دانشگاه ارومیه

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان

ارزیابی تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباط برای مقاومت به ویروس موزائیک زرد کدو ZYMV در توده‌های بومی خربزه ایرانی (*Cucumis melo* L.) با استفاده از نشانگرهای ISSR

اساتید راهنما

دکتر بابک عبدالهی مندولکانی **دکتر مرتضی قدیم زاده**

استاد مشاور

دکتر مینا راستگو

اساتید داور

دکتر مراد جعفری **دکتر امیر فیاض مقدم**

تنظیم و نگارش

ساسان رحمان‌پور

بهمن ۱۳۹۱

حق چاپ برای دانشگاه ارومیه محفوظ است.

تقدیم به

پدر و مادر گرانقدرم،

آنان که وجودم برایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر،

توانشان رفت تا به توانایی رسم و موهایشان سپید گشت تا رو سپید بمانم،

آنان که فروغ نگاهشان، گرمی کلامشان و روشنی رویشان،

سرمایه جاودانی زندگی ام است.

و تقدیم به آنانکه اندیشه ها گستراندند و گلستانی بنیان نهادند...

به نام نامی دوست، که هرچه داریم از اوست

سپاس و شکر خدا را که بندها بگشاد میان به شکر چو بستیم بند ما بگشاد

کردگارا سپاست می گویم که این فهم را در من رویاندی که نمی دانم و راه را برای رهاندنم از نادانسته ها هموار ساختی.

در شکرگزاری این نعمت و با دستگیری خوبانی چند، تلاش نمودیم، تا چه حد در خور باشد و تا چه حد مقبول افتد. اکنون که به یاری خداوند متعال مراحل تدوین ونگارش این پژوهش به پایان رسیده است بر خود واجب می دانم که یارانم را ارج نهاده و شکرگزار راهبرانم باشم.

در درجه اول از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر بابک عبدالهی که بزرگوارانه و دلسوزانه با نظرات ارزشمند و مساعدت های بی دریغ خویش راه‌گشای انجام این پژوهش شدند کمال تشکر و قدردانی را دارم. از استاد گرامی، جناب آقای دکتر مرتضی قدیم زاده در سمت استاد راهنمای دوم و سرکار خانم دکتر مینا راستگو که مشاوره پایان نامه اینجانب را برعهده داشتند و با راهنمایی و مشاوره خود مرا در انجام هر چه بهتر این پژوهش یاری نمودند کمال تشکر را دارم. از اساتید داور محترم، جناب آقای دکتر مراد جعفری و جناب آقای دکتر امیر فیاض مقدم که زحمت مطالعه و داوری پایان‌نامه را عهده‌دار بودند و با راهنمایی و نظرات سازنده باعث غنی‌تر شدن پژوهش حاضر گردیدند نهایت قدردانی را می نمایم.

از سایر اساتید گران‌پایه گروه‌های اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی و گیاه‌پزشکی که در محضر آنان بودن سراسر سعادت و افتخار است، کمال تشکر وسپاس را دارم. از مسئولین آزمایشگاه بیماری‌شناسی و پژوهشکده زیست‌فناوری بخاطر در اختیار گذاشتن امکانات لازم جهت انجام این پژوهش تشکر می نمایم. در پایان از تمامی دوستان عزیز و گرانقدرم در دو گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات ۸۹ که بودن در کنارشان دورانی سراسر خاطره بود سپاس‌گزارم و آرزومند سال‌هایی همه بهروزی برایشان هستم.

