



ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختارشناسی توده‌های خربزه وحشی (*Cucumis melo var. agrestis*) حاشیه جنوبی دریای خزر با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP

فاطمه وفادار شام اسبی^۱، علی دهستانی^۲، صابر گلکاری^۳ و مصطفی حق پناه^۴

۱- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران

۲- پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران (نویسنده مسوول: a.dehestani@sanru.ac.ir)

۳- موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران

۴- گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱

چکیده

خربزه وحشی (*Cucumis melo var. agrestis*) که به خربزه آفریقایی شهرت دارد، در سراسر مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان پراکنده است. این گیاه یک گیاه دارویی با خواص متعدد درمانی بوده و همچنین ژرمپلاسم مناسبی برای اصلاح خربزه زراعی محسوب می‌شود. در این بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های خربزه وحشی استان مازندران با استفاده از نشانگر AFLP مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور ۱۶ نمونه خربزه وحشی از نقاط مختلف استان مازندران جمع‌آوری و توسط ۱۰ جفت آغازگر AFLP مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مجموع تعداد ۵۶۴ نوار امتیازدهی گردید که بیش از ۶۸ درصد از آنها چند شکلی نشان دادند. میانگین محتوای اطلاعاتی چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگری (MI) به ترتیب ۰/۲۲ و ۱۵/۵۱ محاسبه شدند و بیشترین شاخص نشانگری (۲۴/۱۹) توسط ترکیب آغازگرهای E-CCA, M-GAG حاصل شد. همچنین بر اساس شاخص تنوع شانون ترکیب آغازگری E-CCA, M-GAG با مقدار (۰/۳۳) بیشترین تنوع را نشان داد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA و همچنین گروه‌بندی به روش بی‌زین، نمونه‌ها را به پنج گروه تقسیم کردند. نتایج پلات مختصات اصلی با گروه‌بندی براساس مدل بی‌زین و تجزیه خوشه‌ای تطابق کامل داشت. تنوع ژنتیکی مشخص شده بوسیله نشانگرهای AFLP در این پژوهش نشان‌دهنده این است که این نشانگر قادر به تفکیک نمونه‌ها و خوشه‌بندی مطابق با محل جغرافیایی است و همچنین می‌تواند برای شناسایی تفاوت‌های درون گونه‌ای در مطالعات تبارشناسی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، خربزه وحشی، روش بی‌زین، نشانگر AFLP

مقدمه

اندک می‌باشد. شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی امری بنیادی برای برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی گیاهان می‌باشد. این اصل در مدیریت حفظ و نگهداری مجموعه‌های ژنتیکی نقش بسزایی دارد. امروزه فناوری نشانگرهای DNA، ابزار مناسبی برای زمینه‌ی طبقه‌بندی و حفاظت ذخایر ژنتیکی گیاهی توسط به‌نژادگران و محققین ژنتیک گیاهی می‌باشد. اطلاع از سطوح تنوع ژنتیکی در برنامه‌های به‌نژادی و حفظ ذخایر توارثی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشند. از این رو استفاده از نشانگرهایی که سطوح بیشتری از تنوع را نشان می‌دهند لازم و ضروری می‌باشد (۲۷). امروزه از نشانگر AFLP (Amplified fragment length polymorphism) بطور گسترده‌ای در مطالعات تنوع ژنتیکی گیاهانی (۱۸) نظیر رازیانه ایرانی (۱۳)، زرشک (۱۴)، گندم (۲۴)، ماریغال (۲۰) استفاده شده است. گارسیا و همکاران (۱۱) به بررسی تنوع ژنتیکی ۶ ژنوتیپ مختلف از ملون‌ها با استفاده از نشانگرهای AFLP، RAPD و RFLP پرداختند و اعلام داشتند که نشانگر AFLP کارایی بالاتری نسبت به سایر نشانگرها داشته است. نشانگر AFLP در سال ۱۹۹۵ توسط وُس و همکاران معرفی شد و اساس آن تکثیر انتخابی برخی از قطعات برش یافته ژنومی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز می‌باشد (۳). این نشانگر، ترکیبی از PCR و RFLP

خربزه وحشی (*Cucumis melo var. agrestis*) متعلق به خانواده Cucurbitaceae، گیاهی است علفی و یکساله با گل‌های تک‌جنسی یا ندرتاً دوجنسی که در محور برگ‌ها تشکیل می‌شوند و به خربزه آفریقایی نیز شهرت دارد (۳). میوه‌ی خام خربزه وحشی طعم تلخ دارد، دانه‌های خام آن غنی از روغن با طعم و عطر مطبوع می‌باشد. دانه‌ها گیاه مذکور حاوی ۱۲/۵-۳۹ درصد روغن خوراکی می‌باشد و از آن‌ها به عنوان داروی ضد کرم برای خروج کرم کدو یا انگل‌های دیگر بدن استفاده می‌شود. امروزه از میوه‌ی آن در مرطوب‌کننده‌ها، پاک‌کننده‌ها و ... نیز استفاده می‌شود. گل‌های این گیاه تا حدی خلط‌آور بوده و در درمان سنتی کاربرد دارد. با توجه به خواص دارویی ذکر شده، مطالعاتی روی خصوصیات بیوشیمیایی این گیاه نیز انجام گردیده است (۲، ۳). دانه‌ی این گیاه حاوی فلزات سنگین بوده، حدود دو برابر موز پتاسیم داشته و سرشار از ویتامین‌های A و C است (۱). مصرف کنندگان خربزه وحشی در ایران از میوه این گیاه هم به صورت تازه و خام در سالاد و ترشی و هم به صورت خشک استفاده می‌کنند. این گیاه در میان خانواده کدویان، مقاومت بالاتری به خشکی، ویروس و بیماری‌های قارچی از خود نشان داده است (۳۲). علی‌رغم خواص ذکر شده این گیاه، مطالعات تنوع ژنتیکی بخصوص در شمال کشور بسیار

طالبی مشاهده گردید. کشور ایران با تاریخ کهن در امر کشاورزی و شرایط اقلیمی متنوع، دارای تنوع ژنتیکی گیاهی بسیار گسترده‌ای می‌باشد، اما متأسفانه در مورد توده‌های بومی و وحشی هنوز اطلاعات کامل و دقیقی موجود نیست (۷). از اینرو این مطالعه به شناخت تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های خربزه وحشی استان مازندران با استفاده از نشانگر AFLP پرداخته است.

