دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های منتخب هندوانه بذر آجیلی با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهواره و صفات مورفولوژیکی

فرشته هنری[۱]، سعیدرضا وصال[۲]، نادعلی بابائیان جلودار[۳] و نادعلی باقری[۴]

۱، ۳ و ۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد و استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- استادیار، دانشگاه فردوسی مشهد، (نویسنده مسوول: vessalsr@gmail.com)
تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱

چکیده

هندوانه بذر آجیلی یکی از محصولات مهم درآمدزا در مناطق دیم کاری استان‌های سه گانه خراسان به شمار می‌رود که تاکنون مطالعات چندانی در مورد آن انجام نشده است. در این پژوهش تنوع ژنتیکی بین پنج ژنوتیپ منتخب هندوانه بذر آجیلی به همراه یک رقم هندوانه تجاری (کریمستون سوییت) از طریق مطالعه صفات مورفولوژیکی و نیز با استفاده از ۱۰ آغازگر ریز ماهواره (SSR) مورد ارزیابی قرار گرفت. ۱۴ صفت مورفولوژیکی طی ۴۵ روز از دوره رشدی گیاه مورد ارزیابی و آنالیزهای آماری قرار گرفت. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی براساس داده‌های مورفولوژیکی، ژنوتیپ‌ها را در سه گروه مجزا تفکیک کرد. ژنوتیپ‌های C_1 و C_{14} در یک گروه، C_8 و SW در گروه بعدی و C_2 و C_5 در گروه سوم قرار گرفتند. با تکثیر DNA ژنومی بوسیله آغازگرها و الکتروفورز محصولات حاصل، در مجموع ۷۶ آلل تولید شد که از میان آن‌ها، ۴۲ آلل چند شکل بودند. میانگین تعداد آلل‌های چند شکل به ازای هر مکان ژنی ۶ بود که در دامنه ۸-۲ قرار داشت. محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) نیز بین ۰/۴۶ تا ۰/۸۵ متغیر بود. آنالیز خوشه‌ای براساس الگوریتم روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی (UPGMA) و ضریب تشابه جاکارد برای داده‌های مولکولی، ژنوتیپ‌ها را در سه خوشه اصلی قرار داد. دو ژنوتیپ C_2 و C_5 هرکدام در یک خوشه مجزا قرار گرفتند که گویای حداکثر تفاوت ژنتیکی آن‌ها با سایر ژنوتیپ‌ها است. در این دندروگرام ژنوتیپ‌های C_8 و C_{14} از لحاظ ژنتیکی نزدیکی بالایی به هم داشتند. نمودار پراکنش ژنوتیپ‌ها براساس دو معیار تشابه جاکارد و ضریب همبستگی کوفنتیک نیز وجود تفاوت ژنتیکی قابل توجه بین ژنوتیپ‌های C_2 و C_5 را با سایر ژنوتیپ‌ها تأیید کرد. در مجموع داده های حاصل از این آزمایش بیانگر وجود تنوع قابل ملاحظه میان این ژنوتیپ‌ها از هر دو جنبه مورفولوژیکی و مولکولی بود که برای اهداف گزینش و به نژادی این محصول می‌تواند بسیار مهم باشد.

واژه‌های کلیدی: هندوانه بذرآجیلی، تنوع ژنتیکی، صفات مورفولوژیکی، ریزماهواره، تشابه جاکارد، ضریب همبستگی کوفنتیک

مقدمه

هندوانه با نام علمی *Citrullus lanatus* گیاهی دیپلوئید (۲n=۲x=۲۲) از خانواده کدوئیان (*Cucurbitaceae*) است (۲۰). خاستگاه آن آفریقا بوده اما با سابقه کشت و کار بسیار طولانی در کشورهای آسیایی و در سراسر جهان نیز پراکنده شده است (۵). در انواع بذر آجیلی هندوانه، بذرها بو داده و به عنوان آجیل مصرف شده و از پوست میوه برای خوراک دام استفاده می‌شود. پوست آن حتی در کشورهای آفریقایی شور یا شیرین شده و توسط انسان استفاده می‌گردد (۲۰). میزان تولید جهانی هندوانه در سال ۲۰۱۱، حدود ۱۰۲ میلیون تن بوده که بیش از نیمی از آن در آسیا تولید شده است و ایران با تولید سالانه دو میلیون تن در رتبه چهارم جهانی قرار گرفته است (۶).

بذر آجیلی هندوانه با عنوان تخمه ژاپنی یکی از اجزای اصلی اکثر آجیل‌ها را تشکیل می‌دهد. بسیاری از افراد، منشاء آن را به خاطر نامش ژاپن می‌دانند، اما اولین بار در جاپان (روستایی در منطقه دماوند) تولید شد و وجه تسمیه آن نیز نام این روستا است. این نام بعدها جهت راحتی تلفظ به ژاپنی تغییر یافته است. تخمه جاپانی در واقع همان بذر هندوانه‌هایی موسوم به بذر-آجیلی است که برای استحصال بذر جهت مصارف آجیلی و نیز پوست آن جهت خوراک دام کشت می‌شوند (۲). این نوع هندوانه یکی از محصولات درآمدزای دیم‌کاری‌های مناطق مختلف استان‌های سه‌گانه خراسان را تشکیل داده و در استان‌های جنوبی کشور نیز کشت می‌شود (۱۷). با این حال، آمار دقیقی از سطح زیر کشت این محصول در دسترس نیست.

تعیین میزان تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی، گام اولیه برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی و نیز پایه اساسی برای تحقیقات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی است (۲۶). اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی در پدیده هتروزیس و تولید بذور هیبرید بسیار مهم و اساسی است (۱۶). ارزیابی سنتی تفاوت‌های ژنتیکی و مدیریت ژرم‌پلاسم عموماً بر پایه توصیف‌های مورفولوژیکی بوده که علاوه بر محدودیت، تحت تأثیر محیط نیز قرار می‌گیرند. بنابراین بکارگیری روش‌های قابل اطمینان برای شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها به عنوان راهکار مکمل، ضروری به نظر می‌رسد (۲۷).

