Archive of SID

"نهال و بذر"
جلد ۲۰، شماره ۳، سال ۱۳۸۳

تهیه نقشه پیوستگی خربزه ایرانی (*Cucumis melo* L.) با استفاده از نشانگر RAPD*

Construction of Linkage Map in Iranian Melon (*Cucumis melo* L.) Using RAPD Markers

عبدالعلی شجاعیان، بهزاد قره‌یاضی، کاظم ارزانی، حشمت‌الله رحیمیان، تاماش له‌لی و میشل پیترا

دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: ۸۳/۲/۸

چکیده

شجاعیان، ع.، قره‌یاضی، ب.، ارزانی، ک.، رحیمیان، ح.، له‌لی، ت.، و پیترا، ام. ۱۳۸۳. تهیه نقشه پیوستگی خربزه ایرانی (*Cucumis melo* L.) با استفاده از نشانگر RAPD. **نهال و بذر** ۲۰: ۳۸۲-۳۷۳.

نقشه‌های پیوستگی، اساس مطالعات ژنومی در گیاهان مختلف می‌باشد. با توجه به خصوصیات ویژه خربزه خاتونی به عنوان یک توده بومی مهم ایران، تهیه نقشه پیوستگی با استفاده از این توده، هدف این تحقیق بوده است. از این رو یک جمعیت F_2 به عنوان جمعیت در حال تفرق برای تهیه نقشه پیوستگی، از تلاقی خربزه توده بومی خاتونی و لاین فرانسوی به نام چارنتیز (Charentais) تهیه شد. برای تهیه این نقشه پیوستگی از ٤٢ آغازگر رپید استفاده شد و نتایج تجزیه پیوستگی نشان‌دهنده ۱۰۹ نشانگر رپید در ۱۳ گروه پیوستگی با طول ٥٠٤/٧ سانتی‌مورگان بود. در این نقشه، متوسط فاصله بین نشانگرها ٥/٢ سانتی‌مورگان بود. به علت عدم وجود نقشه پیوستگی ژرم‌پلاسم خربزه ایران، در نظر است با بهره‌گیری از این نقشه به عنوان نقشه مبنا، نشانگرهای بیشتری را به آن اضافه نمود تا نقشه اشباع حاصل شود. این نقشه می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی به کمک نشانگر (Marker-assisted breeding) و نیز همسانه‌سازی مبتنی بر نقشه (Map-based cloning)، مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: خربزه ایرانی، *Cucumis melo* L.، خربزه خاتونی، نقشه پیوستگی، گروه‌های پیوستگی، نشانگر رپید.

مقدمه

طالبی- خربزه (*Cucumis melo* L.) یکی از محصولات مهم و با ارزش است که متعلق به تیره کدوسانان (Cucurbitaceae) می‌باشد. کشت این محصول در بسیاری از نقاط دنیا در نواحی معتدل و گرم به‌طور گسترده به‌منظور مصرف تازه‌خوری و تهیه دسر رایج است. منشاء طالبی- خربزه را ایران و یاآفریقا معرفی نموده‌اند (Robinson and Decker-Walters, ۱۹۹۷). براساس آمار سال ۲۰۰۱، ایران از نظر

* قسمتی از رساله دکتری نگارنده اول.

www.SID.ir

Archive of SID

تولید طالبی- خربزه پس از کشورهای چین، ترکیه و آمریکا، با تولید ٤/٧ درصد از کل تولید دنیا، رتبه چهارم را به خود اختصاص داده است (Taylor and Brant, ۲۰۰۲)، بنابراین سوق دادن بخشی از فعالیت‌های پژوهشی به موضوعات به‌زراعی و به‌نژادی برای بهبود کیفیت آن، گام مثبت و مؤثری در حفظ موقعیت و جایگاه مهم ایران در تولید جهانی این محصول خواهد بود. علاوه بر این، طالبی- خربزه با عدد پایه کروموزمی x = ۲ و همچنین کوچک بودن اندازه ژنوم ($۱۰^{۸} \times$ ٥-٤/٥ جفت‌باز) آن (Bennett and Leitch،۱۹۹٥)، موجب تسریع و سهولت همسانه‌سازی ژن‌ها براساس موقعیتشان‌می گردد(قره‌یاضی،۱۳۷٤)، و همچنین تغییرات ژنتیکی درون گونه‌ای، در مطالعات‌مولکولی‌و ژنتیکی موردتوجه بوده‌است (Brotman *et al.*, ۲۰۰۰ ؛ Perin *et al.*,۲۰۰۲؛ Ford and Taylor, ۲۰۰۳).

