

انگشت‌نگاری ژنتیکی بخشی از ژرم پلاسما خربزه ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

طاهره شهرکی^۱، محمدرضا نارویی راد^{۲*}، حمیدرضا گنجعلی^۳، حسین کمال‌الدینی^۴، حمیدرضا مبصر^۲

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زاهدان، زاهدان، ایران

۲- بخش تحقیقات زراعی باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی سیستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زابل، ایران

۳- گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زاهدان، زاهدان، ایران

۴- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران

* مسئول مکاتبه: mr.narouirad@areeo.ac.ir

DOI: 10.22034/CSRAR.2022.327080.1187

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۹

چکیده

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مولکولی روشی سریع است که نقش مهمی در برنامه‌های اصلاحی دارد. در این بررسی تنوع ژنتیکی ۴۰ توده محلی خربزه از مناطق شرقی و مرکزی ایران با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر ریزماهوره مورد ارزیابی قرار گرفت که ۱۳ جفت از آغازگرهای مورد استفاده، قادر به تکثیر مکان‌های ژنی ریزماهوره شدند. تمام مکان‌های ژنی به جز آغازگر CMCT44، چند شکل بودند، در مجموع تعداد ۲۵ آلل با میانگین ۱/۹۳ آلل به ازای هر جایگاه ژنی ریزماهوره، مشاهده گردید. بالاترین میزان مکان‌های چند شکلی (۸۴/۶۲ درصد) متعلق به توده KC-357009 بود. میزان بالای مکان‌های چند شکلی، تأییدکننده کارایی نشانگرهای مولکولی SSR در آنالیز ژنتیکی توده‌های بومی مورد بررسی است. میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی و هتروزیگوتی مورد انتظار به ترتیب ۰/۲۴ و ۰/۲۳ به دست آمد. مقادیر بالای هموزیگوتی مشاهده شده با میانگین ۰/۸۴ نشان‌دهنده تنوع پایین درون توده‌های مورد بررسی است که دلیلی بر میزان پایین دگرگشتی بین توده‌ها و میزان بالای خویش‌آمیزی است. در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، توده‌های مورد بررسی در دو گروه (زیرجمعیت) قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه ساختار جمعیت براساس روش بیزین و خوشه‌بندی UPGMA نشان داد که طبقه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مستقل از منشاء جغرافیایی‌شان می‌باشد. با توجه به مقادیر حاصل از پارامترهای فوق از بین آغازگرهای مورد مطالعه، مکان‌های ژنی CMCCA145، CMGA172 و CMCT134b جهت تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژرم پلاسما خربزه در تحقیقات آتی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: توده‌های بومی، ساختار ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی، هتروزیگوتی

مقدمه

ازبکستان مراکز اولیه ملون‌ها می‌باشند (Kerje and Grum, 2000). اما با توجه به توزیع ملون‌های وحشی در مونوگراف کیرکبراید، به نظر می‌رسد آفریقا مرکز اولیه تنوع باشد و ایران، هند، افغانستان و چین مراکز ثانویه تنوع ملون باشند (Kirkbride, 1993).

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی ذخایر توارثی گونه‌های گیاهی، جهت کاهش حجم نمونه‌های موجود در بانک ژن و بررسی خلوص بذرها در اصلاح نباتات از اهمیت خاصی برخوردار است. روش‌های مختلفی برای برآورد تنوع ژنتیکی وجود دارد که یکی از ابزارهای بسیار مهم و قوی در این زمینه تجزیه و تحلیل DNA گیاهی است که امکان ارزیابی مستقیم تنوع ژنتیکی را فراهم می‌کند (Bagheri et al., 2007).

تقریباً نیمی از تولید سبزیجات در ایران متعلق به خانواده کدوئیان است و تولید ملون‌ها در ایران در سال ۲۰۱۹ حدود ۱۱۳۶۰۰۰ تن بوده است (FAOSTAT, 2019). از ملون‌های شناخته شده در ایران می‌توان به گروه‌های *Cantaloupensis* (طالی)، *Inodorus* (خربزه) و *Flexousous* (خیار چنبر) اشاره نمود (Moayedi Nejad et al., 2010). خربزه که با نام علمی *Cucumis melo* L به خانواده Cucurbitaceae تعلق دارد (Kirkbride, 1993)، یک محصول مهم باغبانی در سراسر جهان و در آب و هوای گرم و معتدل است و ایران از نظر تولید این محصول در مقام چهارم جهان قرار دارد (FAOSTAT, 2019). طبق نظر برخی از محققان، کشورهای ترکیه، سوریه، ایران، افغانستان، شمال و مرکز هند، قفقاز، تاجیکستان و

جدول ۱- چهل توده خربزه مورد بررسی مربوط به مناطق شرقی و مرکزی ایران

Table 1- Forty melon accessions studied in the eastern and central regions of Iran