نشانگرهای مولکولی (DNA) یکی از ابزارهای مورد اطمینان و فارغ از تأثیرات محیطی برای ارزیابی خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب گیاهان برتر و نیز بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف هستند (۲۵،۱۳). در میان نشانگرها، بعد از

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]
[DOI: 10.29252/jcb.9.22.14]

SNPها که برای مطالعه چندشکلی‌ها بسیار هزینه بردار می‌باشند، یکی از بهترین گزینه‌ها، ریزماهواره‌ها هستند (۲۷). این نشانگرها به دلیل قابلیت تغییر در تعداد واحدهای تکراری، بسیار چندشکل بوده و به همین علت به عنوان نشانگرهای مهم در نقشه یابی ژنتیکی استفاده می شوند (۱۲). از مزایای این نشانگر می توان به هم‌بارز بودن، قابلیت اعتماد بیشتر و تکرار پذیری نتایج آن اشاره کرد (۲۴).

طی سال‌های گذشته مطالعات متنوعی روی هندوانه خوراکی و سایر کدوئیان برای ارزیابی سطح تنوع موجود در نقاط مختلف کشور انجام گرفته است. یکی از آن‌ها در زمینه ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در هندوانه‌های بومی و خوراکی کشور است که در سال ۱۳۸۵ توسط کیانی و جهانبین با رویکرد بیومتری انجام شد. در این مطالعه با جمع آوری تعداد زیادی نمونه و انجام دسته‌بندی خوشه‌ای بر اساس صفات مورفولوژیکی، ژنوتیپ‌ها در ۸ دسته متمایز قرار گرفتند که بیانگر تنوع نسبتاً بالا بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود (۱۱). ناروئی‌راد و همکاران نیز با انجام مطالعه‌ای مشابه روی توده‌های محلی هندوانه سیستان و تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر صفات مورفولوژیکی، آنها را در چهار گروه متمایز دسته‌بندی کردند (۲۲).

البکای و همکاران (۴) هشت کولتیوار جمع‌آوری شده هندوانه از مناطق خشک تونس را بر پایه صفات مورفولوژیکی میوه ارزیابی و آنها را در دو گروه مجزا تقسیم‌بندی کردند. مؤیدی نژاد و همکاران (۱۸) با مطالعه تنوع ژنتیکی برخی از توده‌های محلی طالبی ایرانی و خوشه‌بندی آن‌ها براساس ضریب نی (۲۳)، وجود تفاوت ژنتیکی قابل توجه میان طالبی‌های ایرانی و رقم‌های خارجی را اثبات کردند.

در مطالعه تنوع ژنتیکی ۴۵ رقم هندوانه آمریکایی بوسیله ۲۵ آغازگر RAPD ۲۸۸ باند واضح و قابل تشخیص را تکثیر شد (۱۴).

در دو مطالعه جداگانه که برای آنالیز تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های هندوانه به کمک نشانگرهای ریزماهواره انجام گرفت اطلاعات حاصل از این نشانگرها برای ارزیابی تفاوت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها بسیار سودمند بود (۲۷،۱۳). موجاجو و همکاران (۲۰) از نشانگرهای بارز RAPD و هم‌بارز SSR برای ارزیابی ژرم‌پلاسم هندوانه‌های آفریقایی استفاده کردند و با تلفیق اطلاعات حاصل از دو نشانگر، به اطلاعات دقیق‌تری دست یافتند. بالاتر بودن ارزش‌های بدست آمده برای نشانگرهای ریز ماهواره در اغلب پارامترهای بدست آمده حاکی از کارآیی بالای این نشانگرها در ارزیابی تنوع ژنتیکی است.

از آن‌جاکه تاکنون مطالعات متعدد صورت گرفته در زمینه تنوع مورفولوژیکی و نیز آزاد سازی در رقم‌های خوراکی و تجاری هندوانه متمرکز بوده است (۲۲،۱۱،۸) و تحقیقات با رویکرد بهنژادی بر روی نوع بذر آجیلی هندوانه با توجه به اهمیت آن بسیار اندک بوده است. لذا در این پژوهش تنوع ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های منتخب هندوانه بذر آجیلی استان‌های خراسان و تعیین قرابت ژنتیکی بین آن‌ها با کمک نشانگرهای مولکولی ریزماهواره و نیز بررسی‌های مورفولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش از پنج ژنوتیپ منتخب هندوانه بذر آجیلی که طی مطالعات مورفوفیزیولوژیکی قبلی (داده‌ها در حال انتشار)، از اختلافات نسبتاً بیشتری با سایر ژنوتیپ‌ها برخوردار بوده‌اند، برای ارزیابی تنوع ژنتیکی از طریق مطالعه صفات مورفولوژیکی و مطالعات مولکولی با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره استفاده شد. آزمایش در نیمه اول سال ۹۳ در مزرعه تحقیقاتی و آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به انجام رسید. قابل ذکر است که به دلیل بالا بودن درصد دگرگشنی در هندوانه، این ژنوتیپ‌ها برای حفظ تنوع موجود از قبل خودگشن شده بودند و از بذور خودگشن شده برای ارزیابی تنوع استفاده شد. یک رقم هندوانه تجاری (کریمستون سوییت) نیز برای مقایسه تفاوت بین هندوانه‌های خوراکی و بذر آجیلی به این پنج نمونه اضافه شد.

ژنوتیپ‌های منتخب در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار کشت شده و به لحاظ ویژگی‌های ظاهری طی ۴۵ روز پس از سبز شدن و برای ۱۴ صفت یادداشت‌برداری شدند. پارامترهای مورد مطالعه شامل طول برگ کوتیلدونی، تعداد برگ‌ها در هفته‌های مختلف، تعداد ساقه‌های اصلی و فرعی در طی گذر زمان، تعداد گل‌های نر و ماده بر روی هرکدام از ساقه‌های اصلی و فرعی، تعداد گره‌های ساقه‌های اصلی و فرعی، محل ظهور اولین گل‌ها (شماره گره) و غیره بود.