مواد و روش‌ها جمع‌آوری نمونه

این تحقیق در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری طی سال‌های ۹۱ تا ۹۲ انجام شد که از ۱۶ نمونه برگ‌ی ژنوتیپ‌های گیاه خربزه وحشی که حاصل جمع‌آوری از نقاط مختلف استان مازندران و گلستان در مرداد ماه ۱۳۹۱ بود، استفاده شد (جدول ۱). تمامی نمونه‌برداری‌ها در همان محل رشد گیاهان انجام گرفته و نمونه‌ها بلافاصله در مخزن ازت قرار داده شدند.

است که قطعات برش یافته توسط آنزیم‌های برشی را بطور تصادفی تکثیر می‌کند (۳۷). از این نشانگرها بدلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد توالی بازی DNA مورد تکثیر، دقت و تکرارپذیری بالا، بطور گسترده در مطالعه‌ی ژرم‌پلاسم‌های گیاهی استفاده می‌شود. از مهم‌ترین کاربردهای نشانگرهای AFLP، مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی، تجزیه مجموعه‌های ژنتیکی، تجزیه فاصله‌ی ژنتیکی و بررسی ژنتیک فرد، شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفت، اشباع نقشه‌های نشانگری، همسانسازی ژن‌ها، تجزیه فیلوژنی و تکامل، شناسایی وارپته‌ها و مطالعه‌ی ژنتیک جمعیت می‌باشند (۲۶).
وانگ و همکاران (۳۷)، نقشه ژنتیکی ملون‌ها را بر اساس سه نشانگر AFLP، RAPD و ریزماهورها بررسی کردند. برای تجزیه و تحلیل ارتباط ژنتیکی بین خربزه‌ها از ۲۲۸ نشانگر استفاده شد. با وجود چند شکلی نسبتاً پایین، نقشه ژنتیکی رسم گردید و این نقشه شامل ۱۹۷ AFLPs، ۶ RAPDs و ۱ ریزماهوره بود که در ۱۴ گروه اصلی و ۶ گروه فرعی قرار گرفتند. بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین توده‌های ارقام تجاری خربزه و طالبی با استفاده از نشانگر AFLP انجام گرفت که ۳۱۸ نوار چندشکل با متوسط ۳۱/۸ به ازای هر ترکیب آغازگری حاصل شد. تنوع حاصله بیشتر در جمعیت

جدول ۱- کد و محل جغرافیایی نمونه‌های خربزه وحشی

Table 1. Accession no. and Geographic location of wild melon genotypes

شماره نمونه	مشخصه نمونه	محل جمع‌آوری نمونه	ارتفاع از سطح دریا	شرقی (طول جغرافیایی)	شمالی (عرض جغرافیایی)
۱	Cma-01	تنکابن	-۴۹	۵۰° ۴۸' ۵۰.۲۳"	۳۶° ۵۰' ۲۴.۳۴"
۲	Cma-02	محمود آباد	-۸۱	۵۳° ۱۵' ۰۱.۸۷"	۳۶° ۳۸' ۰۱.۳۹"
۳	Cma-03	آمل	۳۱۶	۵۳° ۱۹' ۳۲.۱۷"	۳۶° ۲۷' ۳۶.۵۰"
۴	Cma-04	بابل	۶	۵۳° ۳۶' ۲۶.۲۸"	۳۶° ۳۱' ۲۴.۵۰"
۵	Cma-05	قائم‌شهر	۱۸۲	۵۳° ۵۱' ۴۱.۶۸"	۳۶° ۲۷' ۴۴.۲۹"
۶	Cma-06	جویبار	-۲۷	۵۳° ۵۴' ۳۹.۸۳"	۳۶° ۳۸' ۱۲.۴۲"
۷	Cma-07	ساری	۹۴	۵۳° ۰۳' ۴۵.۸۳"	۳۶° ۳۳' ۴۸.۳۲"
۸	Cma-08	سورک	۱۰۹	۵۳° ۱۲' ۲۵.۱۳"	۳۶° ۳۵' ۵۱.۸۰"
۹	Cma-09	نکا	۱۴۱	۵۳° ۱۷' ۲۶.۱۸"	۳۶° ۳۸' ۳۸.۷۴"
۱۰	Cma-10	رستم کلا	۱۰۵	۵۳° ۲۵' ۴۹.۱۳"	۳۶° ۴۰' ۳۰.۴۹"
۱۱	Cma-11	علی تپه (از توابع بهشهر)	۳۷۶	۵۳° ۳۵' ۰۹.۴۵"	۳۶° ۴۰' ۵۵.۸۹"
۱۲	Cma-12	بهشهر	۷۸	۵۳° ۳۲' ۳۰.۳۸"	۳۶° ۴۱' ۲۷.۲۵"
۱۳	Cma-13	خلیل شهر	۳۷۴	۵۳° ۳۸' ۴۷.۶۸"	۳۶° ۴۱' ۰۸.۹۱"
۱۴	Cma-14	لیوان شرقی	۱۸۳	۵۳° ۵۳' ۲۳.۷۸"	۳۶° ۴۲' ۵۶.۸۴"
۱۵	Cma-15	بندرگز	-۶۴	۵۳° ۵۶' ۵۲.۸۵"	۳۶° ۴۶' ۲۶.۵۹"
۱۶	Cma-16	کردکوی	۲	۵۴° ۰۶' ۳۵.۴۵"	۳۶° ۴۷' ۳۱.۰۰"

کلروفرم ایزوآمیل-الکل به محلول اضافه کرده و به مانند قبل سانتریفیوژ شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ فاز رویی برداشته و بار دیگر به مانند قبل با کلروفرم ایزوآمیل الکل شستشو گردید. برای تشکیل پلت DNA از ۴۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد استفاده شد. کمی و کیفیت سنجی DNA حاصله به دو روش اسپکتوفتومتری و ژل آگارز ۰/۷٪ انجام گرفت. رقیق سازی به منظور دستیابی به غلظت مناسب برای واکنش PCR نیز با بر اساس غلظت DNA استخراج شده صورت گرفت.