کاربرد نشانگرهای مولکولی موجب کارآمدتر شدن فرآیند انتخاب در به‌نژادی گیاهان شده است. از این رو تهیه نقشه‌های ژنتیکی برای مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمّی (Quantitative Trait Loci)، همسانه‌سازی مبتنی بر نقشه (Map-based cloning) صفات زراعی ضرورت خواهد داشت. در سال‌های اخیر تعدادی نقشه پیوستگی برای جمعیت‌های طالبی- خربزه تهیه شده است که هر نقشه از نظر درجه اشباع، نوع نشانگر و جمعیت مورد استفاده، متفاوت بوده‌اند(Baudracco-Arnas and Pitrat, ۱۹۹٦; Wang *et al.*, ۱۹۹۷; Liou *et al.*, ۱۹۹۸; Oliver *et al.*, ۲۰۰۱; Perin *et al.*,۲۰۰۲; Danin-Poleg *et al.*, ۱۹۹۸-۲۰۰۰).

با توجه به این که ایران یکی از مراکز شناخته شده و مهم تنوع ژنتیکی گروه طالبی- خربزه در دنیا است (Robinson and Decker-Walters, ۱۹۹۷)، این پژوهش با هدف تهیه یک نقشه پیوستگی مقدماتی جهت استفاده در پژوهش‌های مولکولی و به‌نژادی نوین، انجام شد. در ابتدا، این کار با نشانگر RAPD آغاز شد تا در آینده نشانگرهای AFLP ، توالی‌های ساده تکرار شونده (SSR) و تعدادی از صفات فنوتیپی نیز به مجموعه حاضر، اضافه شوند و در نهایت نقشه‌ای با وضوح و درجه اشباع بیشتر، با تأکید بر ژنوتیپ بومی ایران، تهیه گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برای تهیه نقشه پیوستگی، تعداد ۹٤ گیاه $F_۲$ حاصل از تلاقی یک توده بومی خربزه ایرانی به نام خاتونی به عنوان والد مادری و لاین فرانسوی چارنتیز (Charentais) به عنوان والد پدری، مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تهیه جمعیت $F_۲$، پس از دگرگرده‌افشانی مصنوعی والد مادری، بذرهای $F_۱$ به طور مجزا در گلدان‌های پلی‌اتیلن ٥ لیتری کاشته و پس از گلدهی، به‌طور مصنوعی خودگشن شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

بذرهای F_2 در گلدان‌های مجزا کاشته شدند، تا پس از ظهور اولین برگ حقیقی، از لپه‌های آن‌ها نمونه‌برداری شود.

تجزیه مولکولی

استخراج DNA ژنومی

به منظور تهیه نمونه برگی، ابتدا مقدار ۵۰ میلی‌گرم از هر نمونه لپه خشک شده، با استفاده از دانه‌های شیشه‌ای (Glass Bit) با قطر ۱/۵ میلی‌متر و دستگاه لرزاننده (Shaker)، به طور کامل پودر شدند. DNA ژنومی از ۹۴ گیاه F_2 و والدین با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA ژنومی ویزارد (Promega Wizard ® Genomic DNA Purification Kit)، به طور مجزا استخراج شد (Anonymous, ۱۹۹۹). کیفیت و غلظت DNA های استخراج شده، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (GenQuant RNA/DNA Calculator) تعیین گردید و پس از تهیه غلظت‌های ذخیره‌ای و کاری، تا زمان استفاده، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تجزیه رپید