به منظور بررسی‌های مولکولی نیز تعداد ۱۵ بذر از هر یک از ژنوتیپ‌های انتخابی جوانه‌دار شده و در پنج گلدان (تکرار) کشت و در شرایط گلخانه تا مرحله چهار برگی پرورش داده شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA برای هر ژنوتیپ مطابق با مطالعات قبلی (۱۳) به صورت مخلوط انجام گرفت.

بدین صورت که برای هر کدام از ژنوتیپ‌ها، در مرحله ۳-۲ برگی از پنج تکرار، نمونه برگی تهیه شده و با سهم یکسان با هم مخلوط و آسیاب شدند. استخراج DNA به روش CTAB با اندکی تغییرات و با استفاده از آنزیم Rnase برای حذف RNA انجام شد.

پس از تعیین کمیت DNA استخراج شده بوسیله اسپکتروفتومتر و نیز کیفیت آن با استفاده از ژل آگارز، غلظت آن برای استفاده در واکنش PCR در حد ۲۵ ng/µl تنظیم شد.

تکثیر ریزماهواره‌ها

برای تکثیر مکان‌های ریز ماهواره از آغازگرهای SSR بکار رفته در مطالعه موجاجو و همکاران (۲۱) و آغازگر ASUW13 حاصل از مطالعه لوی و همکاران (۱۵) با

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.14]

بیشترین میزان چند شکلی مطابق با جدول ۲ برای ارزیابی تنوع استفاده شد. سنتز آغازگرها توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی[1] و به سفارش شرکت دنازیست[2]، واقع در دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

انجام واکنش PCR

واکنش PCR با حجم ۱۰ میکرولیتر طبق توصیه موجاجو و همکاران (۲۰) و با اندکی تغییرات شامل ۵ میکرولیتر مستر میکس رد[3] ساخت شرکت آمپلیکون، ۲ میکرولیتر نمونه DNA با غلظت ۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر، ۰/۳ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیش رو و برگردان و ۲/۴ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز[4] صورت گرفت. واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه و پس از آن ۳۵ چرخه شامل ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای مناسب برای هر جفت آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه (جدول ۲)، بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان چرخه ها، بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت.

الکتروفورز محصولات PCR

محصولات PCR طبق توصیه موجاجو و همکاران (۱۸) در ژل آگارز ۲٪ به مدت ۲ ساعت با شدت جریان ۸۰ میلی آمپر الکتروفورز شدند. در هر چاهک به میزان ۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۳ میکرولیتر گرین ویور ۰/۵ درصد بکار رفت.

تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیکی

تجزیه واریانس برای شش صفت از مجموع ۱۴ صفت در سطح احتمال یک و پنج درصد معنی‌دار شد که این موضوع بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار میان ژنوتیپ‌ها به لحاظ ظاهری است. آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) به کمک نرم‌افزار Minitab ver.16 براساس صفات دارای تنوع در جدول تجزیه واریانس انجام و ژنوتیپ‌ها از طریق نمودار بای پلات دسته‌بندی شدند (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی

به منظور شمارش باندهای مربوط به هر نشانگر، شماره‌گذاری از بالاترین و سنگین ترین باند به سمت پایین و سبک‌ترین باند انجام شد (۲۰). پس از شماره‌گذاری باندها، امتیازدهی به آن‌ها براساس حضور باند (یک) و عدم حضور باند (صفر) صورت گرفت و داده‌های حاصل به وسیله نرم‌افزار NTSYS ver.2.02 مورد آنالیز قرار گرفت. براساس محاسبات، ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA به عنوان سازگارترین ضریب تشابه و الگوریتم خوشه‌بندی تعیین شد.

محتوای اطلاعات چند شکلی یا شاخص تنوع PIC برای هر جفت آغازگر بوسیله فرمول ($PIC= 1-\sum Pi^2$)، (۳) محاسبه شد. در این فرمول Pi فراوانی آللiام در یک مکان ریزماهواره است که برای n آلل بسط داده می‌شود.

درصد چند شکلی ژنوتیپ‌ها با استفاده از فرمول $PL= (PA/TA)\times100$ محاسبه شد (۲۰)، که در آن، PL درصد چندشکلی، PA تعداد آلل‌های چند شکل و TA تعداد کل آلل‌های مشاهده شده برای هر ژنوتیپ است (جدول ۳).

نتایج و بحث

تنوع مورفولوژیکی

در بررسی تنوع مورفولوژیکی به کمک آنالیز جز اصلی، سه مؤلفه اول در مجموع ۸۰٪ درصد از تنوع کل موجود را توجیه نمود (جدول ۱). به منظور پرهیز از پیچیدگی و بروز نتایج منفی احتمالی، نمودار بای پلات برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه رسم شد (شکل ۱). در دیاگرام دو بعدی براساس مؤلفه اول و دوم، وکتورها مربوط به ژنوتیپ‌ها است. براساس این نمودار ژنوتیپ‌ها در سه گروه مشخص گروه بندی شدند. بطوری که دو ژنوتیپ C_1 و C_{14} در یک گروه قرار گرفت. دو ژنوتیپ C_8 و SW در گروه بعدی و ژنوتیپ‌های C_2 و C_5 نیز در گروه سوم واقع شدند (شکل ۱). صفاتی که در مؤلفه اول قرار گیرند بیشترین تأثیر را در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به لحاظ ویژگی‌ها و صفات مورفولوژیکی خواهند داشت. واریانس تجمعی سه مؤلفه اصلی (اول) بیانگر میزان تغییراتی است که در میان داده‌ها قابل توجیه است که هرچه مقدار آن بالاتر باشد انجام آنالیز به مؤلفه‌های اصلی کار آمدتر بوده است (۲۱). بر این اساس در مطالعه حاضر، صفات اصلی توجیه‌کننده این تغییرات تعداد ساقه‌های فرعی در هفته ششم اندازه‌گیری و تعداد گل‌های ماده ظاهر شده روی ساقه اصلی بودند که در مؤلفه اول قرار گرفتند.