شماره	نام توده	موقعیت جغرافیایی	شماره	نام توده	موقعیت جغرافیایی
No	Landrace designation	Geographical location	No	Landrace designation	Geographical location
1	TN-345	خراسان Khorasan	21	KC- 357044	البرز Alborz
2	KC-35700	البرز Alborz	22	KC-357009	البرز Alborz
3	TN-271	اصفهان Esfahan	23	KC-357067	البرز Alborz
4	KC-357238	البرز Alborz	24	KC-357100	البرز Alborz
5	TN-441	خراسان Khorasan	25	TN-272	خراسان Khorasan
6	TN-377	خراسان Khorasan	26	KC-357079	البرز Alborz
7	TN-277	خراسان Khorasan	27	357063	قاین Qaen
8	KC-257236	البرز Alborz	28	KC-357047	البرز Alborz
9	TN-629	خراسان Khorasan	29	KC357062	البرز Alborz
10	TN-92-334	خراسان Khorasan	30	سفیدک Sefidak	زابل Zabol
11	TN-628	خراسان Khorasan	31	سوسکی Suski	اصفهان Esfahan
12	TN-92-319	البرز Alborz	32	سوسکی سبز Suski Sabz	اصفهان Esfahan
13	TN-623	خراسان Khorasan	33	سوسکی زرد Suski Zard	اصفهان Esfahan
14	TN92317	خراسان Khorasan	34	گرگاب Gorgab	اصفهان Esfahan
15	TN92312	خراسان Khorasan	35	قصری پیشرفته Ghasri Pishrafte	اصفهان Esfahan
16	TN622	اصفهان Esfahan	36	تیل مگسی Teele Magasi	اصفهان Esfahan
17	KC- 357020	البرز Alborz	37	جاجو Jajoo	اصفهان Esfahan
18	TN621	سمنان Semnan	38	زرد زواره Zarde Zavare	اصفهان Esfahan
19	TN-92-306	سمنان Semnan	39	جاجو ۸۵ Jajoo85	اصفهان Esfahan
20	TN92-302	سمنان Semnan	40	درگزی Dargazi	قاین Qaen

فناوری زنده، cat. P0401) استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA به دست آمده توسط دستگاه نانودراپ (ساخت شرکت Nabi کره جنوبی) و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تعیین شد. نمونه‌های DNA تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

نشانگرهای مورد استفاده (جدول ۲) در این پژوهش براساس مطالعات پیشین که توسط محققین مختلفی پیشنهاد شده بود، انتخاب شد (Danin-Poleg *et al.*, 2001; Gonzalo *et al.*, 2005; Ritschel *et al.*, 2004). آغازگرها توسط شرکت سیناکلون صورت پذیرفت. برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از دستگاه ترموسایکلر Gradient PCR Vapo Protect ساخت شرکت Eppendorf استفاده شد. تکثیر قطعات DNA در واکنش‌هایی با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر DNA (با غلظت ۵ نانو گرم)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (با غلظت ۱۰ میکرومولار)، هشت میکرولیتر Taq 2x Mastermix Red ساخت شرکت Ampliqon دانمارک و چهار میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه و سپس ۳۵ چرخه حرارتی که شامل یک دقیقه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه جهت اتصال در دمای ۵۰-۵۹/۸ درجه سانتی‌گراد (بسته به آغازگر)، یک دقیقه جهت بسط آغازگرها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و پنج دقیقه هم به منظور بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۸ درصد در بافر TBE 1X و در ولتاژ ۸۵ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند. مشاهده و عکس‌برداری از ژل به کمک دستگاه ژل‌داک مدل UV-2100 صورت گرفت.

تحلیل آماری

امتیازدهی باندها به صورت صفر (عدم مشاهده باند) و یک (مشاهده باند) انجام شد. ارزیابی تجزیه خوشه‌ای و پارامترهای ژنتیکی مانند هتروزیگوتی مشاهده شده، هتروزیگوتی مورد انتظار و تعداد آلل‌های مؤثر از طریق نرم‌افزارهای Ntsys 2.1 و Popgene 1.32 به دست آمد. برای هر جایگاه، میزان اطلاعات چند شکلی از رابطه زیر محاسبه گردید که در آن فراوانی

بومی‌سازی صفات تک‌ژنی و چندژنی ایفا کرده است (Filiz *et al.*, 2018; Hocaoglu-Ozyigit *et al.*, 2020; Saidi *et al.*, 2018). نشانگرهای SSR دارای خصوصیات مطلوب ژنتیکی هم‌چون تنوع زیاد، مکان‌یابی اختصاصی کروموزوم، توارث همباز و تکرارپذیری هستند در حالی که استفاده از آن‌ها سریع، ساده و کارآمد است (Bagheri *et al.*, 2007). براساس این مزایا، نشانگرهای SSR به طور گسترده‌ای خصوصاً در تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی استفاده می‌شوند (Ercisli *et al.*, 2011; Laosatit *et al.*, 2021). اگرچه مطالعاتی روی ساختار ژنتیکی ملون‌های ایرانی با استفاده از نشانگرهای مختلف مولکولی از جمله نشانگر مولکولی RAPD (Feyzian *et al.*, 2007) و نشانگرهای ریزماهواریه ISSR (Maleki *et al.*, 2018) و SSR (Moayedinejad *et al.*, 2010; Raghmi *et al.*, 2014) در سال‌های اخیر انجام شده است، اما به دلیل قدمت کاشت و وجود ذخایر عظیم ژنتیکی خربزه که ایران را به عنوان یکی از مراکز اصلی تنوع این محصول در دنیا مطرح می‌کند، تحقیقات در این زمینه ناکافی است. این در حالی است که در سال‌های اخیر، فرسایش ژنتیکی توده‌های بومی خربزه به دلیل افزایش سطح زیرکشت ارقام غیربومی محتمل است. در حال حاضر هیچ‌گونه گزارشی در مورد روابط ژنتیکی بین چهل توده بومی خربزه مورد مطالعه از طریق نشانگرهای SSR وجود ندارد؛ بنابراین هدف از این پژوهش، آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی و استفاده مناسب در انتخاب تلاقی‌های احتمالی توده‌های مورد بررسی است.

