	14.2	4.1	6.4	115
Mean of F_2 Population	1671.33	14.76	14.91	4.10	6.52	110.8
Min. of F_2 Population	785	11	10.5	2.7	4	92
Max. of F_2 Population	3061	20	18	5.5	9	117

نقل صدمه دیده و قابلیت نگهداری و بازارپسندی آنها کم می‌شود. همچنین پارامتر سفتی در تعیین زمان برداشت و بررسی مراحل نرم شدن محصول کشاورزی در جریان رسیدگی و انبارداری مؤثر می‌باشد (Yuneji *et al.*, 2010). نتایج حاصل از بررسی خطداربودن پوست، سفتی میوه و بافت گوشت در جدول ۵ گزارش شده است. خطداربودن پوست از مهم‌ترین صفات بازارپسندی این میوه است و به همین دلیل در انتخاب میوه‌ها این صفت در نظر گرفته شد. برای ماندگاری و انبارداری طولانی‌تر میوه باید سفت باشد. از سویی دیگر به علت استفاده از میوه طالبی برای مصارف آب‌میوه و فالوده باید بافت میوه نرم و آبدار باشد. بافت میوه گالیا اغلب سفت است و حتی در صورت نرم بودن، آبدار نیست. بنابراین برای انتخاب میوه به این نکات توجه شده است.

در پایان با توجه به هدف این پژوهش در نسل F₂ گیاهانی گزینش شدند که ژن شیرینی رقم گالیا و مشخصات ظاهری مانند مشبک و خطداربودن پوست، رنگ پوست، رنگ گوشت و غیره را از توده ساوه داشتند. برای مثال در جدول ۶ تعدادی از گیاهان گزینش‌شده ذکر شده است.

این گیاهان دارای رنگ گوشت سبز و رنگ پوست مشبک، خطدار و کرم‌رنگ، میوه سفت با گوشتی با بافت نرم و آبدار به‌همراه ژن شیرینی (به صورت خالص) از رقم گالیا بودند. نتایج به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری سایر صفات مربوط به میوه مانند وزن، طول و عرض میوه و غیره به‌همراه میزان مواد جامد محلول (میزان قند براساس بریکس (%)) در جدول ۶ ذکر شده است.

صفات ظاهری شامل رنگ پوست، رنگ گوشت و شبکه بندی پوست از جمله اجزای مهم کیفیت میوه است. (Pitrat, 2008). شبکه‌بندی و رنگ پوست طالبی از مهم‌ترین صفات بازارپسندی این میوه به شمار می‌رود (Suh *et al.*, 2012). با توجه به اهمیت این صفات ظاهری و از سوی دیگر بازارپسندی صفات مربوط به میوه در توده بومی ساوه، رنگ پوست و گوشت میوه‌های برداشت شده، بررسی شد. همه میوه‌های برداشت شده دارای پوست مشبک بودند. رنگ پوست رقم گالیا زرد و رنگ گوشت در میوه این گیاه سفید با نواحی سبز رنگ دیده شد (جدول ۴). در توده بومی ساوه رنگ پوست کرم رنگ و رنگ گوشت سبز بود. در نسل دوم برای هرکدام از صفات رنگ پوست (کرم رنگ، زرد و سبز با نواحی زرد) و رنگ گوشت (سبز، سفید با نواحی سبز و سفید مایل به زرد) سه رنگ مجزا مشاهده شد. در این میان با توجه به ظاهر مطلوب و بازارپسند توده ساوه، میوه‌های دارای رنگ پوست و رنگ گوشت مشابه ساوه گزینش شدند.

بافت گوشت و خطدار بودن پوست از دیگر اجزای مهم کیفیت میوه است (Pitrat, 2008). همچنین سفتی میوه نیز در کیفیت آن مؤثر است. سفتی میوه یک ویژگی مکانیکی محصول و به‌عنوان شاخصی از مقاومت محصول به بارگذاری فشاری بوده و اندازه‌گیری آن در تعیین زمان برداشت و بررسی مراحل نرم‌شدن میوه در جریان رسیدگی و انبارداری مؤثر می‌باشد. اندازه‌گیری سفتی در پیش‌بینی میزان فشار قابل تحمل توسط میوه و صدمات احتمالی در حین حمل و نقل و انبارداری و در نتیجه به حداقل رساندن آن‌ها بسیار مؤثر است. میوه‌هایی که به حد کافی سفت نیستند هنگام حمل و

جدول ۴. نتایج ارزیابی صفات رنگ پوست و رنگ گوشت طالبی در نسل والدی و جمعیت F₂

Table 4. Results of evaluation of rind color and flesh color traits of melon in parental generation and F₂ population

Population	Rind Color			Total	Flesh Color			Total
	Cream	Yellow	Green and Yellow		Green	White-Green	White-Yellow	
Galia	0	1	0	1	0	1	0	1
Saveh	2	0	3	5	5	0	0	5
F ₂ Population	23	11	8	42	29	8	5	42