در مطالعه هو و همکاران (۸) تجزیه به مؤلفه‌ها توانست در مجموع ۷۳٪ از تغییرات کل را توجیه کند که در مقایسه با مطالعه حاضر سطح کمتری از تغییرات را توجیه کرده است. البکای و همکارانش (۴) نیز در مطالعه روی ارقام محلی جمع‌آوری شده هندوانه از مناطق خشک تونس برای بررسی تنوع صفات زراعی از روش PCA برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها استفاده کردند که استفاده از این روش در این مطالعه نیز همانند پژوهش حاضر بسیار کارامد بوده و ۷۴/۶٪ از تغییرات کل را بازگو نمود و بر اساس آن ارقام محلی آنها به دو گروه مجزا تفکیک شدند.

تنوع مولکولی

در بخش بررسی تنوع مولکولی، با انتخاب مناسب، همه ۱۰ آغازگر SSR مورد استفاده در این پژوهش با موفقیت مکان‌های ژنی ریزماهواره را در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تکثیر نمودند که حاکی از کارایی نشانگرهای انتخاب شده برای ژنوتیپ‌های مورد بررسی است (شکل ۴). با این حال، سه آغازگر P_1، P_7 و P_{10} نتوانستند باند چند شکل تولید کنند و به عبارت دیگر باند متمایزی برای آنها در بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد.

در شش ژنوتیپ مورد مطالعه، در مجموع ۷۶ آلل بوسیله ۱۰ آغازگر تولید شد که از میان آن‌ها، ۴۲ آلل چند شکل بودند. آغازگرهای P_1 و P_7 تنها یک باند تولید کردند که در تمام شش ژنوتیپ مورد مطالعه مشترک بود. آغازگر شماره ۱۰ (P_{10}) نیز با تولید ۱۲ باند اما مشترک میان تمام ژنوتیپ‌ها، نتوانست علی‌رغم تولید آلل‌های متعدد، در بررسی تنوع میان ژنوتیپ‌های مورد نظر مفید باشد.

1- MACROGEN Advancing through Genomics
2- DENA ZIST asia
3- Red master mix-Amplicon
4- Nuclease free water

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]
[DOI: 10.29252/jcb.9.22.14]

جدول ۱- نتایج آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)

Table 1. The results of Principal Component Analysis (PCA)

مؤلفه‌ها	مقادیر ویژه	واریانس نسبی	واریانس تجمعی
۱	۲/۷۴	۰/۴۰	۰/۴۰
۲	۱/۷۶	۰/۲۴	۰/۶۴
۳	۱/۰۳	۰/۱۵	۰/۸۰

میانگین تعداد آلل‌های چند شکل در سایر آغازگرها، شش باند و در دامنه ۸-۲ آلل متغیر بود. محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) آغازگرها که تابعی از تعداد و فراوانی آلل است (۱۲) در دامنه ۰/۸۵-۰/۴۶ قرار گرفت. در مطالعه ژانگ و همکاران (۲۶) که برای آنالیز تنوع ژنتیکی هندوانه از ۲۳ مارکر ریزماهواره استفاده شده بود، نیز میانگین تعداد آلل‌های چند شکل در دامنه ۷-۲ آلل قرار داشت و محتوای اطلاعات چند شکل از ۰/۴۵ تا ۰/۸۲ متغیر بود. همچنین در پژوهش موجاجو و همکاران (۲۰) که ۹۰٪ آغازگرهای این پژوهش نیز از این منبع انتخاب شد، محتوای اطلاعات چند شکل در دامنه ۰/۹۷ - ۰/۳۹ قرار گرفت که نتایج هر دو پژوهش به نتایج بررسی حاضر بسیار نزدیک است که می‌تواند تأییدی بر کارایی نشانگرهای توصیه شده برای ارزیابی میزان تنوع ژنوتیپ‌های هندوانه در نقاط مختلف جهان می‌باشد. به دلیل تأیید مجدد این نشانگرها در مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد که بتوان از این نشانگرها در برنامه‌های اصلاحی هندوانه برای گزینش غیرمستقیم به منظور بهبود و اصلاح صفات استفاده نمود (۷). بالاترین میزان PIC مشاهده شده مربوط به P_3 (۰/۸۵) بود و کمترین میزان برای P_9 (۰/۴۶) مشاهده شد. میانگین محتوای اطلاعات چند شکل بین هفت آغازگر، ۰/۷۲ بدست آمد. در شش مورد محتوای اطلاعات چند شکل بزرگتر از ۰/۵ بود (PIC>۰/۵) که این نشانگرها، جزو موارد مطلوب برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه دسته‌بندی شدند (۱۳). در مطالعه موجاجو و همکاران (۲۰)، بالاترین میزان PIC (۰/۹۷) در بین آغازگرها، مربوط به آغازگر متناظر P9 در این پژوهش بود، در صورتی که در بررسی حاضر، این نشانگر کمترین میزان PIC (۰/۴۶) را به خود اختصاص داد که نشان‌دهنده وجود تفاوت ژنتیکی قابل ملاحظه بین ژنوتیپ‌های مطالعه شده در دو پژوهش است.

رسم ماتریس تشابه جاکارد بوسیله نرم‌افزار NTSYS ver.2.02 برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد که بیشترین میزان شباهت و نزدیکی بین ژنوتیپ‌های C_8 و C_{14} (۰/۶۹) و کمترین میزان شباهت بین ژنوتیپ‌های C_1 و C_2 (۰/۱۷) وجود داشت. رقم هندوانه کریمستون سوییت نیز کمترین شباهت را با C_5 (۰/۱۱) و بیشترین شباهت و نزدیکی را با ژنوتیپ C_8 (۰/۵۰) نشان داد.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