تجزیه نشانگرهای رپید مطابق روش پیشنهادی ویلیامز و همکاران (Williams *et al.*, ۱۹۹۰) انجام شد. به منظور تهیه واکنش‌های (PCR) در حجم نهایی ده میکرولیتر، اجزاء و مقادیر واکنش عبارت بودند از: ۲۷ نانوگرم DNA ژنومی، ٦ پیکومول آغازگر تصادفی ده نوکلئوتیدی از سری آغازگرهای اُپرون، ۰/٤ واحد آنزیم تک DNA پلیمراز و یک برابر (۱X) بافر واکنش پی‌سی‌آر حاوی ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم و آب مقطر استریل برای رساندن به حجم لازم. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر (MWG-Biotech) مدل Primus ۹٦ plus با الگوی دمایی یک چرخه ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه؛ ۳۵ چرخه شامل ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۳٦ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه؛ و یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، انجام شد. مقدار ۲ میکرولیتر از فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پس از افزودن بافر بارگذاری به هر یک، بر روی ژل آکریل‌آمید ۱۰ درصد بارگذاری گردید. الکتروفورز با استفاده از بافر تی‌بی‌ایی (TBE) با غلظت یک برابر (۱X) در دستگاه الکتروفورز سی‌بی‌اس (CBS)، با ولتاژ مستقیم ٤۰۰ ولت و در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت دو ساعت انجام شد. ژل‌ها با محلول نیترات نقره و مطابق روش اشتیفت و همکاران (Stift *et al.*, ۲۰۰۳) رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاه ژل خشک‌کن (Amersham Biosciences)، خشک شدند.

تجزیه داده‌ها

الگوهای باندی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هر آغازگر که بین والدین و افراد جمعیت F_2 چند شکل بودند، با توجه به ماهیت نشانگر رپید، به صورت غالب (عدد یک برای

www.SID.ir

Archive of SID

وجود باند و عدد صفر برای عدم وجود باند) امتیازدهی شدند. در مورد کلیه داده‌های حاصل از نشانگرهای چندشکل، آزمون انحراف از نسبت‌های مندلی با استفاده از آزمون مربع کای (X^2 test) انجام گردید. نشانگرهایی که الگوی توارثی آن‌ها با نسبت مورد انتظار ۳:۱ در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار نداشتند، برای تهیه نقشه پیوستگی مورد استفاده قرار گرفتند و بقیه آن‌ها از مجموعه داده‌ها حذف گردیدند. نقشه پیوستگی، با استفاده از نرم‌افزاری مپ‌میکر (MAPMAKER/Exp. ۳,۰b) با در نظر گرفتن LOD≥۳ و حداکثر فاصله ۵۰ سانتی‌مورگان گروه‌بندی شدند (Lander *et al.*, ۱۹۸۷؛ Lincoln *et al.*, ۱۹۹۲). بسته نرم‌افزاری مپ‌چارت (MapChart) نسخه ۲/۱ برای ترسیم نقشه پیوستگی، مورد استفاده قرار گرفت (Voorrips, ۲۰۰۲).

نامگذاری نشانگرها

هر یک از نشانگرها، در نقشه با یک نام دو قسمتی مشخص شدند. بخش اول به نام آغازگر اشاره دارد که توسط آن، چند شکل مربوطه مشاهده شده است. این بخش از یک یا دو حرف بزرگ انگلیسی و یک عدد دو رقمی تشکیل شده که طبق آغازگرهای سری اُپرون نامگذاری گردیده است. جهت پرهیز از تکرار، حروف OP که از شاخصه‌های آغازگرهای سری اُپرون می‌باشد، از ابتدای نام کلیه آغازگرها حذف شده‌اند. بخش دوم شامل یک عدد سه یا چهار رقمی است که با یک علامت اعشاری مجزا شده و نشان دهنده اندازه قطعه چند شکل می‌باشد. واحد این اندازه برحسب جفت باز (bp) بیان شده است. لذا جهت اطلاع از توالی هر آغازگر، می‌توان از طریق کتابچه راهنمای شرکت اُپرون یا از طریق اینترنت اقدام نمود.