ساسان رحمان‌پور، بهمن ۱۳۹۱

چکیده

گونه‌های مختلف خانواده کدوئیان بویژه انواع ملون (*Cucumis melo* L.) از مهم‌ترین منابع غذایی بشر می‌باشند که گسترش جهانی دارند. از مهمترین عوامل محدودکننده تولید ملون‌ها، بیماری‌های ویروسی مانند ویروس ZYMV می‌باشد که گاهی تا ۱۰۰ درصد عملکرد را از بین می‌برد. به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم و مکان‌های مرتبط با مقاومت به این ویروس، میزان مقاومت ۳۲ توده و ۱۲ رقم هیبرید ملون نسبت به ویروس ZYMV با روش DAS-ELISA ارزیابی شد. نتایج حاصل نشان داد که تفاوت معنی‌داری (در سطح یک درصد) بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به لحاظ غلظت ویروس وجود دارد. رقم هیبرید PI414723 فاقد آلودگی ولی رقم Charantaio T بیشترین میزان حساسیت و غلظت ویروسی (۱/۸۶۷) را نشان داد. همچنین تنوع ژنتیکی ۱۱ توده و ۱۲ رقم ملون با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR بررسی شد. آغازگرهای مورد استفاده ۳۱۱ مکان تولید نمودند که ۵۲/۲۶ درصد آنها چندشکل بودند. بیشترین (۰/۱۳۵) و کمترین (۰/۰۳۱) میزان هتروزیگوسیتی (He) و بیشترین (۱/۲۳) و کمترین (۱/۰۵۸) تعداد الل‌های موثر (Ne) به ترتیب مربوط به آغازگرهای UBC820 و UBC857 بود. میانگین هتروزیگوسیتی کل ارقام و توده‌ها ۰/۱۵۵ بود. متوسط هتروزیگوسیتی ارقام هیبرید بیشتر از توده‌ها بود. تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضریب تطابق ساده و روش UPGMA توده‌ها و ارقام مورد مطالعه را در ۷ گروه قرار داد. در بررسی ساختار جمعیت بوسیله نرم‌افزار Structure 2.3.1 نیز، میزان K=۷ به عنوان بهترین K برای گروه‌بندی دندروگرام تعیین شد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین توده درگزی و هیبرید Durango و کمترین فاصله ژنتیکی بین توده‌های درگزی و خاتونی بود. مکان‌یابی ارتباطی برای ویروس ZYMV با استفاده از نشانگرهای ISSR و روش MLM نشان داد که مکان‌های 855l، 867n و 885i (دارای بیشترین R^2 و مقدار P-value کمتر از ۱ درصد) احتمالا بیشترین ارتباط را با صفت مقاومت به ویروس ZYMV دارند. استفاده از این نشانگرها، امکان مکان‌یابی دقیق مقاومت به این ویروس را فراهم خواهد ساخت.