Table 2. Specifications of primers used

نام آغازگر	توالی آغازگر	موتیف SSR	دمای اتصال	تعداد آلل‌های مشاهده شده	تعداد آلل‌های چند شکل	محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)*
P2-F	AAGGCTGCAGAGACCATGAC	$(AAG)_5$	۵۰	۷	۵	۰/۷۱
P2-R	GAACGGGCAAGAAGTAGTAA	$(ATC)_8$				
P3-F	AATGTTAAGCAGTAAGCACATGG	$(AAG)_9$	۵۶	۱۰	۸	۰/۸۵
P3-R	GTTAAGTGGAAGAGGCCACA					
P4-F	GCATAAACCACCTGTGAGTGG	$(TG)_8$	۵۵	۷	۷	۰/۷۶
P4-R	CTTTACTTTGCGTTTCGGTA					
P5-F	GGAGTAGTGGTGGAGACATGG	$(AAG)_9$	۵۰	۹	۶	۰/۸۲
P5-R	CTTCAAACGCTTTCTCTTTCCT	$N_{69}(AT)_{26}$				
P6-F	AATCTTCCCCATGCCAAAAC	$(AAT)_9$	۵۲	۸	۷	۰/۶۵
P6-R	CTTCCCTCCCAAACCTTCAG					
P8-F	TTCCTGTTTCATGATTCTCCAC	$(AG)_{25}$	۵۵	۷	۷	۰/۷۸
P8-R	GTTCAATTACCGAGGTAAGACT					
P9-F	TCAAATCCAACCAAATATTGC	$(AAT)_{15}$	۴۹	۵	۲	۰/۴۶
P9-R	GCAACCACTACAAAGGAAGAG					

جدول ۳- درصد چند شکلی ژنوتیپ‌ها

Table 3. Polymorphic percentage of the genotypes

ژنوتیپ	C_1	C_2	C_5	C_8	C_{14}	sw
کل آلل‌های مشاهده شده *	۴۵	۳۲	۳۱	۴۸	۴۶	۵۹
آلل‌های چند شکل	۲۰	۷	۷	۲۳	۲۰	۳۴
چند شکلی (٪)	۴۴	۲۱	۲۲	۴۷	۴۳	۵۷

*: تعداد کل آلل‌های حاصل برای هر ژنوتیپ بوسیله ۱۰ آغازگر مورد استفاده

درصد چندشکلی رقم هندوانه کریمستون سوییت (SW) بوسیله آغازگرهای مورد استفاده بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها (۵۷٪) بوده است. که می‌تواند به دلیل طراحی اولیه این پرایمرها برای ژنوتیپ‌های هندوانه شیرین باشد (۹). با این حال، این آغازگرها در بررسی تنوع ژنوتیپ‌های بذر آجیلی در این آزمایش نیز بسیار کارآمد عمل کرده‌اند.

در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ver.2.02 و براساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد (شکل ۲) ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند. گروه اول و دوم به صورت تک شاخه و به ترتیب شامل ژنوتیپ‌های C_5 و C_2 بود. اما گروه سوم ابتدا به دو زیر شاخه a و b تقسیم شد. زیر شاخه a نیز به ژنوتیپ SW ختم شد، اما زیر شاخه b

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.14]

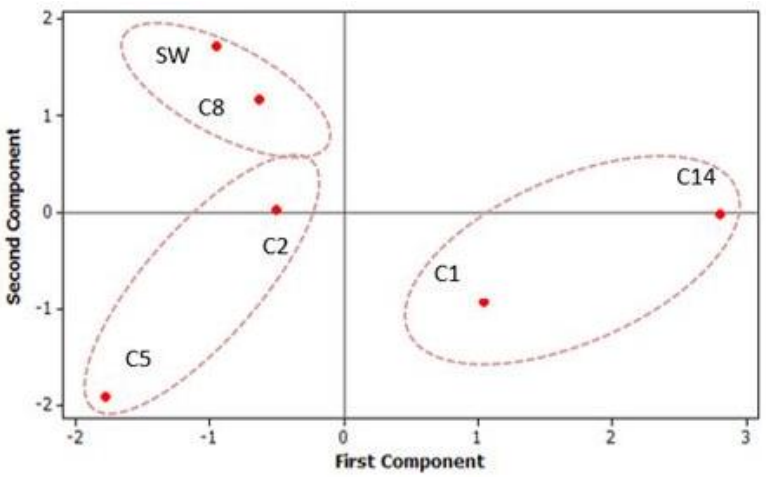
مجدداً به دو بخش تفکیک شد و بخش c به ژنوتیپ C_1 منتهی شد. در نهایت زیر شاخه d به یک خط عمودی که دو ژنوتیپ C_8 و C_{14} را در بر می‌گرفت، متصل گردید.

بنابراین براساس نتایج ضرایب تشابه بین ژنوتیپ‌ها و دندوگرام تجزیه خوشه‌ای حاصل، می‌توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ‌های C_2 و C_5 حداکثر تفاوت ژنتیکی را با ژنوتیپ‌های مورد بررسی با توجه به داده مولکولی داشته‌اند که در گروه‌های کاملاً مجزا با سایر ژنوتیپ‌ها قرار گرفته‌اند. در خوشه سوم روابط بین ژنوتیپ‌ها نزدیک‌تر و زنجیره‌ای شده است که این موضوع حاکی از قرابت بیشتر این چهار ژنوتیپ نسبت به یکدیگر در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها است. به‌طوری که دو ژنوتیپ C_8 و C_{14} از لحاظ ژنتیکی بسیار نزدیک به هم تشخیص داده شد و هر دو با ژنوتیپ C_1 خویشاوندی نزدیکی نشان دادند (شکل ۲). در زیر شاخه بعدی این سه ژنوتیپ (C_1، C_8 و C_{14}) با رقم هندوانه شیرین کریمستون سوییت ارتباط یافته اند که نشان دهنده قرابت کلی آنها با یکدیگر است.