نتایج و بحث

نشانگرهای چندشکل

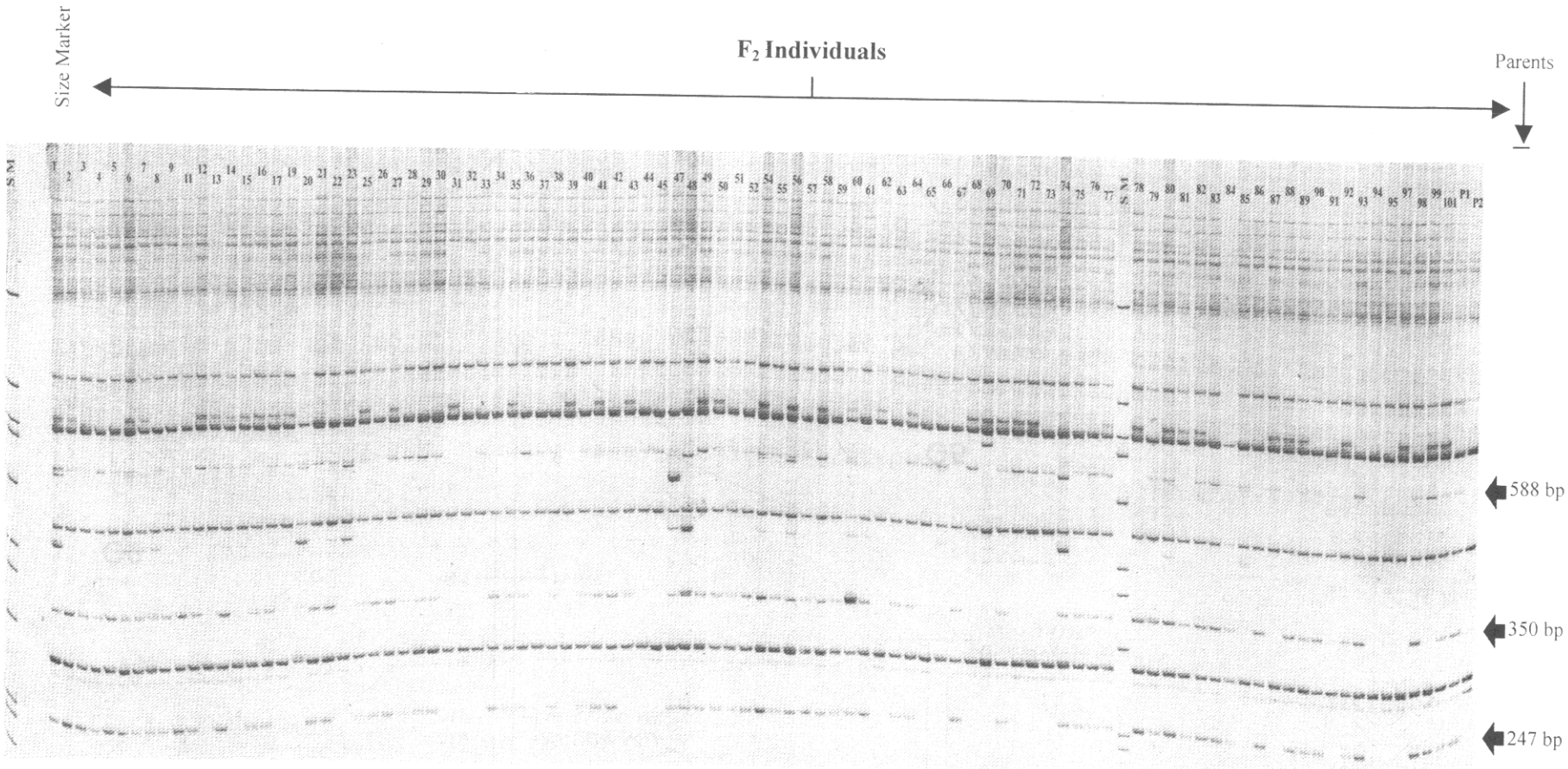
پس از غربال والدین، ۴۲ آغازگر که دارای ۱ تا ۶ باند چندشکل با اندازه‌هایی از ۱۵۰ تا ۲۸۵۰ جفت باز بودند، به منظور ارزیابی جمعیت انتخاب شدند. با ارزیابی این نشانگرها بر روی ۹۴ فرد جمعیت F_2، تعداد ۵۰۴ باند تکثیر گردید. از این تعداد، ۱۲۴ نشانگر (۲۶/۵ درصد) که هم در والدین و هم در افراد جمعیت نسل دوم، چندشکلی را نشان دادند، با نسبت مورد انتظار مندلی برای نشانگرهای بارز مطابقت داشتند. در واقع به طور متوسط هر آغازگر در تکثیر سه نشانگر سهم داشته است. پایین بودن تعداد چندشکلی در طالبی- خربزه، پیش‌تر نیز توسط ونگ و همکاران (Wang *et al.*, ۱۹۹۷) خاطر نشان شده است. شکل ۱ الگوی باندی والدین و افراد جمعیت حاصل از آن را که با آغازگر OPAV-۱۵ تکثیر شده‌اند، نشان می‌دهد.