جدول ۵. نتایج ارزیابی صفات خطداربودن پوست، سفتی میوه و گوشت طالبی در نسل والدی و جمعیت F₂

Table 5. Results of evaluation of stripe, fruit firmness and flesh firmness traits of melon in parental generation and F₂ population

Population	Stripe		Total	Fruit firmness			Total	Flesh firmness			Total
	With	Without		Firm	Medium	Soft		Firm	Medium	Soft	
Galia	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1
Saveh	5	0	5	3	2	0	5	0	3	2	5
F ₂ Population	17	25	42	30	10	2	42	2	11	29	42

جدول ۶. مشخصات میوه طالبی در سه گیاه گزینش شده نسل F_2 . ژنوتیپ این گیاهان از نظر ژن *SIERF1* به صورت A_1A_1 است که مشابه ژنوتیپ رقم گالیا است.

Table 6. Fruit features of melon in three selected plants from F_2 population. The genotype of these plants for *SIERF1* is A_1A_1 which is similar to the genotype of Galia.

Genotype	Weight (gr)	Length (cm)	Width (cm)	Flesh-width (cm)	Cavity (cm)	TSS
Saveh x Galia - F_2 Generation (A_1A_1) - sample1	2015	16	15.5	5.5	7	14
Saveh x Galia - F_2 Generation (A_1A_1) - sample2	1865	15.5	16.5	4.5	7	12
Saveh x Galia - F_2 Generation (A_1A_1) - sample3	1549	15	15	4	6.5	12

میوه رقم گالیا (TSS=۱۲) مناسب است. در نسل F_2 گیاهانی یافت شدند که مشخصات خوب رقم ساوه در آنها وجود داشت ضمن اینکه آلل مطلوب ژن شیرینی را از رقم گالیا به ارث برده بودند. با گزینش این گیاهان و خودگشتی آنها می‌توان در آینده رقمی تولید کرد که از نظر کیفیت بهتر از رقم کنونی ساوه باشد.

سپاسگزاری

از حمایت مالی پارک علم و فناوری دانشگاه تهران از این تحقیق در قالب اعتبار هسته شکوفایی یک با شماره ۵۸۸۴۷۹۴ تاریخ ۱۳۹۶/۱۱/۲، تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد نشانگر (SIE1-HRM) به خوبی می‌تواند گیاهانی را گزینش کند که میزان قند آنها نسبت به والد ساوه بسیار بهتر است. همچنین تحقیق نشان داد میزان قند میوه توده ساوه (TSS =۶) مناسب نیست و نیاز به بهبود دارد. این نشانگر تکرارپذیری صددرصد دارد و انجام آن بسیار راحت است. اگرچه هزینه آن اندکی از نشانگری همچون SCAR بالاتر است. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد والد گالیا برای اصلاح ژنتیکی شیرینی میوه بسیار مناسب بوده است چرا که آلل ژن *SIERF1* در این رقم میزان قند را به مقدار بسیار زیادی بالا برد. میزان قند

REFERENCES

- Aharoni, Y., Copel, A. & Fallik, E. (1993). Storing 'Galia' melons in a controlled atmosphere with ethylene absorbent. *HortScience*, 28(7), 725-726.
- Albuquerque, B., Lidon, F.C. & Graca Barreiro, M. (2006). A case study on the flavor properties of melon (*Cucumis melo* L.) cultivars. *Fruits*, 61(5), 333-339.
- Bahrami Sirmandi, S., Bahrami Sirmandi, H. & Hasanzadeh, R. A. (2013). *A complete and pictured guide of vegetable culture and breeding*. Sarva Publishers, 244p. (in Farsi)
- Burger, Y., Saar, U., Katzir, N., Paris, H. S., Yeselson, Y., Levin, I. & Schaffer, A. (2002). A single recessive gene for sucrose accumulation in *Cucumis melo* fruit. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 127(6), 938-943.
- Diaz, A., Fergany, M., Formisano, G., Ziarsolo, P., Blanca, J., Fei, Z., Staub, J.E., Zalapa, J.E., Cuevas, H.E., Dace, G. & Oliver, M. (2011). A consensus linkage map for molecular markers and Quantitative Trait Loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology*, 11, 111-125.
- Diba Zar, Sh., Sheikhi, N., Hemmat Zadeh, F., Charkh Kar, S. & Pour Bakhsh, A. (2014). Use the HRM method to detect and subtract the Iranian isolate from Newcastle disease from vaccine strains. *Journal of Comparative Pathobiology*, 11(3), 1345-1356.
- Fallik, E., Alkali-tuvia, S., Horev, B., Copel, A., Rodov, V., Aharoni, Y., Ulrich, D. & Schulz, H. (2001). Characterisation of "Galia" melon aroma by GC and mass spectrometric sensor measurements after prolonged storage. *Postharvest Biology and Technology*, 22, 85-91.
- Food and Agricultural Organization. (2016). *Biodiversity: Agricultural biodiversity in FAO*. Retrieved October 12, 2018. From: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Gross, K.C., Wang, C.Y. & Salveit, M. (2016). *The commercial storage of fruits, vegetables and florist and nursery stocks*. United States Department of Agriculture.
- Han, Y., Khu, D-M. & Monteros, M. J. (2012). High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Molecular Breeding*, 29, 489-501.
- Hwang, J.H., Ahn, S.G., Oh, J.Y., Choi, Y.W., Kang, J.S. & Park, Y.H. (2011). Functional characterization of watermelon (*Citrullus lanatus* L.) EST-SSR by gel electrophoresis and high resolution melting analysis. *Scientia Horticulturae*. (Amsterdam), 130, 715-724.