در اغلب مطالعاتی که تاکنون روی ژرم پلاسم هندوانه انجام شده است، سطح تنوع مولکولی بین ژنوتیپ‌های هندوانه پایین گزارش شده است (۲۰،۱۳). اما در پژوهش حاضر دو ژنوتیپ C_5 و C_2 به طور مجزا در شاخه‌هایی جداگانه قرار گرفته‌اند که این موضوع بیانگر تفاوت ژنتیکی قابل توجه آنها با سایر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. این تفاوت در سطح مورفولوژیکی بوته و میوه، قبلاً در مزرعه نیز به وضوح دیده شد (داده‌ها در حال انتشار). لذا از نظر به‌نژادی یک مزیت مهم بوده و امکان گزینش را افزایش می‌دهد. برای مطالعه جزئی تر پراکنش ژنوتیپ‌ها به لحاظ ژنتیکی، از آزمون مانتل که اساس آن مقایسه دوتایی ژنوتیپ‌ها براساس دو معیار تشابه جاکارد و ضریب همبستگی کوفنتیک است، استفاده گردید (۱۹). نمودار حاصل میزان قرابت و خویشاوندی بین ژنوتیپ‌ها را به صورت کمی و تصویری نشان می‌دهد (شکل ۳). به‌طوری که هرچه نقاط مقایسه‌ای بین دو ژنوتیپ مشخص در سمت راست و بالاتری قرار گیرند میزان خویشاوندی ژنوتیپ‌ها و تشابه ژنتیکی آن‌ها افزایش می‌یابد. بنابراین دو ژنوتیپ C_8 و C_{14} که در نقطه انتهایی و بالایی دو محور قرار گرفته اند بیشترین میزان تشابه ژنتیکی را با هم داشته‌اند. همان طور که در شکل ۳ مشخص شده است، ضریب همبستگی کلیه ژنوتیپ‌ها با ژنوتیپ C_5، کمترین مقدار و برابر با ۰/۱۹ بوده است. به عبارت دیگر، تمام ژنوتیپ‌ها کمترین میزان همبستگی ژنتیکی را نسبت به ژنوتیپ C_5 داشتند که این موضوع نشان‌دهنده اختلاف ژنتیکی زیاد C_5 با سایر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. علاوه بر C_5، قرارگیری نقاط مقایسه‌ای ژنوتیپ C_2 با دیگر ژنوتیپ‌ها در قسمت‌های پایینی و چپ شکل ۲، نیز حاکی از تفاوت بیشتر و همبستگی ژنتیکی کم این ژنوتیپ با سایر ژنوتیپ‌ها می‌باشد و تأیید مجدد بر صحت نتایج دندروگرام خوشه‌ای رسم شده برای ژنوتیپ‌های مورد بررسی است.

براساس مطالب فوق، بین نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی تفاوت‌ها و شباهت‌هایی مشاهده شد که در بسیاری منابع وجود تفاوت‌ها به دلیل تأثیر عوامل محیطی روی فنوتیپ گیاهان عنوان شده است. از جمله شباهت‌های بین نتایج دو روش می‌توان به قرابت دو ژنوتیپ C8 و SW، تشابه بالای ژنوتیپ‌های C_1 و C_{14} و همچنین فاصله زیاد ژنوتیپ C5 از سایر ژنوتیپ‌ها اشاره کرد.

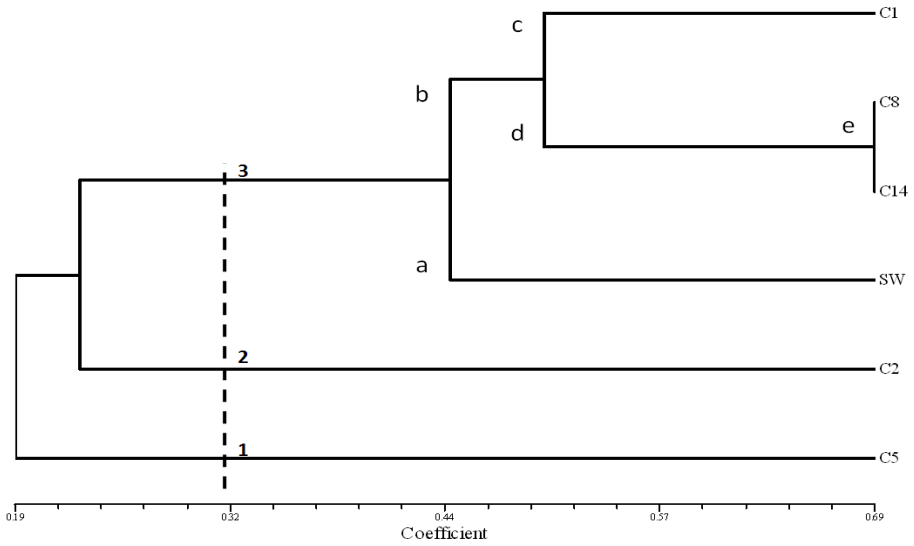
بطور کلی نتایج حاصل از این مطالعه، نه تنها مانند مطالعات مشابه انجام شده قبلی (۲۷،۲۰،۱۳،۱۰) بر کارایی نشانگرهای ریزماهواره در ارزیابی سطح تنوع ژنتیکی تأکید کرد، بلکه وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را از لحاظ مورفولوژیکی و نیز مولکولی که منتخبی از ژرم پلاسم این گیاه در استان‌های سه گانه خراسان هستند، به اثبات رسانید. به این ترتیب با مطالعات بیشتر و انتخاب ژنوتیپ‌های برتر می‌توان زمینه تلاقی مؤثر و با هتروزیس بالا جهت تولید و معرفی واریته‌های اصلاح شده این محصول مهم تجاری را فراهم کرد.



شکل ۱- نمودار بای پلات براساس دو مؤلفه اصلی اول
Figure 1. The biplot diagram based on the first two main components