مواد و روش‌ها

چهل توده بومی خربزه مورد استفاده در این پژوهش از ژرم‌پلاسم خربزه بلنک ژن ایران (که اکثراً از توده‌های مناطق مرکزی و شرق ایران بودند) تهیه شد و در فروردین سال ۱۳۹۸ در مزرعه‌ای واقع در زهک با طول و عرض جغرافیایی به ترتیب ۶۱ درجه و ۶۸ دقیقه شرقی و ۳۰ درجه و ۸۹ دقیقه شمالی کشت گردید (جدول ۱)، آزمایشات مولکولی در دانشکده علوم دانشگاه زابل انجام شد. ۴-۵ برگ از هر گیاه در مرحله دو تا سه برگی، جمع‌آوری و تا زمان استخراج DNA در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. DNA ژنومی آن‌ها با استفاده از کیت گیاهی ZandBio (تهیه شده از شرکت زیست

آل i ام و n تعداد مکان‌هاست (رابطه ۱).

$$PIC = 1 - \sum f_i^2 \quad (1)$$

برای تخمین تعداد زیر جمعیت‌ها (K) و تشخیص ژنوتیپ‌های خالص و مختلط از نرم‌افزار Structure نسخه ۲/۳ و با استفاده از روش بیزین انجام شد (Pritchard *et al.*, 2000). تعداد زیر جمعیت‌های فرضی (K) در محدوده ۱-۱۰ تنظیم شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها پنج تکرار منظور شد، در ادامه از مدل Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۲۰۰۰۰ تکرار آزمایش (Burn-in) و ۵۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده گردید تا منحنی حداکثر درست‌نمایی به دست آید. بهترین مقدار K با استفاده از ابزار آنالین Structure Harvester و به کمک نتایج حاصل از محاسبات نرم‌افزار Structure به دست آمد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که از ۱۵ جفت آغازگر مورد استفاده، ۱۳

جفت قادر به تکثیر مکان‌های ژنی ریزماهواره شدند (جدول ۳). دو جفت آغازگر نیز احتمالاً به دلیل متفاوت بودن توالی‌های احاطه‌کننده جایگاه‌ها در یک یا دو جایگاه اتصال آغازگر، اشکال در ساخت، نامناسب بودن بافر و مواد مورد استفاده قادر به تکثیر مکان ژنی مورد نظر نبودند. به جز یک جایگاه ژنی، سایر جایگاه‌های ژنی ریزماهواره چند شکل بودند. میزان مکان‌های چند شکلی در توده‌های بومی از ۱۵/۳۸ درصد (جاجو) تا ۸۴/۶۲ درصد (KC-357009) با میانگین ۴۳/۴۶ درصد متغیر بود (داده‌ها نشان داده نشده است) که میزان چند شکلی مشاهده شده تأییدکننده کارایی آن‌ها در آنالیز ژنتیکی ژرم پلاسم خریزه است. در چندین بررسی نیز (Danin-Poleg *et al.*, 2001; Katzir *et al.*, 1996; Monforte *et al.*, 2003; Raghmi *et al.*, 2014)، میزان بالایی از چند شکلی با استفاده از نشانگر مولکولی SSR روی توده‌های ملون گزارش شد که با نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، مطابقت داشت.

جدول ۲- ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی خریزه ایران با استفاده از شاخص‌های نشانگرهای SSR

Table 2- Assess the genetic diversity of Iranian indigenous melon using the indices of SSR primers

شماره No	مکان ژنی Locus	توالی رفت (۵' - ۳') Forward sequence	توالی برگشت (۳' - ۵') Reverse sequence	دمای اتصال Annealing temperature (C)
1	CMGA15	CGGCAAGACGATTGGCAGC	ATCACCGTAGCGAAGCACC	59.8
2	CMCT44	TCAACTGTCCATTCTCGCTG	CCGTAAAGACGAAAACCTTC	59.8
3	CMGA104	TTACTGGGTTTTGCCGATTT	AATCCGTATTCAACTCTCC	51
4	CMACC146	CAACCACCGACTACTAAGTC	CGACCAAACCCATCCGATAA	55.1
5	CMCTT144	CAAAAAGGTTTCGATTGGTGGG	AAATGGTGGGGTTGAATAGG	55.8
6	CMT47	GCATAAAAAGAATTTGCAGAC	AGAATTGAGAAGAGATAGAG	50
7	CMAT141	AAGCACACCACCCCGTAA	GTGAATGGTATGTTATCCTTG	58.3
8	CMCCA145	GAGGGAAGGCAGAAACCAAAG	GCTACTTTTGTGGTGGTGG	57.9
9	CMT168	ATCATTGGATGTGGGATTCTC	ACAGATGGATGAAACCTTAGG	55
10	CMGA172	CAATCGCAGATACTTCCACG	TGCTTGTCCCAACGGTGTGTCAT	57.5
11	CMGT108	CTCCTTCAAACATTGTGTGTG	GAGATAGGTATAGTATAGGGG	-
12	CMTA170a	TTAAATCCCAAAGACATGGCG	AGACGAAGGACGGTTAGCTTT	-
13	CMTA134a	ACGTGCTTCAGTAAACATG	CCGACATTGAAAACCAACTTC	53.7
14	CMCT134b	GCTCCTCTTAACTCTATAC	GCATTATTACCCATGTACGAG	54.4
15	CMT160a+b	GTCTCTCTCCCTTATCTTCCA	GATGGTGCCTTAGTTGTTCCG	58.7