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه

فصل اول: مقدمه و اهداف

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۲- اهداف ۳

فصل دوم: کلیات و بررسی منابع

۲-۱- گیاه‌شناسی ۵

۲-۱-۱- اهمیت و گسترش جهانی ملون‌ها ۵

۲-۱-۲- ویژگی‌های فیلوژنیک و تاکسونومیک گیاه ۶

۲-۱-۳- ویژگی‌های ژنتیکی و ژنوم گیاه ۷

۲-۱-۴- آسیب‌پذیری خانواده کدوئیان و ملون‌ها در برابر ویروس‌های بیمارگر ۹

۲-۱-۵- ژن‌های مقاومت به بیماری در ژنوم ملون ۹

۲-۲- ویروس‌ها و بیماری‌های ویروسی ۱۱

۲-۲-۱- ساختار و ژنوم ویروس‌ها ۱۱

۲-۲-۲- پوتی‌ویروس‌ها ۱۲

۲-۲-۳- ویژگی‌های مورفولوژیک و سیستماتیک ویروس موزائیک زرد کدو (ZYMV) ۱۴

۲-۲-۴- علائم آلودگی و خسارات ویروس ZYMV ۱۶

۲-۲-۵- استراتژی‌های مدیریت بیماری‌های ویروسی ۱۷

۲-۲-۵-۱- مهندسی ژنتیک در کنترل بیماری‌های ویروسی گیاهی ۱۸
۲-۲-۵-۲- چالش‌های اساسی در کاربرد گیاهان مقاوم به ویروس ۱۹
۲-۲-۵-۲-۱- تغییر پذیری ژن‌های ویروسی ۱۹
۲-۲-۵-۲-۲- خطرات بیولوژیک ۱۹
۲-۲-۶- روش‌های شناسایی ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها ۱۹
۲-۳- نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA ۲۰
۲-۳-۱- نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۲۱
۲-۳-۲- نشانگر ISSR ۲۲
۲-۴- عدم تعادل لینکاژی و مطالعات تجزیه ارتباط در گیاهان عالی ۲۳
۲-۴-۱- تعریف عدم تعادل لینکاژی و مکان‌یابی ارتباطی ۲۴
۲-۴-۲- فاکتورهای موثر بر LD ۲۶
۲-۴-۳- کاربردهای LD در ژنومیکس گیاهی ۲۷
۲-۴-۳-۱- ارتباط نشانگر- صفت در گیاهان ۲۷
۲-۴-۳-۲- مطالعات انجام یافته در زمینه LD در گیاهان عالی ۲۸
۲-۴-۳-۳- مکان‌یابی ارتباطی ۳۲
۲-۴-۳-۳-۱- مکان‌یابی ارتباطی ژن‌های کاندید ۳۵
۲-۴-۳-۳-۲- مکان‌یابی ارتباطی در سطح ژنوم ۳۶
۲-۴-۳-۳-۳- تجزیه لینکاژ و مقایسه آن با مکان‌یابی ارتباطی ۳۶
۲-۴-۳-۳-۴- روش‌های تجزیه آماری تنوع ژنتیکی در مکان‌یابی ارتباطی ۳۸
۲-۴-۳-۳-۵- اندازه نمونه و تعداد نشانگرهای مولکولی ۳۹
۲-۴-۳-۳-۶- نرم‌افزارهای تجزیه اطلاعات در مکان‌یابی ارتباطی ۳۹
۲-۴-۳-۳-۷- روش‌شناسی مطالعات ارتباطی در گیاهان جهت بررسی صفات ۴۰
۲-۴-۳-۳-۸- مدل‌های خطی سازگار با مطالعات ارتباطی کل ژنوم ۴۱
۲-۴-۳-۳-۹- مقایسه مکان‌یابی ارتباطی ژن کاندید و GWAS ۴۳
۲-۴-۳-۳-۱۰- مکان‌یابی ارتباطی آشیانه‌ای (NAM) ۴۴
۲-۵- آنالیز صفات پیچیده در گیاهان ۴۵

۲-۵-۱- مطالعات ارتباطی مبتنی بر جمعیت ۴۵
۲-۵-۲- مکان‌یابی QTL مبتنی بر خانواده ۴۵
۲-۶- متا-آنالیز ۴۷
۲-۷- مروری بر پژوهش‌های صورت گرفته در بخش‌های مختلف ۴۸
۲-۷-۱- مطالعات انجام شده در مورد ویروس ZYMV ۴۸
۲-۷-۲- پژوهش‌های مرتبط با مطالعه تنوع ژنتیکی و نقشه‌یابی ملون ۴۹
۲-۷-۳- شناسایی مکان‌های مسئول مقاومت به ZYMV ۵۰

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- ارزیابی سرولوژیکی میزان مقاومت به ویروس ۵۳
۳-۱-۱- مواد گیاهی استفاده شده ۵۳
۳-۱-۲- تهیه ویروس و تکثیرآن ۵۳
۳-۱-۳- مایه‌زنی گیاهان ۵۵
۳-۱-۴- نمونه‌برداری گیاهان آلوده ۵۷
۳-۱-۵- آزمون ELISA (DAS-ELISA) ۵۷
۳-۱-۵-۱- پوشش دادن چاهک‌های پلیت با آنتی بادی (IgG) ۵۷
۳-۱-۵-۲- تهیه آنتی ژن ۵۸
۳-۱-۵-۲-۱- افزودن آنتی ژن در چاهک‌ها ۵۸
۳-۱-۵-۳- بلاکینگ (Blocking) ۵۹
۳-۱-۵-۴- افزودن آنتی بادی متصل به آنزیم در چاهک‌ها ۵۹
۳-۱-۵-۵- افزودن سوبسترا ۶۰
۳-۱-۵-۶- ارزیابی نتایج آزمون ELISA ۶۰
۳-۱-۶- تجزیه و تحلیل آماری داده‌های سرولوژیک ۶۱
۳-۲- ارزیابی مولکولی ۶۲
۳-۲-۱- مواد گیاهی ۶۲