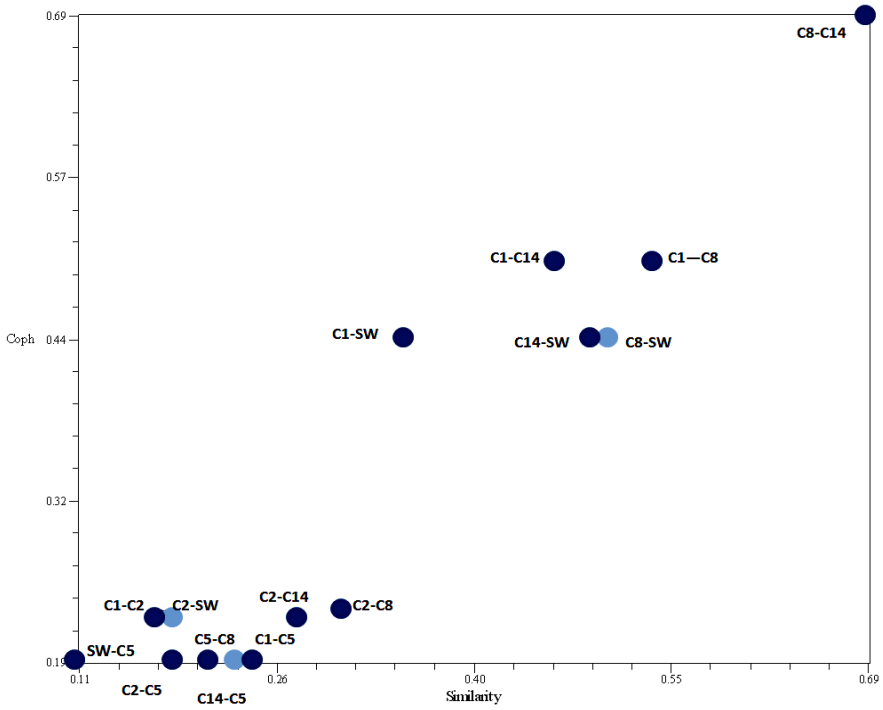
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.14]



شکل ۲- نمودار تنوع ژنتیکی براساس الگوریتم UPGMA و نیز ضریب تشابه جاکارد. برش نمودار از محل میانگین ضریب تشابه جاکارد صورت گرفته است (۱).

Figure 2. The genetic variation dendrogram based on the UPGMA algorithm and Jaccard's similarity coefficient. The cut-off in the dendrogram is based on the average Jaccard similarity coefficient (1)

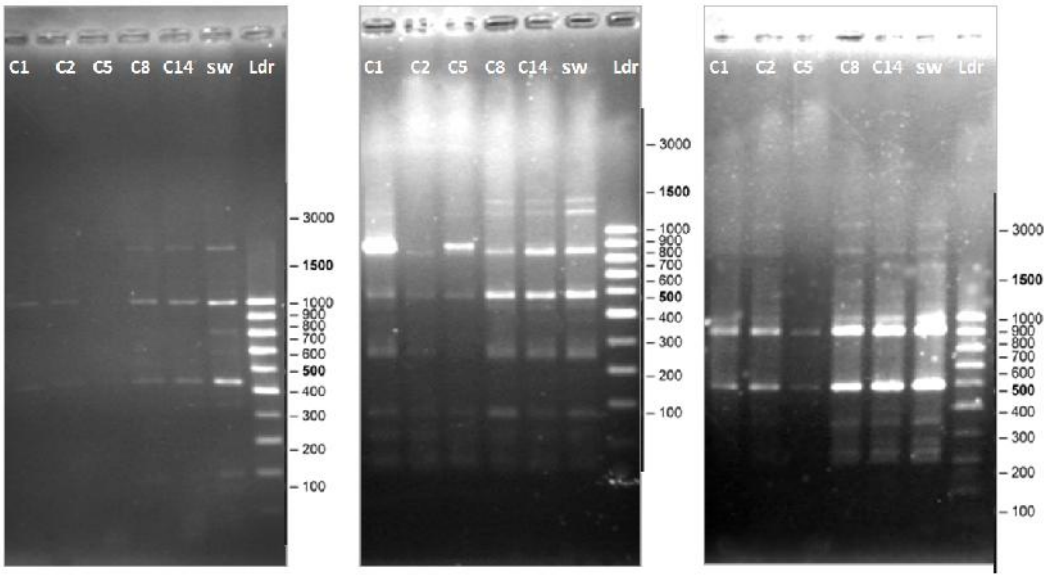


شکل ۳- نمودار پراکنش ژنوتیپ‌ها براساس آزمون مانتل. نقاط معرف مقایسات دوتایی بین ژنوتیپ‌ها براساس دو معیار تشابه جاکارد و ضریب همبستگی کوفنتیک است.

Figure 3. Distribution patterns of the genotypes based on Mantel test. The dots representing binary comparisons between genotypes are based on Jaccard's similarity and cophenetic correlation coefficients

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.14]



شکل ۴- مکان های تکثیر شده بوسیله برخی از پرایمرها (P_3، P_5 و P_8 به ترتیب از سمت راست به چپ)
Figure 4. DNA fragments amplified by some primers (P3, P5 and P8 from right to left, respectively)