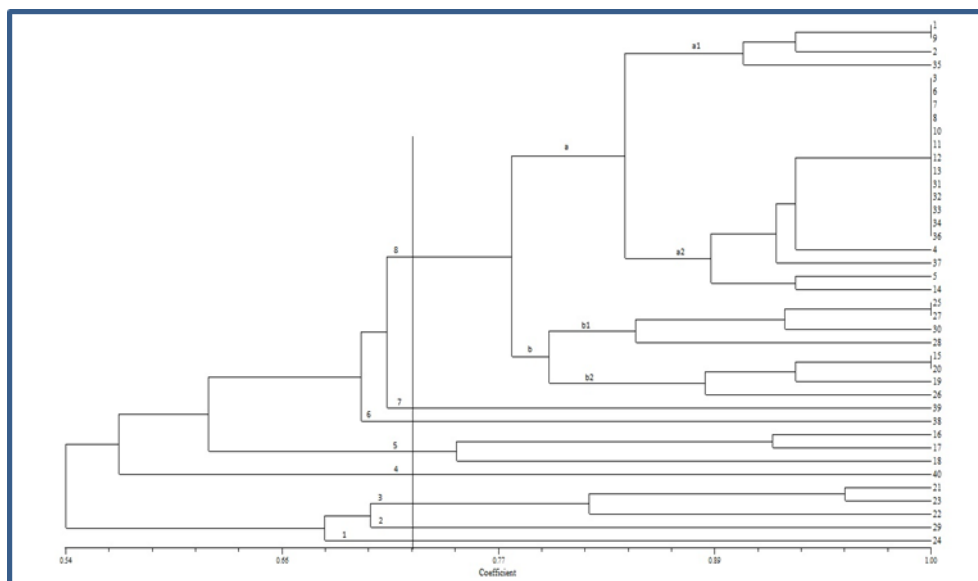
جدول ۳- اطلاعات به‌دست آمده از آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش

Table 3- Information obtained from the primers used in the research

شماره	مکان ژنی	تعداد آلل	محتوای اطلاعات چند شکلی	هتروزیگوتی مورد انتظار	هتروزیگوتی مشاهده شده
No	Locus	Allele number	Polymorphic information content	Expected heterozygosity	Observed heterozygosity
1	CMGA15	2	0.27	0.18	0.2
2	CMCT44	1	0	0	0
3	CMGA104	2	0.27	0.21	0.175
4	CMACC146	2	0.19	0.23	0.165
5	CMCTT144	2	0.22	0.17	0.185
6	CMTC47	2	0.18	0.28	0.17
7	CMAT141	2	0.14	0.17	0.18
8	CMCCA145	2	0.53	0.44	0.185
9	CMTC168	2	0.22	0.16	0.155
10	CMGA172	2	0.43	0.41	0.17
11	CMGT108	-	-	-	-
12	CMTA170a	-	-	-	-
13	CMTA134a	2	0.18	0.15	0.145
14	CMCT134b	2	0.36	0.39	0.10
15	CMTC160a+b	2	0.33	0.24	0.245
میانگین		1.92	0.24	0.23	0.16
Mean					

میانگین تعداد آلل مشاهده شده و آلل مؤثر برای مکان‌های ژنی به ترتیب ۱/۹۲ و ۱/۳۳ بود. هنگامی که فراوانی‌های آللی یکسان هستند، مقدار تعداد آلل‌های مؤثر به تعداد مشاهده شده آلل‌ها در یک مکان نزدیک می‌باشد. تفاوت‌های زیاد بین این پارامترها نشان‌دهنده فراوانی پایین بعضی از آلل‌ها می‌باشد، زیرا آن‌ها فقط در یک و یا تعداد کمی از افراد وجود دارند؛ بنابراین در شناسایی آلل‌های کمیاب مفید هستند (Darvishzadeh and Azizi, 2016). میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده در بررسی که بر روی ۵۲ توده ملون ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگر SSR، انجام شد، ۴/۱۱ آلل بود (Raghmi *et al.*, 2014). در تحقیقی مشابه مقدار ۲/۴ آلل از بررسی ۱۵ ژنوتیپ ملون از اسپانیا گزارش شد (López-Sesé *et al.*, 2002). همچنین در بررسی دیگری که ۱۴ ژنوتیپ ملون از یونان مورد ارزیابی قرار گرفت، مقدار ۲/۴۷ آلل مشاهده گردید (Tzitzikas *et al.*, 2009). می‌توان گفت تعداد بالای آلل‌های مشاهده شده در گزارشات مذکور ناشی از به کار بردن زیر گونه‌های متفاوت از گونه *Cucumis melo* است.

میزان تنوع ژنی نشان‌دهنده توانایی نشانگر در تمایز ژنوتیپ‌هاست (Matus and Hayes, 2002). بالاترین و کمترین مقدار هتروزیگوتی مورد انتظار (۰/۴۴ و ۰/۱۵) به ترتیب مربوط به نشانگرهای CMCCA145 و CMTA134a بود. محتوای اطلاعات چندشکلی با استفاده از تعداد و فراوانی آلل‌ها در هر جایگاه ژنی، قدرت تفکیک آن را مشخص می‌کند (Anderson *et al.*, 1993). میانگین محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، ۰/۲۴ بود در حالی که مقادیر آن در دامنه ۰/۱۹ تا ۰/۵۳ قرار داشت (جدول ۱). بر این اساس بیشترین مقدار متعلق به آغازگر CMCCA145 (۰/۵۳) و پس از آن متعلق به جایگاه‌های ژنی CMGA172 و CMCT134b بود. نشانگرهایی که محتوای اطلاعات چند شکلی بالایی داشتند، تنوع ژنی بالایی نیز داشتند که نشان‌دهنده همبستگی مثبت بین میزان PIC و تنوع ژنی است. این نشانگرها (CMCCA145، CMGA172 و CMCT134b) بهتر از بقیه توانستند فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را آشکار سازند پس می‌توان به خوبی از این مکان‌های ژنی برای آنالیز مجموعه‌های دیگر ژرم‌پلاسما خربزه بهره جست.