۳-۲-۲- استخراج DNA ۶۳
۳-۲-۲-۱- تعیین کیفیت وکمیت DNA ۶۴
۳-۲-۲-۱-۱- استفاده از ژل آگارز ۶۴
۳-۲-۲-۱-۲- روش اسپکتروفتومتری ۶۵
۳-۲-۳- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR) ۶۶
۳-۲-۴- الکتروفورز محصولات PCR ۶۸
۳-۲-۵- امتیازدهی و تجزیه آماری داده‌های ISSR ۶۹
۳-۳- انجام مکان‌یابی ارتباطی ۷۰

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- نتایج حاصل از تست‌های سرولوژیک مقاومت به ویروس ۷۲
۴-۲- نتایج حاصل از داده‌های مولکولی ۷۵
۴-۲-۱- اطلاعات مربوط به آغازگرها ۷۵
۴-۲-۲- مقایسه آغازگرهای بررسی شده از لحاظ نوع توالی‌های تکراری ۸۰
۴-۲-۳- گروه‌بندی افراد، توده‌ها و ارقام مورد مطالعه ۸۱
۴-۲-۴- بررسی ساختار جمعیت در توده‌ها و تایید گروه‌بندی ۸۴
۴-۲-۵- تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) ۸۹
۴-۳- تجزیه ارتباط میزان مقاومت به ویروس ZYMV و تنوع موجود در سطح ژنوم ۹۱
۴-۳-۱- مکان‌یابی ارتباطی مبتنی بر GLM ۹۱
۴-۳-۲- مکان‌یابی ارتباطی مبتنی بر MLM ۹۲

فصل پنجم: نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات

۵-۱- نتیجه‌گیری کلی ۹۵
۵-۲- پیشنهادات ۹۶
منابع ۹۷

فهرست جداول

عنوان ..... صفحه

جدول ۲-۱: میزان تولید ملون، خیار و هندوانه براساس آمار سازمان جهانی فاو در سال ۲۰۰۶ میلادی..... ۶

جدول ۲-۲: طبقه‌بندی ملون‌ها بر اساس صفات رویشی و تنوع میوه ۸

جدول ۲-۳: ژن‌های اصلی مقاومت و تحمل به برخی بیماری‌ها و آفات مهم در ملون‌ها..... ۱۰

جدول ۲-۴: گروه‌بندی ویروس‌های بیمارگر گیاهی توسط ICTV ۱۳

جدول ۲-۵: پروتئین‌های ویروس و عملکرد آن‌ها ۱۵

جدول ۲-۶: روش‌های مهندسی ژنتیک در کنترل بیماری‌های ویروسی گیاهی ۱۸

جدول ۲-۷: تاریخچه نشانگرهای مولکولی مبتنی برDNA ۲۱

جدول ۲-۸: مطالعات LD انجام یافته در گیاهان عالی ۲۸

جدول ۲-۹: الگوریتم‌های مدل خطی ترکیبی MLM ۴۳

جدول ۲-۱۰: مقایسه روش‌های مطالعات ارتباطی مبتنی بر جمعیت و مبتنی بر خانواده ۴۶

جدول ۳-۱: اسامی ارقام هیبرید و توده‌های بومی ملون بررسی شده در این پژوهش و محل جمع‌آوری آنها ۵۴

جدول ۳-۲: ترکیبات بافرهای مورد استفاده در آزمون DAS- ELISA ۵۹

جدول ۳-۳: مشخصات مراحل آزمون DAS- ELISA ۶۰

جدول ۳-۴: نام و کد توده‌ها و هیبریدهای ملون مورد مطالعه در بخش ارزیابی مولکولی ۶۲

جدول ۳-۵: تهیه بافر استخراج CTAB ۶۴

جدول ۳-۶: تهیه بافر TE..... ۶۴

جدول ۳-۷: اجزاء تشکیل دهنده واکنش PCR برای نشانگرهای ISSR ۶۶

جدول ۳-۸: نام، توالی و مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برنامه PCR ۶۷