منابع

1. Abedinpour, H. 2013. The study of genetic diversity and relationships among a number of local citrus genotypes using phenotypic traits and molecular. M.Sc. Thesis of Agricultural Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. 75 pp (In Persian).
2. Anonymous. 2014. News-Analysis of Industry Nuts. http://nutsnews.ir. (In Persian).
3. Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of genetic linkage map in man using RFLP. American Journal of Human Genetics, 32: 314-331.
4. Elebekkay, M., L. Laarayedh, R. Lamari, H. Hamidi and A. Ferchichi. 2009. Characterization of several local cultivars of Watermelon collected from arid region in Tunisia. Journal of Arid Land Studies, 19: 205-208.
5. Erhihie, E.O. and N.E. Ekene. 2013. Medicinal values on *Citrullus lanatus* (watermelon): Pharmacological review. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 4: 1305-1312.
6. FAO. 2011. FAOSTAT. http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx.
7. Gougerdchi, V., S. Dezhsetan, M. Izadi Dogonchi, M.A. Ebrahimi, A. Asghari and B. Sadeghzadeh. 2017. Assessment of Genetic Diversity and Association Analysis for Phonological Traits Related to Drought Escape in Barley Lines using Microsatellite Markers. Journal of Crop Breeding, 8: 69-60 (In Persian).
8. Huh, Y.C., I. Solmaz and N. Sari. 2008. Morphological characterization of Korean and Turkish Watermelon germplasm. Preceding of IX the EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae, (France), May 21-24.
9. Joobeur, T., G. Gusmini, X. Zhang, A. Levi, Y. Xu, T.C. Wehner, M. Oliver and R.A. Dean. 2006. Construction of a watermelon BAC library and identification of SSRs anchored to melon or *Arabidopsis* genomes. Theoretical Applied Genetics, 112: 1553-1562.
10. Katzir, N., Y. Tzuri, G. Karchi, Z. Lavi and U. Cregan. 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several *Cucurbitaceae* species. Theoretical and Applied Genetics, 93: 1282-1290.
11. Kiani, M and GH, Jahanbin. 2006. Assessment of genetic diversity in native population's watermelon in Iran. Iranian Journal of Agricultural Research, 4: 1-16 (In Persian).
12. Khoramipor S., M. Dehdari and R. Amiri Fahliani. 2017. Study of Genetic Diversity in Sorghum (*Sorghum Bicolar* L.) Genotypes using Microsatellite Markers Journal of Crop Breeding, 8: 123-116 (In Persian).
13. Kwon, Y., Y. Oh, S. Yi, H. Kim, J. An, S. Yang, S. Ok and J. Shin. 2010. Informative SSR markers for commercial variety discrimination in watermelon (*Citrulus lanatus*). Genes & Genomics, 32: 115-122.
14. Levi, A., C. Thomas, A.P. Keinath and T.C. Wehner. 2001. Genetic diversity among watermelon (*Citrullus lanatus and Citrullus colocynthis*) accessions. Genetic Resource and Crop Evolution, 48: 559-566.
15. Levi, A., C.E. Thomas, T. Trebish, A. Salmon, J. Karalius, M. Newman, O.U.K. Reddy, Y. Xu and X. Zhang. 2006. An extended linkage map for watermelon based on SRAP, AFLP, ISSR and RAPD markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 131: 393-402.
16. Liliya, K. 2000. Organization of plant genetic resources in Bulgaria Acta Horticulturae, 510: 247-250.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.14]

17. Mirkazemi, F. 2012. Technical Publication of Watermelon, 1:1-12 (In Persian).
18. Moaiedi nejad, A., A. Ershadi, J. Abas kohpaigani and F. Dashti. 2010. Genetic diversity among iranian cantaloupe landraces (*cucumis melo* L.) using microsatellite markers. Agricultural Biotechnology, 9: 42-52 (In Persian).
19. Mohammadi, M. 2003. Molecular analysis of data from the perspective of genetic variation. 9th Iranian Crop Sciences Congress. Iran- Tehran (In Persian).
20. Mujaju, C., J. Sehic, G. Werlemark, L.Garkava-Gustavsson and M. Fatih. 2010. Genetic diversity in vatermelon (*Citrullus lanatus*) landraces from Zimbabwe revealed by RAPD and SSR markers. Herediats, 147: 142-153.
21. Nabipour, A. and A. Nasr Ala Nejad Ghomi. 2014. Guide research in the life sciences (First Edition). Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, 186 pp (In Persian).
22. Naroei, M., M. Allah do, A. GHasemi and H. Fanaei. 2009. Investigation of Genetic Diversity and Broad Sense Heritability in Watermelon Accessions of Sistan. Iranian Horticultural Science, 40: 95-103 (In Persian).
23. Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5269-5273.
24. Semagn, K., A. Bjørnstad and M.N. Ndjiondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology, 5: 2540-2568.
25. Shi, W., C.F. Yang, J.M. Chen and Y.H. Gou. 2008. Genetic variation among wild and cultivated populations of the Chinese medicial plant Coptis Chinesis (Ranunculaceae). Plant Biology, 10: 485-491.
26. Uzan, A. and T. Yesiloglu. 2012. Genetic divercity in Citrus. In: Genetic Diversity in Plants, Caliskan,M. (Ed.), In Tech, pp: 213-231.
27. Zhang, H., H. Wang and Sh. Guo. 2012. Indentifation and validation of a core set of microsatellite markers for genetic diversity analysis in watermelon, *Citrullus lanatus* Thunb. Matsum. & Nakai. Euphytica, 186: 329-342.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.14]

Assessment of Genetic Diversity for some Candidate Edible Seed Watermelon Genotypes using SSR Markers and Morphological Traits

Fereshteh Honari[1], Saeid Vessal[2], Nad Ali Babaean Jelodar[3] and Nad ali Bagheri[4]

1, 3 and 4- Gradated M.Sc. Student, Professor and Assistant Professor, Sari Agricultural sciences and Natural Resources University
2- Assistant Professor, Ferdowsi University of Mashhad, (Corresponding author: vessalsr@gmail.com)
Received: November 20, 2014 Accepted: December 22, 2015

Abstract

Edible seed watermelon is a cash crop in rain-fed condition in Khorasan provinces, with little research paid to it yet. In this study, genetic variation was evaluated among five candidate genotypes of edible seed watermelon, along with one commercial cultivar (Crimson Sweet) using 10 microsatellite primers (SSR) as well as morphological studies. 14 morphological traits were evaluated and analyzed during 45 days of early plant growth. Principal Components Analysis on morphological data could separate the genotypes into three distinct groups, including C_1 and C_{14} genotypes in one group, C_8 and SW in the next and C_2 and C_5 in the third one. For molecular analysis, genomic DNA was extracted and amplified further by the primers, followed by electrophoresis of the products. A total of 76 clear alleles were produced, of which 42 were polymorphic alleles. Average number of polymorphic alleles per locus was 6, ranging from 2 to 8. Polymorphic information content (PIC) varied within 0.46 to 0.85. Cluster analysis based on Jaccard's similarity coefficient and Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) algorithm classified the genotypes into three main clusters. C_2 and C_5 genotypes placed separately in different cluster that represents high genetic distance from the other genotypes. In this dendrogram, a very close genetic relationship was found between C_8 and C_{14} genotypes. The scatter plot of genotypes based on Jaccard's correlation coefficient and Cophenetic correlation also confirmed a significant genetic difference between both C_2 and C_5 genotypes compared with other genotypes. The data from this experiment suggested a considerable diversity in terms of morphological and molecular aspects among the genotypes, which is very crucial for selection and breeding purposes in this crop.

Keywords: Cophenetic Correlations, Edible seed watermelon, Genetic diversity, Jaccard's similarity coefficient, Microsatellite, Morphological traits

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.14]