نقشه‌ی پیوستگی

از تعداد ۱۲۴ نشانگر چندشکل حاصل از ارزیابی افراد جمعیت، تعداد ۱۰۹ نشانگر

www.SID.ir

www.SID.ir



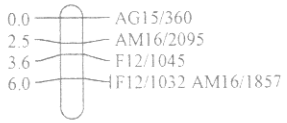
شکل ۱- تجزیه رپید در والدین و افراد جمعیت F_2 حاصل از تلاقی با استفاده از آغازگر OPAV- 15

Fig. 1. RAPD analysis in parents and F_2 individuals using OPAV-15 primer

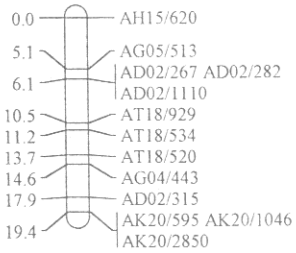
Archive of SID

Archive of SID

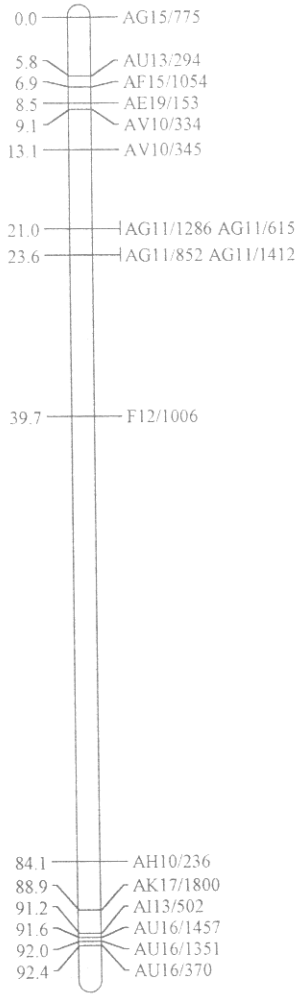
G1



G2

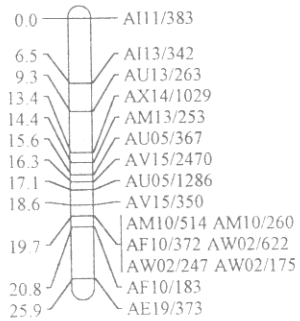


G3

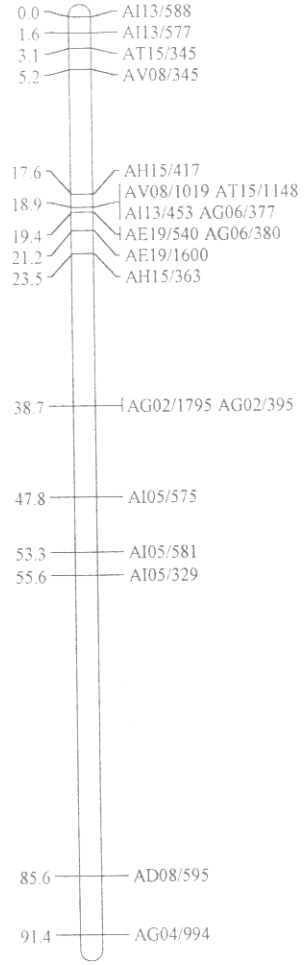


G4

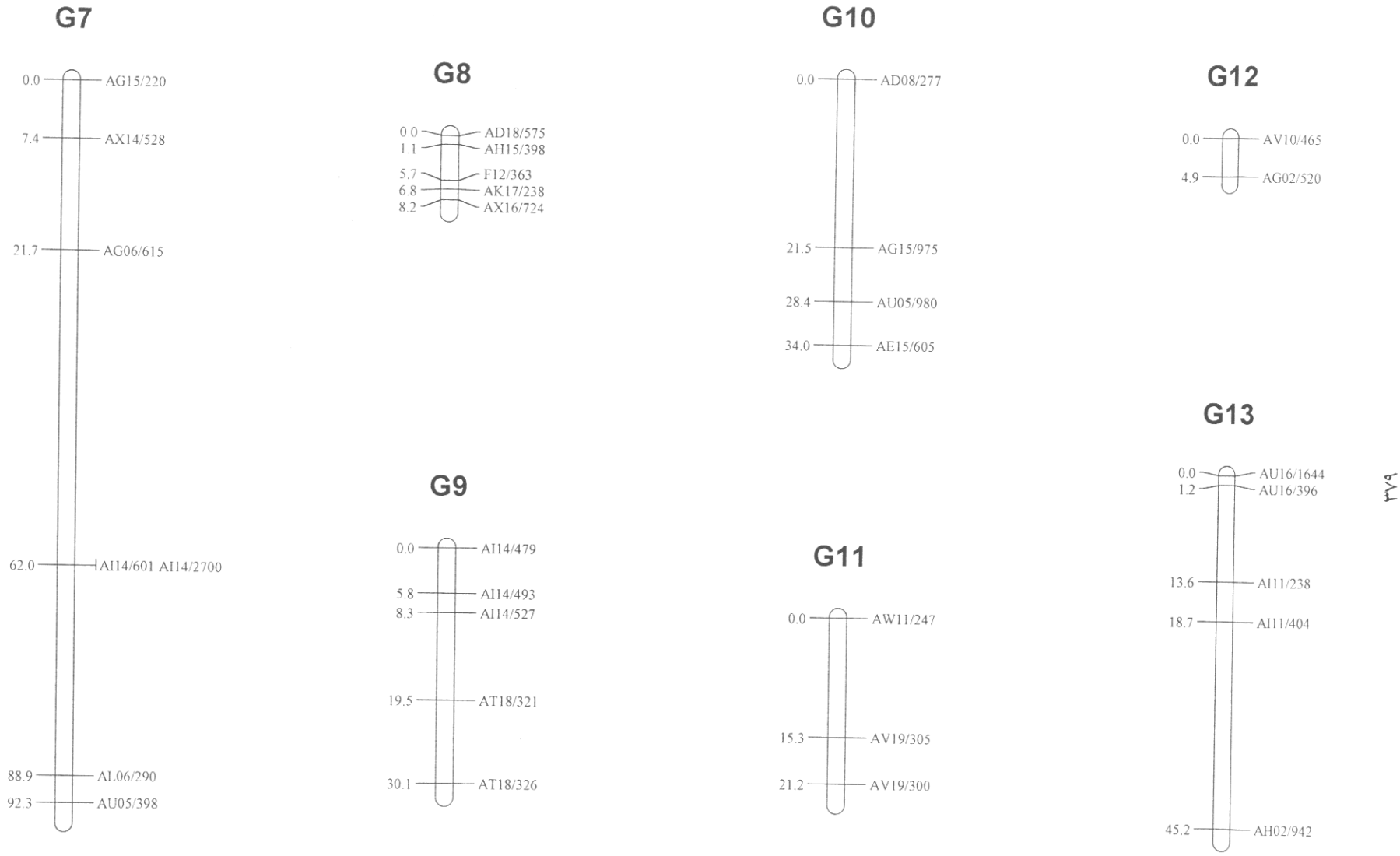
G5



G6



www.SID.ir



شکل ۲- نقشه پیوستگی طالبی- خربزه با استفاده از نشانگر رپید

نام نشانگرها در سمت راست و فاصله هر یک (به سانتی‌مورگان) در سمت چپ هر یک از گروه‌های پیوستگی، درج شده‌اند.