12. Kaviani Charati, A., Sabouri, H., Fallahi, H.A. & Jorjani, E. (2016) QTL mapping of spike characteristics in barley using F3 and F4 families derived from Badia × Komino Cross. *Journal of Plant Genetic Research*, 3(1), 13-28. (in Farsi)
13. Khu, Y.H.D. & Monteros, M.J. (2012). High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Molecular Breeding*, 29, 489-501.
14. Kristensen, L. S. & Dobrovic, A. (2008). Direct genotyping of single nucleotide polymorphisms in methyl metabolism genes using probe-free high-resolution melting analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17, 1240-1247.
15. Leida, C., Moser, C., Esteras, C., Sulpice, R., Lunn, J. E., De Langen, F., Monforte, A. J. & Picó, B. (2015). Variability of candidate genes, genetic structure and association with sugar accumulation and climacteric behavior in a broad germplasm collection of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Genetics*, 16, 28.
16. Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E. & Wittwer, C. (2004). Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical Chemistry (Molecular Diagnostics and Genetics)*, 50(7), 1156-1164.
17. Mir Drikvand, R. (2016) Investigation of heritability of morphological traits and genetic diversity among rainfed barley genotypes using molecular and morphological markers. *Journal of Plant Genetic Research*, 3(2), 69-82. (in Farsi)
18. Murray, H.G. & Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res*, 8, 4321-4325.
19. Oumouloud, A., El-Otmani, M., Chikh-Rouhou, H., Claver, A.G., Torres, R.G., Perl-Treves, R. and Alvarez, J.M. (2013). Breeding melon for resistance to *Fusarium* wilt: recent developments. *Euphytica*, 192, 155-169.
20. Perpiñá, G., Esteras, C., Gibon, Y., Monforte, A. J. & Picó, B. (2016). A new genomic library of melon introgression lines in a cantaloupe genetic background for dissecting desirable agronomical traits. *BMC Plant Biology*, 16(1), p154.
21. Pitrat, M. (2008). Melon In: Prohens, J. & Nuez, F. (Ed), *Handbook of Plant Breeding-Vegetables I* (pp. 283-316). Springer, New York.
22. Raghani, M., Hassandokht, M. R., Zamani, Z., Fattahi Moghadam, M. R. & Kashi, A. (2016). Genetic analysis of fruit sweetness in Iranian melon (*Cucumis melo*) by complete-diallel crosses. In: *Proceedings of the 9th National congress of Horticultural Science*, 25-28 Jan. Iran, Ahvaz, Shahid Chamran University. (in Farsi)
23. Sobhani, A. R. & Hamidi, H. (2015). Melon Breeding and production management. Tak press. (in Farsi)
24. Suh, S. R., Lee, K-H., Yu, S. H., Shin, H. S., Choi, Y. S. & Yoo, S. N. (2012). Melon Surface Color and Texture Analysis for Estimation of Soluble Solids Content and Firmness. *Journal of Biosystems Engineering*, 37(4), 252-257.
25. Taylor, C. F. (2009). Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochemical Society Transactions*, 37(2), 433-437.
26. Wu, S. B., Franks, T. K., Hunt, P., Wirthensohn, M. G., Gibson, J. P. & Sedgley, M. (2010). Discrimination of SNP genotypes associated with complex haplotypes by high resolution melting analysis in almond: Implications for improved marker efficiencies. *Molecular Breeding*, 25, 351-357.
27. Yari, F. (2005). *Effect of fruit position on plant and planting Density on melon seed quality of Samsouri*. M.Sc Thesis. University of Tabriz, Iran. (in Farsi)
28. Yuneji, S., Ghanbarian, D. & Farhadi, A. (2010). Firmness Changes in the melon fruit during ripening and stored. In: *Proceedings of the 6th National congress on Agricultural Machinery Engineering & Mechanization*. 15-16 Sept., Iran, Karaj, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. (in Farsi)