شکل ۱- نمودار تنوع ژنتیکی برحسب ضریب جاکارد و روش UPGMA برای ۴۰ توده بومی خربزه

Figure 1- Dendrogram of genetic diversity for the 40 melon landraces based on Jacard Similarity Coefficient and UPGMA method

کامل بوده که باعث افزایش خودگرده‌افشانی و به تبع آن کاهش هتروزیگوتی آن‌ها می‌شود (Moayedi Nejad *et al.*, 2010). هم‌چنین در پژوهشی مقدار بالای هموزیگوتی توده‌های ملون یونان به استفاده از بذور مشابه در بین کشاورزان و عمل گزینش توسط آن‌ها، نسبت داده شد (Tzitzikas *et al.*, 2009). از طرفی برخی پژوهش‌گران مقدار پایین هتروزیگوتی مشاهده شده در توده‌های ملون ایرانی را حتی در صورت دگرلقاحی، حفظ اصالت توده‌ها جهت نگهداری صفات میوه توسط کشاورزان به دلیل ترجیح مصرف‌کنندگان گزارش کردند (Raghmi *et al.*, 2014). در بررسی که محققان بر روی ۳۶ ژنوتیپ خربزه و طالبی ایرانی با استفاده از ۱۶ مکان ژنی ریزماهوره انجام دادند، میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده در طالبی‌های ایرانی نسبت به خربزه‌ها بیشتر بود که نشان‌دهنده تنوع بیشتر ارقام و توده‌های طالبی ایرانی نسبت به خربزه‌ها بود، براساس نظر این محققان شاید این موضوع به دلیل انجام کارهای اصلاحی و فشار بیشتر گزینش روی خربزه‌های ایرانی باشد (Behbahanei, 2005).

براساس نتایج، ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش خوشه‌بندی UPGMA و بر اساس ماتریس شباهت ژنتیکی جاکارد به هشت شاخه اصلی تقسیم شدند (شکل ۱). ضریب همبستگی cophenetic توسط آزمون Mantel برآورد شد که نشان‌دهنده همبستگی نسبتاً خوبی بین ماتریس شباهت و تحلیل خوشه‌ای

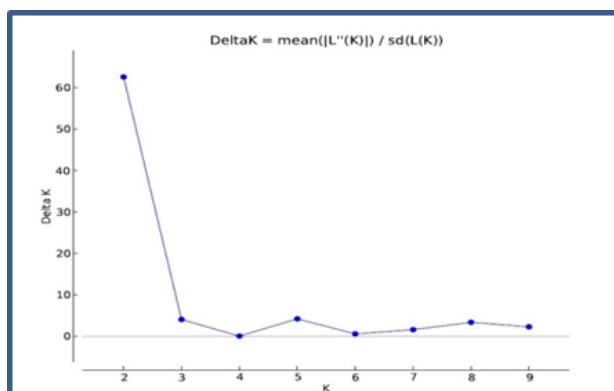
مناسب‌ترین شاخص برای به دست آوردن یک دید کلی در مورد تنوع ژنتیکی برای نشانگرهای همباز هتروزیگوسیتی است (Darvishzadeh and Azizi, 2016). مکان‌های ژنی CMTC134b و CMTC160a+b به ترتیب کمترین (۰/۱) و بیشترین (۰/۲۴) مقدار هتروزیگوسیتی را داشتند. میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده برای تمام توده‌ها در بین مکان‌های ژنی مورد بررسی ۰/۱۶ بود که این پارامتر با مقدار حاصل از میانگین هتروزیگوتی مشاهده توده‌های ملون ایران (۰/۱۲) که در پژوهشی توسط برخی از محققان به دست آمد تا حدودی مشابه است (Raghmi *et al.*, 2014). پایین‌ترین مقدار هتروزیگوتی (۰/۰۴۶) در میان توده‌ها به توده TN-277 و بالاترین مقدار هتروزیگوتی (۰/۷، ۰/۵۸، ۰/۵۲ و ۰/۳۵) به توده‌های KC-357009، KC-357067، KC-357044 و KC-357100 تعلق داشت (داده‌ها نشان داده نشده است)، این پارامتر در توده جاجو، صفر بود که نشان داد این توده برای تمام مکان‌های ژنی آزمون شده هموزیگوت بود و هیچ هتروزیگوتی در آن مشاهده نشد. کمترین و بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در بین گروه‌های جغرافیایی مورد بررسی نیز به ترتیب مربوط به زایل (۰/۰۴۶) و استان البرز (۰/۲۹) بود. مقادیر کم هتروزیگوتی در توده‌ها، ناشی از نحوه تولیدمثل گیاه است. خربزه‌های ایرانی عمدتاً به صورت رقم بوده و جداگانه کشت می‌شوند، هم‌چنین برخی ارقام خربزه دارای گل‌های

موجود بین آن‌ها نبوده‌اند.