مراحل اجرای روش AFLP

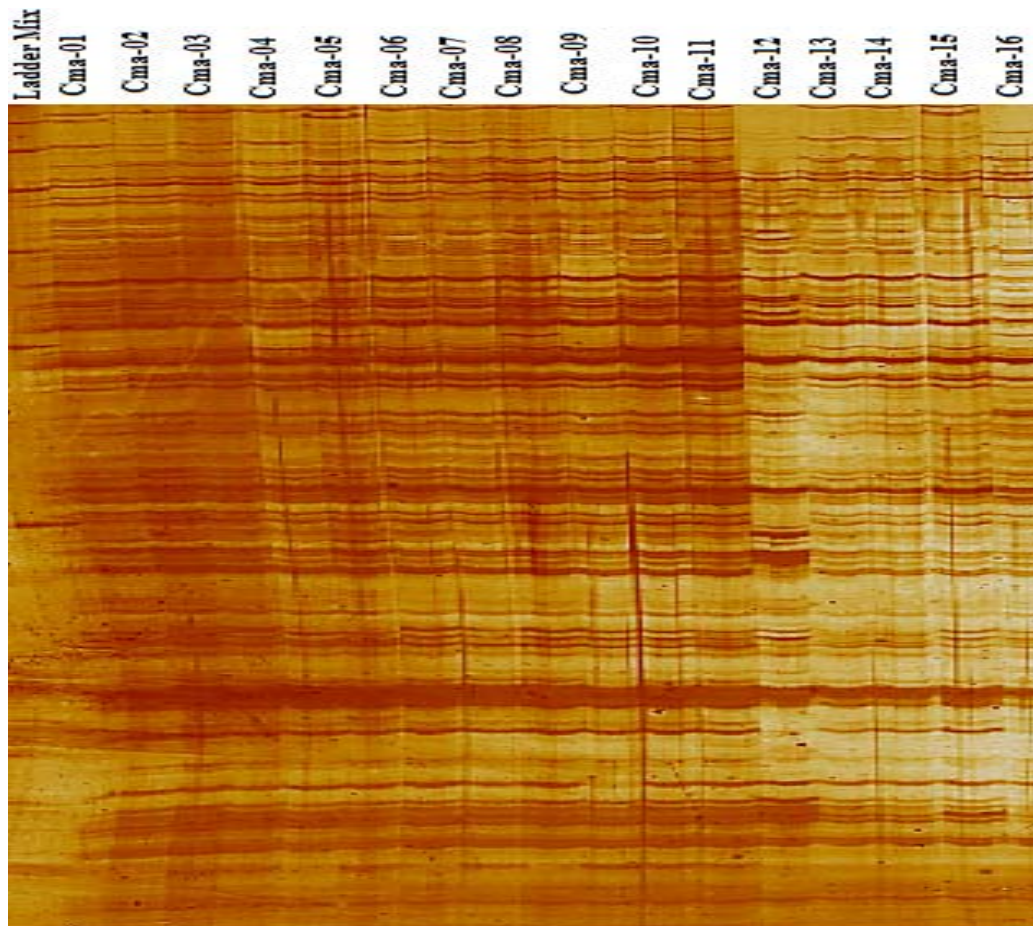
تکنیک انگشت نگاری AFLP بر اساس روش وُس و همکاران (۳۶) با اندکی تغییرات صورت پذیرفت. در این

استخراج DNA

استخراج DNA گیاه به روش CTAB (۸) با اندکی تغییرات انجام شد. مقدار ۰/۰۵ گرم پودر برگ خربزه وحشی به همراه ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۲/۵ NaCl مولار، ۱ Tris مولار، pH=۸، EDTA ۰/۵ مولار، pH=۸، (w/v) ۳٪ CTAB، ۴٪(w/v) PVP، ۲٪(w/v) β-Mercaptoethanol، در دمای ۶۵ درجه به مدت ۶۰ دقیقه آنکوبه گردید. سپس ۴۵۰ میکرولیتر محلول کلروفرم ایزوآمیل‌الکل (۱:۲۴) به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با ۱۳۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس فاز رویی محلول برداشته مقدار ۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر محلول CTAB ۱۰٪ (بسته به رنگ محلول) به همراه ۴۵۰ میکرولیتر محلول

که بهترین وضوح و چندشکلی را نشان دادند، برای بررسی‌های آماری انتخاب گردیدند. قطعات تکثیر شده بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۶٪ به مدت ۲ ساعت در بافر TBE ۰/۵× الکتروفورز گردیده (شکل ۱) و رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره صورت گرفت (۳۳،۲۳،۱۲).

مطالعه ۵۰۰ نانوگرم DNA ژنومی با ۵ واحد آنزیم‌های برشی *MseI* و *EcoRI* مورد هضم قرار گرفته و سپس آدپتورهای مرتبط با آنزیم‌های برشی به انتهای برش خورده ژنومی اتصال یافتند. انگشت نگاری AFLP با استفاده از ۶۳ ترکیب آغازگری (۹ آغازگر *EcoRI* و ۷ آغازگر *MseI*) با سه نوکلئوتید اضافه در انتهای ۳ انجام شد و ۱۰ ترکیب آغازگری



شکل ۱- الگوی‌های نوار AFLP نمونه‌های خربزه وحشی بوسیله آغازگر M-GAG/E-CCA
Figure 1. AFLP banding patterns with primer combinations M-GAG/E-CCA of wild melon genotypes

فاصله اطمینان ۹۹ درصد به‌وسیله نرم‌افزار Win boot استفاده شد. بررسی ساختار ژنتیکی کل جمعیت و تایید گروه‌بندی UPGMA بر اساس روش بی‌زین و با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE v2.3.4 (۲۶،۲۵) در حالت No Admixture با ۱۰۰۰۰ تکرار Burn-in و ۵۰۰۰۰ بار تکرار MCMC در مقادیر مختلف K انجام شد. عدد K بهینه نیز به روش delta K بدست آمد. محتوای اطلاعات چند شکلی PIC برای هر ترکیب آغازگری از رابطه $PIC = \sum [2 \pi_i (1 - \pi_i)] / n$ محاسبه شد که در آن π_i برابر با فراوانی الل I و n برابر با تعداد باندهای مشاهده شده است. تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نیز با استفاده از نرم‌افزار GenAlex 6.5 انجام گرفت (۲۸).