Fig. 2. Linkage map of melon using RAPD primers

Marker names are listed to the right side and the linkage distances (in centiMorgans) to the left side of each linkage group.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

(۸۶/۵ درصد) در ۱۳ گروه پیوستگی قرار گرفتند. گروه‌های پیوستگی و جزییات مربوط به هر یک، در شکل ۲ آورده شده‌اند. این گروه‌ها بر روی نقشه با حرف G و شماره گروه مربوطه نشان داده شده‌اند. طول نقشه حاضر در مجموع ۵۰۴/۷ سانتی‌مورگان بود و گروه‌هایی با طول کمینه ۴/۹ و بیشینه ۹۲/۴ سانتی‌مورگان را شامل می‌شد. در بین گروه‌ها، سه گروه پیوستگی ۳، ۶ و ۷ با طول بیش از ۹۰ سانتی‌مورگان و سه گروه پیوستگی ۱، ۸ و ۱۲ با طول کم‌تر از ۱۰ سانتی‌مورگان به‌ترتیب بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین گروه‌های پیوستگی در نقشه بودند. تعداد نشانگرهای قرارگرفته در هر گروه، از ۲ تا ۲۰ نشانگر متغیر بود. به‌طورکلی، نشانگرها با میانگین فاصله ۵/۲ سانتی‌مورگان نسبت به نشانگرهای مجاور، در گروه‌های مربوطه قرار گرفتند (Remington *et al.*, ۱۹۹۹). این ویژگی که از آن به عنوان تراکم یا فشردگی نقشه نام برده می‌شود، بسته به طول گروه و تعداد نشانگر مکان‌یابی شده در هر گروه، متغیر خواهد بود.

گروه پیوستگی ۵ با طول ۲۵/۹ سانتی‌مورگان و داشتن ۱۷ نشانگر، نسبت به سایر گروه‌ها از تراکم بیش‌تری برخوردار بود. تراکم بالا یکی از ویژگی‌هایی است که همواره در تهیه نقشه‌های ژنتیکی مورد توجه بوده است. با این حال، مشاهده پنج فاصله بزرگ (Gap) در چهار گروه پیوستگی ۳، ۶، ۷ و ۱۳ که اندازه هر یک بیش از ۲۵ سانتی‌مورگان می‌باشد، نشان‌دهنده درجه اشباع پایین نقشه در گروه‌های یاد شده است. به طور کلی تهیه نقشه حاضر، با توجه به ژنوتیپ ایرانی والد مادری که از آن در ایجاد جمعیت مورد نیاز برای تهیه نقشه استفاده شده است، شرایطی را فراهم می‌کند تا امکان مقایسه بیش‌تری بین نقشه‌های موجود گونه طالبی- خربزه (*Cucumis melo* L.) مهیا گردد. بدون تردید این اولین نقشه پیوستگی طالبی- خربزه است که در آن از ژرم پلاسم ایرانی استفاده شده و توسعه بیشتر این نقشه، به‌ویژه با نشانگرهای چند آللی که در بین ژنوم گروه‌های طالبی- خربزه به خوبی حفاظت شده باشند، می‌تواند به آن اعتبار بیشتری ببخشد. دستیابی به وضوح و تراکم بالا در تهیه نقشه‌های ژنتیکی که به افزایش درجه اعتبار و اشباع آن‌ها منجر می‌شود، از اهدافی است که در آینده این پژوهش لازم است دنبال گردد.

منابع مورد استفاده

References

قره‌یاضی، ب. ۱۳۷٤. کاربرد نشانگرهای دی‌ان‌آ در اصلاح نباتات. مجموع مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحه ۳۸۱-۳۲۸.

www.SID.ir

Archive of SID

Anonymous 1999. Wizard Genomic DNA Purification Kit: Technical Manual, Part No. TM050. Promega Corporation, USA.