هفت توده از ۱۰ توده متعلق به هرکدام از استان‌های اصفهان و خراسان در گروه a2 قرار گرفتند که نشان از قرابت زیاد این توده‌ها دارد. قرار گرفتن توده‌های KC-357100، KC357062، Dargazi، Zarde Zavare و Jajoo به صورت منفرد در شاخه‌های جداگانه، شاید حاکی از این باشد که بر خلاف سایر توده‌ها، آن‌ها از توده‌های محلی متمایز بوده و سال‌ها در این مناطق به‌طور جداگانه کشت و محافظت شده‌اند. در پژوهشی که بر روی گروه‌های مختلف ملون با استفاده از نشانگرهای رپید انجام شد (Feizian, 2004) و هم‌چنین در بررسی که محققان دیگری بر روی ارقام و توده‌های محلی خربزه و طالبی ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR، انجام دادند (Moayedi Nejad *et al.*, 2010) تجزیه خوشه‌ای نتوانست گروه‌های مختلف را از یکدیگر متمایز کند که بیانگر نزدیک بودن ژنوم این گروه‌هاست.

ساختار جمعیت نتیجه تفاوت فراوانی آللی بین جمعیت‌های مختلف است که در نتیجه تفاوت‌های زمینه ژنتیکی است و ممکن است با تفاوت فنوتیپی شناخته شده مورد مطالعه غیر مرتبط باشد. یک ژنوتیپ وقتی درصد عضویت آن در یک گروه (زیرجمعیت) خاص بیشتر و مساوی ۰/۷ باشد، به آن گروه نسبت داده می‌شود و اگر کمتر یا مساوی ۰/۶۹ باشد، به عنوان یک ژنوتیپ مخلوط تعریف می‌شود (Spataro *et al.*, 2011). در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، بیشترین میزان دلتا K در مقابل تغییرات K در $K = 2$ به‌دست آمد که نشان داد توده‌های مورد بررسی در دو گروه (زیرجمعیت) قرار می‌گیرند (شکل ۲).

بر اساس ضریب شباهت جاکارد است ($r=0/92$). شاخه اول تا چهارم شامل ۶ توده بود که همه از توده‌های بومی کرج بودند. سه توده از استان‌های کرج، اصفهان و سمنان، شاخه پنجم را تشکیل دادند. توده‌های بومی زرد زواره و جاجو به ترتیب متعلق به کلاسترهای ششم و هفتم بودند. تقریباً ۷۰ درصد توده‌ها در شاخه هشتم که دارای دو زیرشاخه a و b بود قرار گرفتند که هر کدام از زیر شاخه‌ها نیز دارای دو گروه بودند. توده‌های TN-345، TN-629، KC-35700 و قصری پیشرفته، گروه a1 و توده‌هایی از اصفهان، خراسان و البرز (TN92317، TN-441، TN-357047، Sefidak و 357063 (مربوط به خراسان، البرز، زابل و قائن) و توده‌های TN92312، TN-92-306، TN-92-302 و KC-357079 (متعلق به خراسان و سمنان و البرز) به ترتیب در گروه‌های b1 و b2 قرار گرفتند. در این تحقیق توده‌های TN-345 و TN-629 از گروه a1، توده‌های Teele Magasi، Gorgab، Suski Sabz، Suski Zard، Suski، TN-623، TN-92-319، TN-628، TN-92-334، KC-257236، TN-377 و TN-272 را تشکیل دادند. توده‌های TN-272، KC-357047 و Sefidak (مربوط به خراسان، البرز، زابل و قائن) و توده‌های TN92312، TN-92-306، TN-92-302 و KC-357079 (متعلق به خراسان و سمنان و البرز) به ترتیب در گروه‌های b1 و b2 قرار گرفتند. در این تحقیق توده‌های TN-345 و TN-629 از گروه a1، توده‌های Teele Magasi، Gorgab، Suski Sabz، Suski Zard، Suski، TN-623، TN-92-319، TN-628، TN-92-334، KC-257236، TN-377 و TN-272 را تشکیل دادند. توده‌های TN-272 و TN-377 از گروه a2، توده‌های TN-272 و 357063 از گروه b1 و توده‌های TN92312 و TN-92-302 از گروه b2 دارای فاصله ژنتیکی صفر بودند، لذا احتمال دارد که آن‌ها توده‌هایی یکسان باشند که به‌دلیل جابجایی بین مناطق مختلف کشور، نام‌های متفاوت گرفتند و یا اینکه مکان‌های ژنی مورد استفاده در این بررسی قادر به تشخیص تفاوت‌های اندک



شکل ۲- توزیع Delta K

Figure 2- Distribution of Delta K



شکل ۳- تقسیم‌بندی توده‌های بومی به دوزیر جمعیت (K = 2) بر اساس نرم‌افزار Structure

Figure 3- STRUCTURE-based genetic clustering (K = 2) of forty melon populations

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج، تلاقی بین ارقامی که کمترین شباهت را دارند، باعث بهترین نتیجه در دستیابی به هیبریدها و یا دستیابی به حداکثر تفکیک در نسل‌های پس از F1 خواهد شد. البته فاصله ژنتیکی تنها عامل مؤثر در شناسایی والدین مناسب برای تولید هیبرید نیست و عواملی مانند ترکیب پذیری و فاصله ژنتیکی بر اساس صفات مورفولوژیکی نیز باید در نظر گرفته شود. از نتایج این مطالعه می‌توان در برنامه‌های هیبریداسیون استفاده کرد. ضمناً بسیاری از نژادهای بومی مانند KC-257236، KC-357009 و TN92317 که تاکنون مورد ارزیابی قرار نگرفته‌اند، در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند.