الکتروفورز DNA

ژل ۶٪ پلی‌اکریل‌آمید تهیه شد و ۴۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه قرار گرفت. قطعات تکثیر و تک رشته‌ای شده (به میزان ۳ میکرولیتر) روی ژل نمونه گذاری گردید. دستگاه با قدرت ثابت ۶۵ وات راه‌اندازی شد. پس از الکتروفورز، رنگ‌آمیزی با نیترات نقره صورت گرفت و از ژل‌ها عکس‌برداری شد.

تجزیه داده‌ها

هر یک از قطعات DNA تکثیر شده به‌عنوان یک آلل در نظر گرفته شد و بر اساس حضور (یک) و عدم حضور (صفر) نوارها امتیازدهی گردید. برای محاسبه ضرایب تشابه میان ژنوتیپ‌ها، آزمون مانتل و رسم دندروگرام از نرم‌افزار NTSYS 2.02 استفاده شد. برای اطمینان از صحت دندروگرام رسم شده از تجزیه Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار و

نتایج و بحث

آغازگرهای به کار رفته در این مطالعه مجموعاً ۵۶۴ نوار تولید کردند که در محدوده‌ی تقریبی ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ جفت بازی واقع شدند که ۳۸۶ نوار چند شکل و ۱۷۸ نوار یک شکل با متوسط ۳۸/۶ نوار برای هر ترکیب آغازگری، مشاهده شدند. به‌طور کلی متوسط میزان چندشکلی برای آغازگرها ۶۸/۶

درصد بود. بیشترین میزان چندشکلی را ترکیب آغازگری M-PIC E-CCA/GAG (۸۴ درصد) نشان داد. بیشترین میزان مربوط به نشانگر E-TCC/M-CCC و کمترین میزان PIC مربوط به نشانگر E-CTC/M-GAG بود. متوسط مقدار PIC در این آزمایش ۰/۲۴ محاسبه گردید (جدول ۲).

جدول ۲- ترکیب آغازگری، تعداد کل نوار، تعداد نوار چندشکل و درصد چندشکلی برای هر آغازگر

Table 2. Primer combinations, number of Total bands, number of polymorphic bands, polymorphism percentage of each primer

ترکیب آغازگری	تعداد کل نوار	تعداد نوارهای چندشکل	درصد چندشکلی	PIC
M-GAG , E-CCA	۳۸	۳۲	۸۴	۰/۲۸
M-AAG , E-CTA	۵۵	۴۵	۸۱	۰/۲۵
M-CCC , E-TCC	۳۹	۲۷	۶۹	۰/۳۸
M-AAG , E-GTG	۶۴	۵۰	۷۸	۰/۲۵
M-AAG , E-CTC	۶۹	۵۲	۷۵	۰/۱۹
M-AAG , E-TCC	۶۳	۳۷	۵۸	۰/۲۵
M-GAG , E-CTC	۵۶	۳۲	۵۷	۰/۱۶
M-CCC , E-CTC	۶۴	۴۵	۷۰	۰/۲۶
M-GAG , E-TCC	۶۹	۳۷	۵۳	۰/۱۷
M-CCC , E-GTG	۴۷	۲۹	۶۱	۰/۱۸
مجموع	۵۶۴	۳۸۶		
میانگین	۵۶/۴	۳۸/۶	۶۸/۶	۰/۲۴

بیشترین فاصله ژنتیکی میان نمونه‌های جمع‌آوری شده از تنکابن و لیوان شرقی (۰/۵۵) بود. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد ۸۱ درصد از تنوع کل مربوط به تنوع درون خوشه‌ها می‌باشد و تنوع بین گونه‌ها ۱۹ درصد می‌باشد. از دلایل مهم تنوع درون گروه‌ها می‌توان به نحوه تولید مثل غیرجنسی، دگرگشتی، فعالیت حشرات و انتقال دانه کرده بین توده‌ها اشاره کرد (۲۹) و اینها می‌توانند باعث ایجاد فنوتیپ‌های جدید و افزایش تنوع درون گروه‌ها شوند (۳۴). به‌منظور تایید و صحت گروه‌بندی انجام شده، از تجزیه ساختار ژنتیکی بر اساس روش بیزین با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE 2.3.4 استفاده شد. به‌دست آوردن K بهینه با استفاده از روش delta K نشان داد که مقدار K=۵ مناسب‌ترین عدد Fst (متوسط شاخص تثبیت) می‌باشد (۲۹) و بر این اساس ۵ گروه رسم شده نیز تایید شد (شکل ۲- الف و ب). بر اساس بارپلات^۲ ارائه شده نرم‌افزار Structure گروه‌ها با رنگ‌های مختلف متمایز گردیدند، برخی از ژنوتیپ‌ها تنها با یک رنگ مشخص شدند بطور مثال ژنوتیپ‌های مناطق تنکابن، محمودآباد، آمل و بابل در یک گروه تعیین شده با رنگ صورتی تفکیک شدند، اما ژنوتیپ‌هایی که در این تقسیم‌بندی شامل چندین رنگ مختلف بودند که حاکی از وجود رانش ژنتیکی در میان گروه‌های مختلف می‌باشد (۵) به عنوان مثال، ژنوتیپ شماره ۶ که از منطقه جویبار جمع‌آوری شده بود، توسط چهار رنگ مختلف مشخص شده است. ژنوتیپ ساری بطور کامل توسط رنگ قرمز گروه‌بندی شد، اما در نقشه Q براساس مدل بیزین رنگ قرمز در بعضی ژنوتیپ‌های دیگر دیده می‌شود که نشان‌دهنده قرابت ژنتیکی است (شکل ۲- ج). تجزیه به مختصات اصلی یک روش مقیاس‌گذاری است که براساس ماتریس شباهت و تفاوت‌های بین افراد انجام می‌شود و برای بوجود آوردن یک نمودار گرافیکی از