Baudracco-Arnas, S., and Pitrat., M. 1996. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. Theoretical and Applied Genetics 93: 57–64.

Bennett, M. D., and Leitch, I. 1995. Nuclear DNA amount in angiosperms. Annals of Botany 76: 113-176.

Brotman, Y., Silberstein, L., Kovalski, I., Klinger, J., Thompson, G., Katzir, N., and Perl-Treves, R. 2000. Linkage groups of *Cucumis melo*, including resistance gene homologues and known genes. Acta Horticulturae 510: 441-448.

Danin-Poleg, Y., Reis, N., Baudracco-Arnas, S., Pitrat, M., Staub, J.E., Oliver, M., Arus, P., de Vicente, M. C., and Katzir, N. 2000. Simple sequence repeats in Cucumis mapping and map merging. Genome 43: 963–974.

Danin-Poleg, Y., Reis, N., Tzuri, G., and Katzir, N. 1998. Simple sequence repeats as reference points in Cucumis mapping. pp. 349–353. In: McCreight, J. D. (ed.) Cucurbitaceae'98: Evaluation and enhancement of cucurbit germplasm. American Society for Horticultural Science. Alexandria, U.S.A.

Ford, R. R., and Taylor, P. W. J. 2003. Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*) Theoretical and Applied Genetics 107: 910–916.

Lander, E., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daley, M., Lincoln, S., and Newburg, L. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174–181.

Lincoln, S., Daly, M., and Lander, E. 1992. Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0. 3rd ed. Technical Report of the Whitehead Institute, Cambridge, Mass.

Liou, P. C., Chang, Y. M., Hsu, W. S., Cheng, Y. H., Chang, H. R., and Hsiao, C.H. 1998. Construction of a linkage map in *Cucumis melo* L. using random amplified polymorphic DNA markers. Acta Horticulturae 461: 123-131.

www.SID.ir

Archive of SID

Oliver, J. L., Garcia-Mas, J., Cardus, M., Pueyo, N., Lopez-Sese, A. I., Arroyo, M., Gomez-Paniagua, H., Arus, P., and de Vicente, C. M. 2001. Construction of a reference linkage map for melon. Genome 44: 836-845.

Perin, C., Hagen, L. S., de Conto, V., Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Portnoy, V., Baudracco-Arnas, S., Chadoeuf, J., Dogimont, C., and Pitrat, M. 2002. A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. Theoretical and Applied Genetics 104: 1017-1034.

Remington, D. L., Whetten, R. W., Liu, B.-H., and O'Malley, D. M. 1999. Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. Theoretical and Applied Genetics 98: 1279-1292.

Robinson, R. W., and Decker-Walters, D. S. 1997. Cucurbits. CAB International. Cambridge 226 pp.

Stift, G., Pachner, M., and Lelley, T. 2003. Comparison of RAPD fragment separation in agarose and polyacrylamide gel by studying Cucurbita species. Cucurbit Genetics Cooperative Report 26: 62-65.

Taylor, M. J., and Brant, J. 2002. Trends in world cucurbit production 1991 to 2001. pp.373–379. In:Maynard, D.N. (ed.) Proceedings of Cucurbitaceae 2002 Conference. American Society for Horticultural Science, Naples, Florida, USA.

Voorrips, R. E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. The Journal of Heredity 93: 77-78.

Wang, Y. H., Thomas, C. E., and Dean, R. A. 1997. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Theoretical and Applied Genetics 95: 791–797.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalsky, J. A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531–6535.

آدرس نگارندگان:

عبدالعلی شجاعیان- گروه تولیدات گیاهی- دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام، ایلام.

بهزاد قره‌یاضی- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج.

کاظم ارزانی- گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

حشمت‌الله رحیمیان- دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران، ساری.

تاماش لدلی- بخش فن‌آوری زیستی در تولیدات گیاهی، مؤسسه اگروبیوتکنولوژی، دانشگاه بودنکولتور، تولن، اتریش.

میشل پیترا- بخش ژنتیک و اصلاح سبزی و میوه، مرکز آوینون، مؤسسه تحقیقات کشاورزی مونت فاوت، فرانسه.

www.SID.ir