مطابق شکل ۳، نتایج گراف شده از آنالیز Structure، ۱۹ توده به گروه اول (اکثر توده‌های اصفهان و خراسان) و ۱۱ توده به گروه دوم (اکثر توده‌های کرج و سمنان) تعلق داشتند. در ۱۰ توده نیز درجات متفاوتی از اختلاط ژنتیکی بین جمعیت‌ها وجود داشت. با توجه به اینکه خربزه گیاه بومی ایران است و سابقه کشت طولانی در ایران دارد، شباهت ژنتیکی برخی از جمعیت‌های مورد مطالعه می‌تواند به دلیل تعادل ژنتیکی ناشی از جابجایی بذرها بین مناطق مختلف ایران باشد. نتایج حاصل از تجزیه ساختار جمعیت بر اساس روش بی‌زین و خوشه‌بندی UPGMA نشان داد که طبقه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مستقل از منشاء جغرافیایی‌شان می‌باشد.

References

- Anderson, J.A., Churchill, G., Autrique, J., Tanksley, S. and Sorrells, M. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36(1), PP.181-186. doi: 10.1139/g93-024
- Bagheri, A.A., Darbandi, A. and Malbubi, M.A. 2007. Practical applications of plant molecular biology. Ferdwosi Mashhad Publications [In Persian].
- Behbahanei, M. 2005. Genetic diversity among Iranian melons (*Cucumis melo* L.) via SSR markers. M. Sc. Thesis, Bu-Ali Sina University [In Persian].
- Danin-Poleg, Y., Reis, N., Tzuri, G. and Katzir, N. 2001. Development and characterization of microsatellite markers in Cucumis. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(1), PP.61-72. doi: 10.1007/s001220051618
- Darvishzadeh, R. and Azizi, A. 2016. Molecular markers and their application in genetic diversity analysis. Urmia University Publishers [In Persian].
- Ercisli, S., Ipek, A. and Barut, E. 2011. SSR marker-based DNA fingerprinting and cultivar identification of olives (*Olea europaea*). *Biochemical Genetics*, 49(9), PP.555-561. doi:10.1007/s10528-011-9430-z

- FAOSTAT, 2019. FAO statistical database. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.
- Feyzian, E., Javaran, M.J., Dehghani, H. and Zamyad, H. 2007. Analysis of the genetic diversity among some of Iranian melon (*Cucumis melo* L.) landraces using morphological and RAPD molecular markers. *JWSS-Isfahan University Technology*, 11, PP.151-163.
- Filiz, E., Uras, M.E., Ozyigit, I.I., Sen, U. and Gungor, H. 2018. Genetic diversity and phylogenetic analyses of Turkish rice varieties revealed by ISSR markers and chloroplast trnL-F region. *FEB-Fresenius Environmental Bulletin*, 27(12), PP.835-8358.
- Gonzalo, M., Oliver, M., Garcia-Mas, J., Monfort, A., Dolcet-Sanjuan, R., Katzir, N., Arus, P. and Monforte, A. 2005. Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 110(5), PP.802-811. doi: **10.1007/s00122-004-1814-6**
- Hocaoglu-Ozyigit, A., Ucar, B., Altay, V. and Ozyigit, I.I. 2020. Genetic diversity and phylogenetic analyses of Turkish cotton (*Gossypium hirsutum* L.) lines using ISSR markers and chloroplast trnL-F regions. *Journal of Natural Fibers*, 17(1), PP.1-14. doi: **10.1080/15440478.2020.1788493**
- Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Tzuri, G., Karchi, Z., Lavi, U. and Cregan, P. 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theoretical and Applied Genetics*, 93(8), PP.1282-1290. doi: **10.1007/bf00223461**
- Kerje, T. and Grum, M. 2000. The origin of melon, *Cucumis melo*: a review of the literature. *Acta Horticulture*, 510, PP.37-44. doi: **10.17660/actahortic.2000.510.5**
- Kirkbride, J.H. 1993. Biosystematic monograph of the genus *Cucumis* (Cucurbitaceae): botanical identification of cucumbers and melons. *Parkway Publishers*, 26-35.
- Laosatit, K., Amkul, K., Chankaew, S. and Somta, P. 2021. Molecular genetic diversity of winged bean gene pool in Thailand assessed by SSR markers. *Horticultural Plant Journal*, 8(1), PP.81-88. doi: **10.1016/j.hpj.2021.05.001**
- López-Sesé, A.I., Staub, J., Katzir, N. and Gómez-Guillamón, 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(1), PP.41-51. doi: **10.1023/a:1019904224170**
- Maleki, M., Shojaeiyan, A. and Monfared, S.R. 2018. Population structure, morphological and genetic diversity within and among melon (*Cucumis melo* L.) landraces in Iran. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), PP.599-606. doi: **10.1016/j.jgeb.2018.08.002**
- Matus, I. and Hayes, P. 2002. Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome*, 45(6), PP.1095-1106. doi:**10.1139/g02-071**
- Moayedi Nejad, A., Irshadi, A. and Kohpayegani, J.A. 2012. Genetic diversity among Iranian cantaloupe landraces (*Cucumis melo* L.) using Microsatellite Markers. *Agricultural Biotechnology*, 1(1), PP.1-8.
- Monforte, A., Garcia-Mas, J. and Arus, P. 2003. Genetic variability in melon based on microsatellite variation. *Plant Breeding*, 122(2), PP.153-157. doi: **10.1046/j.1439-0523.2003.00848.x**
- Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype

- data. *Genetics*, 155(2), PP.945-959. doi: **10.1093/genetics/155.2.945**
- Raghani, M., López-Sesé, A.I., Hasandokht, M.R., Zamani, Z., Moghadam, M.R.F. and Kashi, A. 2014. Genetic diversity among melon accessions from Iran and their relationships with melon germplasm of diverse origins using microsatellite markers. *Plant Systematics and Evolution*, 300(1), PP.139-151. doi:**10.1007/s00606-013-0866-y**
- Ritschel, P.S., de Lima Lins, T.C., Tristan, R.L., Buso, G.S.C., Buso, J.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 Biology*, 4(1), PP.1-14. doi: **10.1186/1471-2229-4-9**
- Saidi, A., Eghbalnegad, Y. and Hajibarat, Z. 2017. Study of genetic diversity in local rose varieties (*Rosa* spp.) using molecular markers. *Banat's Journal of Biotechnology*, 8(16), PP.148-157. doi:**10.7904/2068-4738-viii(16)-148**
- Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Zeuli, P.S. and Negri, V. 2011. Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(7), PP.1281-1291. doi: **10.1007/s00122-011-1530-y**
- Tamboli, A.S., Yadav, P.B., Gothe, A.A., Yadav, S.R. and Govindwar, S.P. 2018. Molecular phylogeny and genetic diversity of genus *Capparis* (Capparaceae) based on plastid DNA sequences and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, 304(2), PP.205-217. doi: **10.1007/s00606-017-1466-z**
- Tzitzikas, E.N., Monforte, A.J., Fatihi, A., Kyriotakis, Z., Iacovides, T.A., Ioannides, I.M. and Kalaitzis, P. 2009. Genetic diversity and population structure of traditional Greek and Cypriot melon cultigens (*Cucumis melo* L.) based on simple sequence repeat variability. *HortScience*, 44(7), PP.1820-1824. doi: **10.21273/hortsci.44.7.1820**

Genetic fingerprinting of a part of Iranian melon germplasm using microsatellite markers

Tahereh Shahraki¹, Mohammad Reza Naroui Rad^{2*}, Hamid Reza Ganjali³, Hossein Kamaladini⁴, Hamid Reza Mobaser³

¹ Ph.D. Student in Plant Breeding, Department of Agriculture, Zahedan Branch, Islamic Azad University, Zahedan, Iran

² Horticultural Research Department, Agricultural and Natural Resources Center of Sistan, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Zabol, Iran

³ Department of Agriculture, Islamic Azad University, Zahedan Branch, Zahedan, Iran

⁴ Department of Biology, College of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran

*Corresponding Author: mr.narouirad@areeo.ac.ir

Received: 29 January 2022

Accepted: 21 February 2022

DOI: 10.22034/CSRAR.2022.327080.1187

Abstract

Introduction: Awareness of the extent of genetic diversity based on molecular markers is a rapid method that plays an important role in breeding programs. *Cucumis melo* L. is the scientific name for a melon that belongs to the Cucurbitaceae family (Kirkbride, 1993). This plant is a popular garden crop in warm and temperate climates across the globe, and Iran ranks fourth in the world in terms of output (FAOSTAT, 2019). Although several studies were conducted on the genetic structure of Iranian melons using various molecular markers including RAPD molecular markers (Feizian, 2004), ISSR (Maleki *et al.*, 2018) and SSR microsatellite markers (Moayedi Nejad *et al.*, 2010; Raghani *et al.*, 2014) in recent years, due to the history of planting and the presence of huge genetic resources of melon, which makes Iran as one of the main centers of diversity of this crop in the world, research is inadequate.

Materials and Methods: Forty native melon stands used in this research were prepared from the melon germplasm of Iran Gene Bank. 4-5 leaves from each plant at the two- to three-leaf stage were collected and kept in a freezer at -80°C until DNA extraction. Their genomic DNA was extracted using the ZandBio plant kit. The markers used in this research were selected based on previous studies that were suggested by different researchers. Gradient PCR Vapo Protect thermocycler was used for polymerase chain reaction. PCR products were electrophoresed on 1.8% agarose gel in 1X TBE buffer and at 85 V for one hour. Observation and photographing of the gel was done with the help of UV-2100 geldoc device. Bands were scored as zero (not seeing a band) and one (observing a band). Evaluation of cluster analysis and genetic parameters such as observed heterozygosity, expected heterozygosity and number of effective alleles were obtained through Ntsys 2.1 and Popgene 1.32 software. To estimate the number of subpopulations (K) and distinguish pure and mixed genotypes, it was done using Structure software version 2.3 and using the Bayesian method (Pritchard *et al.*, 2000).

Results and Discussion: All gene loci except CMCT44 primer were polymorphic. A total of 25 alleles with an average of 1.93 alleles per microsatellite gene locus were observed. The highest amount of polymorphic sites (84.62%) belonged to KC-357009 genotype. The high amount of polymorphic sites confirms the effectiveness of SSR molecular markers in the genetic analysis of the investigated indigenous populations. The average content of polymorphism and expected heterozygosity information was obtained as 0.24 and 0.23, respectively. The observed high homozygosity values with an average of 0.84 indicate the low diversity within the investigated populations, which is a proof of the low level of variation between the populations and the high level of inbreeding. In the investigation of the genetic structure of the populations, the investigated populations were divided into two groups (sub-populations). The results of population structure analysis based on Bayesian method and UPGMA clustering showed that the classification of studied genotypes is independent of their geographical origin.

Conclusion: According to the values obtained from the above parameters, among the studied primers, gene locations CMCCA145, CMGA172 and CMCT134b are recommended for the analysis of melon germplasm collections in future research.

The results of this study can be used in hybridization programs. Crossing between the figures that have the least similarity will lead to the best results in achieving hybrids or achieving maximum separation in the generations after F1. Although genetic distance is not the only effective factor in identifying suitable parents for hybrid production and factors such as compatibility and genetic distance based on morphological traits should also be considered.

Keywords: Genetic structure, Heterozygosity, Local accessions, Molecular markers