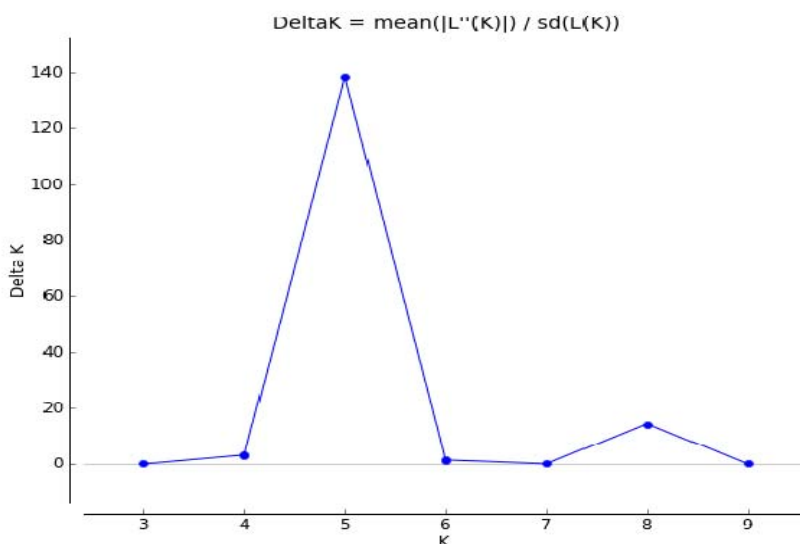
حقیقت‌ها و همکاران (۱۲) نیز در بررسی خود نتیجه مشابهی را اعلام کردند. ترکیب آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش از PIC نسبتاً بالایی برخوردار نبودند که نشان‌دهنده چندشکلی و کارایی نسبتاً کمتر آنها در این آزمایش می‌باشد. مقایسات نشان می‌دهد که نشانگرهایی با PIC بالا قدرت تفکیک بالاتری دارند و این ویژگی ناشی از دارا بودن تعداد آلل بیشتر و فراوانی کمتر آلل‌ها می‌باشد (۹). بر اساس نتایج این بررسی، ترکیب‌های آغازگری M-CCC/E-TCC/ و E-CCA/M-GAG بهتر از سایر ترکیبات به کار رفته توانستند ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را تفکیک سازند و می‌توان از آنها در بررسی ژرم پلاسما سایر ارقام و توده‌های ملون و جنس‌های نزدیک به Cucumis نظیر Mymecosicyes, Mukia, Dicaelopermum و Oreosyce (۳۰) استفاده کرد. تجزیه‌های مولکولی نمونه‌های مورد آزمون نشان دادند که بر اساس شاخص شانون ترکیب آغازگری M-GAG/E-CCA با مقدار (۰/۳۳) و ترکیب آغازگری M-CCC/E-TCC (۰/۱۴) بیشترین و کمترین تنوع را نشان دادند (جدول ۲)، هم چنین بیشترین مقدار PIC و چندشکلی توسط ترکیب آغازگری M-GAG/E-CCA مشاهده شد (شکل ۱). دندروگرام شباهت میان افراد مورد مطالعه بر پایه ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم خوشه‌بندی UPGMA، ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در ۵ گروه قرار داد (شکل ۴). ژنوتیپ‌های درون گروه‌ها معمولاً از لحاظ محل جمع‌آوری نزدیک به هم بودند، رحمان پور و همکاران (۲۹) نیز در بررسی خود بر روی توده‌های ملون با استفاده از نشانگر ISSR عنوان کردند که گروه‌های تشکیل شده اغلب شامل توده‌هایی با محل جمع‌آوری مشابه و یا نزدیک می‌باشند. بر اساس ضریب تشابه جاکارد^۱ بیشترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از قائم‌شهر و جویبار (۰/۷۶) و

به‌عنوان منبع ژنی با ارزش در اصلاح خربزه زراعی بود و با توجه به مشاهده ۳۱۸ مکان چند شکل توسط ۱۰ ترکیب آغازگری مورد استفاده نتایج حاصل را می‌توان قابل اعتماد دانست. از طرفی نزدیک به ۷۰ درصد نوارهای مشاهده شده، چندشکلی نشان دادند و میزان تشابه ژنتیکی میان جمعیت‌ها از ۵۳ تا ۸۳ درصد متغیر بود. این روش مبتنی بر قطعات بریده شده ژنومی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز است که می‌تواند برای DNA هر موجودی با هر مقدار پیچیدگی بکار رود. همچنین تکثیر قطعات DNA با این روش که نیازی به اطلاع قبلی از توالی ندارد، با تعداد محدودی جفت آغازگر صورت می‌گیرد (۱۷). بالابودن شاخص‌های تنوع ژنتیکی، شاخص شانون و میزان MI و PIC برای آغازگر *IE-CCA* / *M-GAG* نشان‌دهنده کارایی بالاتر این آغازگر در تمایز ژنوتیپ‌های خربزه وحشی در این تحقیق بود و می‌توان از این آغازگر در بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای در جنس خربزه استفاده نمود. با توجه به اینکه آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق قادر به شناسایی چندشکلی قابل قبولی بودند، می‌توان در مطالعات آینده روی ملون‌ها از نشانگرهای AFLP استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

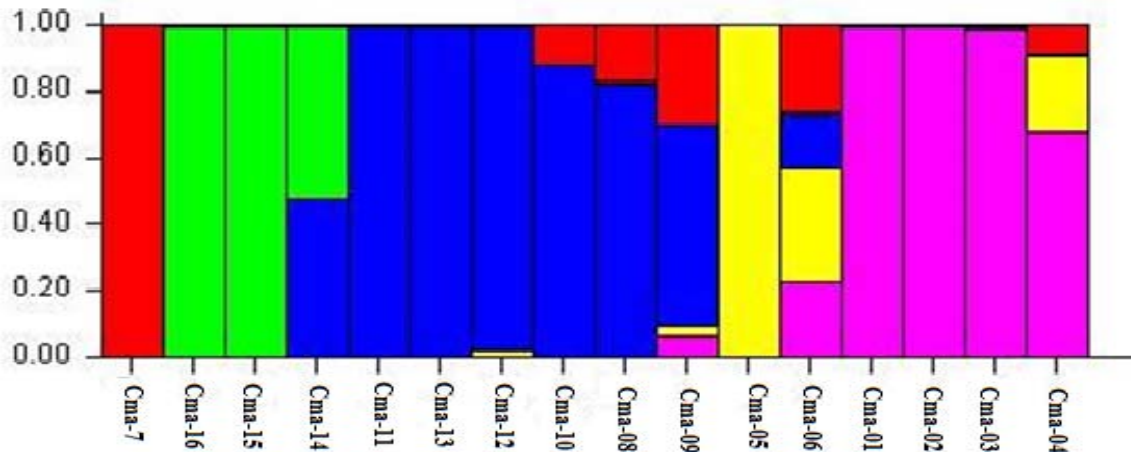
این پژوهش در قالب طرح پژوهشی مصوب پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تامین گردید و حمایت‌های مالی آن انجام شده است. از ریاست محترم پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان و کارشناسان محترم آزمایشگاه‌ها به پاس مساعدت‌های ایشان قدردانی می‌گردد.

داده‌ها با ابعاد کمتر هدف‌گذاری شده است (۳۱) بر این اساس دو مؤلفه اصلی اول ۶۳ درصد واریانس کل داده‌ها را توجیه نمودند که نشان‌دهنده عدم پوشش کل ژنوم توسط آغازگرهای مورد مطالعه است (شکل ۳)، (۲۱). بر اساس مطالعه‌ای بر روی نشانگرهای مختلف، چالمرز و همکاران (۶) عنوان کردند که توزیع و پراکنش نشانگر AFLP متقارن نبوده و بیشتر به نواحی تلومری گرایش دارند. نمودار دو بعدی بر اساس دو مؤلفه اول محاسبه شده، نشان داد که نمونه‌های مورد بررسی که در محل‌های جغرافیایی نزدیک بودند، در این تجزیه نیز نزدیک به هم می‌باشند. شباهت ژنتیکی و نزدیکی نمونه‌های موجود در یک گروه می‌تواند نشان‌دهنده تغییرات ژنتیکی مشابهی در طول سالیان دراز در برابر شرایط اقلیمی مشابه باشد، بطوریکه فنگ و همکاران (۱۰) اشاره نمودند که الگوی گروه‌بندی ارتباط مستقیمی با منشأ و پراکنش جغرافیایی دارد. مقایسه‌ی پلات مختصات اصلی و مدل بی‌زین، نشان‌دهنده‌ی مطابقت پراکنش نمونه‌ها در محور دو بعدی با گروه‌بندی بر اساس مدل بی‌زین بود (شکل ۲ و ۳). این مطالعه نشان می‌دهد که برای برآورد دقیق میزان تنوع درون جمعیت باید عواملی مانند به کارگیری تعداد بیشتر نمونه‌ها و تعداد بیشتر نشانگرها را در نظر گرفت و نیز می‌توان به عواملی مختلفی در برآورد روابط ژنتیکی میان ساز و کارهای تکاملی که در واقع زیربنای تنوع محاسبه شده می‌باشند، اشاره نمود (۲۲، ۳۶). ملشینگر (۱۹) بیان داشت که دقت در تخمین تشابه ژنتیکی افراد به تعداد نشانگر مورد استفاده، میزان چندشکلی و میزان پوشش ژنومی نشانگرها بستگی دارد. از آنجایی که یکی دیگر از اهداف این تحقیق، بهینه کردن به‌کارگیری نشانگرهای AFLP در ارائه تصویری روشن از وسعت زمینه ژنتیکی ژنوتیپ‌های خربزه وحشی،



(ب)

k	Rep	MeanLnP(K)	stdvLnP(K)	Ln'(K)	[Ln''(K)]	Delta K
۲	۳	-۵۶۷۹/۲۶۶۶۶	۴/۳۶۶۱۵۸	-	-	-
۳	۳	-۵۲۲۵/۰۰۰۰۰	۷۶/۷۸۴۶۳۴	۴۵۴/۲۶۶۶	۱۳/۵۶۶۶۶	۰/۱۷۶۶۸۵
۴	۳	-۴۷۵۷/۱۶۶۶۶	۲۳/۲۴۲۷۰۵	۴۶۷/۸۳۳۳	۷۵/۱۰۰۰۰	۳/۲۳۱۱۲۱
۵	۳	-۴۳۶۴/۴۳۳۳۳	۴۳/۸۰۷۱۱۵	۳۹۲/۷۳۳۳	۶۰۵۹/۳۶۶	۱۳۸/۳۱۹۲
۶	۳	-۱۰۰۳۱/۰۶۶۶۶	۵۸۱۱/۳۴۸۰۱	-۵۶۶۶/۶۳۳	۸۸۷۳/۳۶۶	۱/۵۲۶۹۸۹
۷	۳	-۶۸۲۳/۸۳۳۳۳	۲۹۹۲/۶۹۴۲۵	۳۹۰۷/۲۳۳	۶۳۱/۹۳۳۳	۰/۲۱۱۱۵۹
۸	۳	-۴۲۴۸/۵۳۳۳۳	۱۰۰۷/۰۱۰۱۱	۲۵۷۵/۳۰۰	۱۴۱۴۵/۰۳	۱۴/۰۴۶۵۶
۹	۳	-۱۵۸۱۸/۲۶۶۶۶	۱۹۹۵۱/۳۰۶۱	-۱۱۵۶۹/۷۳	۲۵۳۳/۸۰۰	۰/۱۷۷۱۲۱
۱۰	۳	-۳۰۹۲۱/۸۰۰۰	۱۵۶۸۶/۰۴۹۳	-۱۵۱۰۳/۵۳	-	-

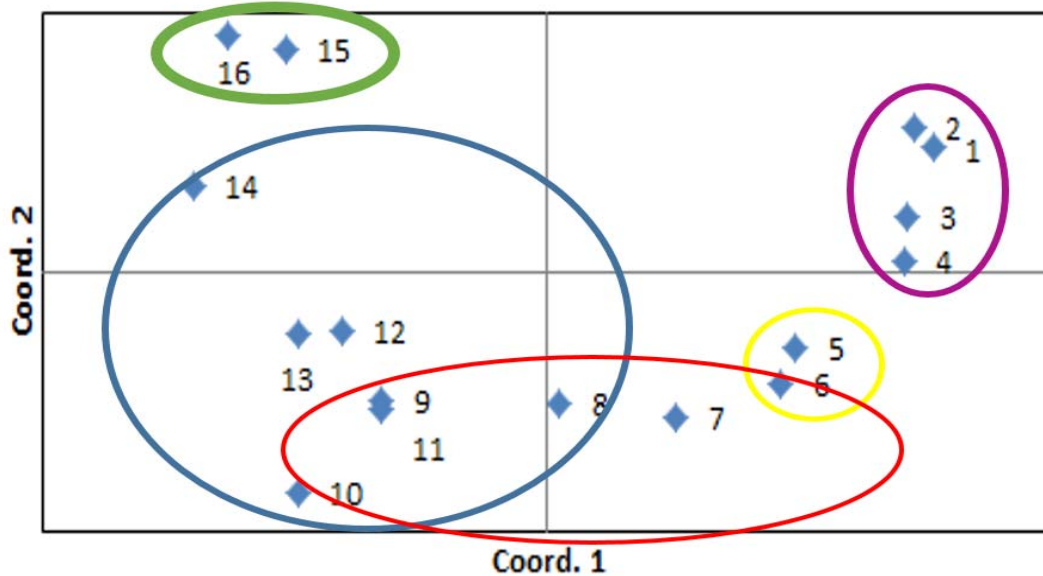


(ج)

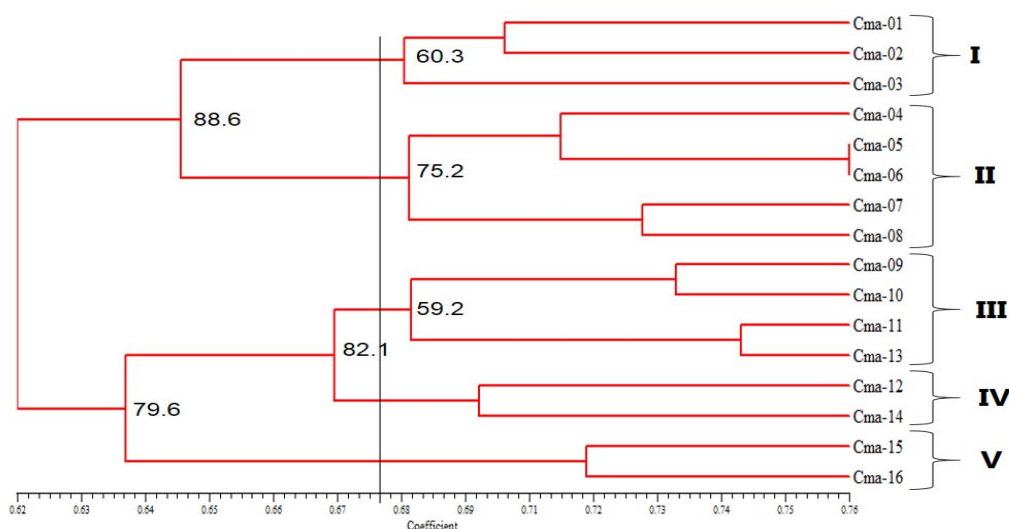
شکل ۲- الف) مقدار k بهینه برای بررسی تنوع بر اساس مدل بیضین توسط نرم افزار structure harvester, ب) مقدار K بهینه به روش delta K, ج) تصویر رسم شده براساس مدل بیضین در مقدار k=5 برای ۱۶ نمونه خربزه وحشی بر مبنای داده‌های حاصل از نشانگرهای AFLP

Figure 2. a) The optimum K for genetic diversity analysis based on Bayesian model, generated by structure harvester software, b) Optimum K based on delta K, c) Image of 16 wild melon genotypes based on Bayesian model k=5

Principal Coordinates (PCoA)



شکل ۳- رابطه میان ۱۶ ژنوتیپ مورد آزمون با استفاده PCoA
Figure 3. The relationship between 16 genotypes based on PCoA



شکل ۴- دندروگرام ژنوتیپ‌های *Cucumis melo* var. *agrestis* مورد بررسی بر اساس ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم خوشه‌بندی UPGMA با استفاده از ۱۰ ترکیب آغازگری نشانگر AFLP

Figure 4. Cluster analysis of *Cucumis melo* var. *agrestis* based on Jaccard's similarity matrix and UPGMA algorithm using 10 AFLP primer combinations

منابع

- Adekunle, A.A., O.A. Oluwo. 2008. The nutritive value of *Cucumis melo* var. *agrestis* Scrad (Cucurbitaceae) seeds and oil in Nigeria. *American Journal of Food Technology*, 3: 141-146.
- Alagar Raja, M., G. Sahithi, R. Vasanthi, K.N.V. David Banji, and D. Selvakumar. 2015. Study of phytochemical and antioxidant activity of *Cucumis melo* var. *agrestis* fruit. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2: 303-306.
- Belja, A., Z. Satovic, G. Cipriani, L. Baldoni, R. Testolin, L. Rallo and I. Trujillo. 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR Markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 736 - 44.
- Blancard, D., H. Lecoq, and M. Pitrat. 1994. *A Colour Atlas of Cucurbit Diseases*. Book: Manson Publishing, London, UK, 229 pp.
- Carvalho, A., H. Guedes-Pinto, and J.E. Lima Brito. 2011. Genetic Diversity in old Portuguese durum wheat cultivars assessed by Retrotransposon-Based Markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30: 578-589.
- Chalmers, K.J., W. Canobell, J.A. Kretschmer, P.H. Ensck, S. Pierns., M. Harker, G.B. Pallota, M.R. Cornish, L. Shariflou, A. Rampling, G. Mclauchlan, P.J. Daggard, T.A. Sharp, M. Holton, W. Sutherland, R. Apples and P. Landrige. 2001. Construction of three linkage maps in bread wheat, *Triticum aestivum*. *Australian Journal Agriculture Research*, 52: 1089-1119.
- Danesh, M., M. lotfi, M. Naghavi, M. Pirseyedi and Kh. Nematollahi. 2007. Genetic diversity within and between mass Persian melon cultivars with markers AFLP. *Proceedings of the National Conference and molecular biology*, pp: 249-246 (In Persian).
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Algal Physiology and Biochemistry*, 19: 11-15.
- Ebrahimi, A., M.R. Naghavi, M. Sabokdast and M. Mardi. 2010. Assessment of genetic diversity in two accessions of barley species (*H. vulgare* L. and *H. Spontaneum* L.) using SSR markers. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 12: 333-345 (In Persian).
- Feng, Z.Y., X.J. LIU, Y.Z. Zhang and H.Q. Ling. 2006. Genetic diversity analysis of Tibetan wild barley using SSR. *Acta Genetica Sinica*, 33: 917-928.
- Garcia-Mas, J., M. Oliver, H. Gómez-Paniagua and M.C. de Vicente. 2000. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 860-864.
- Haghpahan, H., S.K. Kazemitabar, S.H.R. Hashemi and S.M. Alavi. 2014. Evaluation of Mazandaran nettle (*Urtica Dioica*) population structure and genetic diversity by AFLP markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 22: 241-250 (In Persian).
- Hasani, M.H., S. Torabi, M. Omidi, A. Etminan and T. Dastmalchi. 2011. Assessment of genetic diversity of (*Foeniculum vulgare* Mill) using AFLP marker. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 42: 594-604 (In Persian).
- Heidari, S., H. Marashi, M. Farsi and A. Mirshamsi Kakhki. 2008. Genetic diversity in wild and cultivated populations of barberry (*Berberis* sp) from Khorasan using molecular markers AFLP. *Journal of Horticultural Science*, 22: 65-76 (In Persian).

15. Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castsglione, M.O. Winfield and M. Matthes Daly. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP, SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3: 381-90.
16. Lima, M., A. Garcia, K. Oliveria, S. Matsuoka, H. Arizono and C.L. De Souza. 2002. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 30-38.
17. Mackill, D., E. Zhang, E. Redona and P. Colowtt. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome*, 39: 969-977.
18. Magiure, T.L., R. Peakall and P. Saenger. 2002. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 392-401.
19. Melchinger, A.E. and R.K. Gumber. 1999. Overview of heterosis and heterotic groups in agronomic crops in: K.R. Lamkey, J.E. Stuber (Eds) *Concepts and breeding of heterosis in crop plants*. Crop Science Society of America, 29-43 pp.
20. Mohammadi, S.A., M. Shokrpour, M. Moghaddam and A. Javanshir. 2011. AFLP-based molecular characterization and population structure analysis of *Silybum marianum* L. *Plant Genetic Resources Characterization Utilization*, 9: 445-453.
21. Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43: 1235-1248.
22. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 87: 583-590.
23. Saramirad, B., M. Shokrpour, O. Sofalian, A. Hasheminejad, E. Esfandiari and E. Esfandiari. 2016. Association Analysis of AFLP and RAPD Markers with Cadmium Accumulation in Wheat. *Journal of Crop Breeding*, 8: 126-133 (In Persian).
24. Saramirad, B., M. Shokrpour, O. Sofalian, A. Pourmohammad and E. Esfandiari. 2014. Evaluation of Genetic Diversity of Wheat Genotypes by AFLP Markers. *Journal of Crop Breeding*, 7: 89-96 (In Persian).
25. Pritchard, J.K., W. Wen and D. Falush. 2010. Documentation for STRUCTURE software Version 2.3. Department of Human Genetic University of Chicago, Department of Statistics University of Oxford. http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure_software/release_versions/v2.3.3/html/structure.html (Version 2.3.3)
26. Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multi-locus genotype data. *Genetics*, 155: 945-95.
27. Pejic, I., M.P. Ajmone and M. Morgante. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 1248-1255.
28. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
29. Rahmanpour, S., B. Abdollahi Mandoulakani and M. Ghadimzadeh. 2014. Assessment of genetic diversity in Iranian melon (*Cucumis melo* L.) landraces and hybrids using ISSR markers. *Modern Genetics*, 9: 67-76 (In Persian).
30. Renner, S.S., H. Schaefer and A. Kocvan. 2007. Phylogenetics of Cucumis (Cucurbitaceae) Cucumber (*C. sativus*) belongs in an Asian/Australian clade far from melon (*C. melo*). *BMC Evolutionary Biology*, 7: 58.
31. Rohlf, F.J. 1972. An empirical comparison of three ordination techniques in numerical taxonomy. *Systematic Zoology*, 21: 271-280.
32. Roy, A., S.S. Bal, M. Fergany, S. Kaur, H. Singh, A. Malik, J. Singh, A.J. Monforte and N.P.S. Dhillon. 2012. Wild melon diversity in India (Punjab State). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59: 755-767.
33. Sanguinetti, C.J., E. Dias Neto and A.J.G. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Bio techniques*, 17: 915-919.
34. Shi, W., C.F. Yang, J.M. Chen and Y.H. Guo. 2008. Genetic variation among wild and cultivated populations of the Chinese medicinal plant *Coptis chinensis* (Ranunculaceae). *Plant Biology*, 10: 485-491.
35. Talebi Kohyakhy, E., M.R. Naghavi and M. Mohammad Aliha. 2008. Study of the essential oil variation of *Ferula gummosa* samples from Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 44: 124 -126 (In Persian).
36. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V.D. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
37. Wang, Y.H., C.E. Thomas and R.A. Dean. 1997. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 791-798.

Assessment of Genetic Diversity and Structure in the Wild Melon (*Cucumis melo* var. *agrestis*) Genotypes from Southern Coastline of Caspian Sea using AFLP Markers

Fateme Vafadar Shamasbi¹, Ali Dehestani², Saber Golkari³ and Mostafa Haghpanah⁴

1- Department of Agricultural Biotechnology, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

2- Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran (Corresponding Author: a.dehestani@sanru.ac.ir)

3- Dryland Agriculture Research Institutes (DARI), Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO) Maragheh, Iran

4- Department of Biotechnology and Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Received: June 18, 2015

Accepted: December 22, 2015

Abstract

Wild melon (*Cucumis melo* var. *agrestis*) commonly known as African melon grows in tropical and semi tropical regions of the world. It also known as a valuable medicinal plant has numerous pharmaceutical properties and is considered as a valuable germplasm in cultivated melons breeding. In the present study, genetic variation of sixteen wild melons, collected from Mazandaran province, was examined by 10 AFLP markers. In total, 564 bands were generated and more than 68% were polymorphic. Mean Polymorphic Information Content (PIC) and Marker Index (MI) values were 0.22 and 15.51, respectively and primer (*E-CCA/M-CAG*) indicated the highest MI, accounting 24.19. In addition, primer (*E-CCA/M-CAG*) showed the highest diversity with a Shannon Index 0.33. Cluster analysis using Jaccard similarity method and UPGMA algorithm, and Bayesian method, grouped all genotypes in five main groups. Results of Principal Coordinate Analysis were similar with the results based on Bayesian model and the cluster analysis. Genetic diversity determined based on AFLP markers confirmed the efficiency of AFLP for classifying wild melon genotypes according to the geographical origins and such markers can be used to identify differences within species in the genealogy studies.

Keywords: Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) marker, Bayesian method, Genetic Diversity, Wild melon