جدول ۳-۹: برنامه دمایی PCR برای واکنش های ISSR..... ۶۷

جدول ۳-۱۰: تهیه بافر TBE ۱۰ برابر..... ۶۸

جدول ۳-۱۱: تهیه بافر بارگذاری با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر..... ۶۹

جدول ۴-۱: جدول تجزیه واریانس واکنش ژنوتیپ‌های ملون نسبت به ویروس ZYMV ۷۲
جدول ۴-۲: مقایسه میانگین واکنش به ویروس ZYMV در ۴۴ ژنوتیپ ملون با استفاده از آزمون
دانکن در سطح احتمال ۰/۰۱ ..... ۷۴
جدول ۴-۳: خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه ۷۷
جدول ۴-۴: خصوصیات مکان‌های تکثیر شده در توده‌ها و ارقام هیبرید ملون مورد بررسی ۷۹
جدول ۴-۵: مقایسه آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش براساس تکرارهای توالی آغازگرها ۸۰
جدول ۴-۶: درصد آنالیز بوت‌استراپ هر کلاستر ۸۱
جدول ۴-۷: مقادیر F_{st} و هتروزیگوسیتی مورد انتظار و اعضای هر گروه در K=۷ ..... ۸۵
جدول ۴-۸: ماتریس سهم عضویت توده‌ها و ارقام در هر کلاستر براساس محاسبات نرم‌افزار
Structure 2.3.1 ..... ۸۶
جدول ۴-۹: ماتریس Q محاسبه شده توسط نرم‌افزار Structure 2.3.1 در K=۷ ..... ۸۷
جدول ۴-۱۰: تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در توده‌های مورد مطالعه ۹۰
جدول ۴-۱۱: مکان‌های با مقادیر P-value کمتر از ۱٪ و ۵٪ در روش GLM ۹۱
جدول ۴-۱۲: مکان‌های با مقادیر P-value کمتر از ۱٪ و ۵٪ محاسبه شده در روش MLM ۹۲

فهرست اشکال

عنوان ..... صفحه

شکل ۲-۱: الف) ساختار کپسید و ترتیب ژن‌های ژنوم ویروس ZYMV

ب) تصاویر میکروسکوب الکترونی پیکره‌های ویروس ZYMV ۱۴

شکل ۲-۲: علائم مختلف ویروس ZYMV ۱۷

شکل ۲-۳: مراحل مختلف انجام مکان‌یابی ارتباطی ۳۴

شکل ۲-۴: مقایسه شماتیک تجزیه لینکاژ(a) و مکان یابی پیوستگی(b) ۳۷

شکل ۲-۵: دیاگرام مقایسه شماتیک روش‌های مکان‌یابی ارتباطی کل ژنوم و مکان‌یابی ارتباطی

ژن کاندید ۴۴

شکل ۳-۱: مایه‌زنی گیاهان به شیوه مکانیکی ۵۶

شکل ۳-۲: نمونه جدول ثبت مشخصات افراد هر چاهک ۵۸

شکل ۳-۳: نمونه‌هایی از انواع پلیت‌های ELISA ۵۸

شکل ۳-۴: دستگاه ELISA reader استفاده شده در این پژوهش ۶۱

شکل ۴-۱: نمونه‌هایی از علائم ایجاد شده در اثر آلودگی با ویروس ZYMV در توده‌ها و ارقام بررسی

شده ۷۳

شکل ۴-۲: الگوی باندی تکثیر شده توسط آغازگر UBC 840 ..... ۷۸

شکل ۴-۳: الگوی باندی تکثیر شده توسط آغازگر UBC 836 ..... ۷۸

شکل ۴-۴: الگوی باندی تکثیر شده توسط آغازگر UBC 811 ..... ۷۸

شکل ۴-۵: دندروگرام رسم‌شده افراد ۸۲

شکل ۴-۶: دندروگرام رسم شده توده‌ها و ارقام ۸۳

شکل ۴-۷: بارپلات رسم شده توسط Structure2.3.1 در K=۷ ..... ۸۴

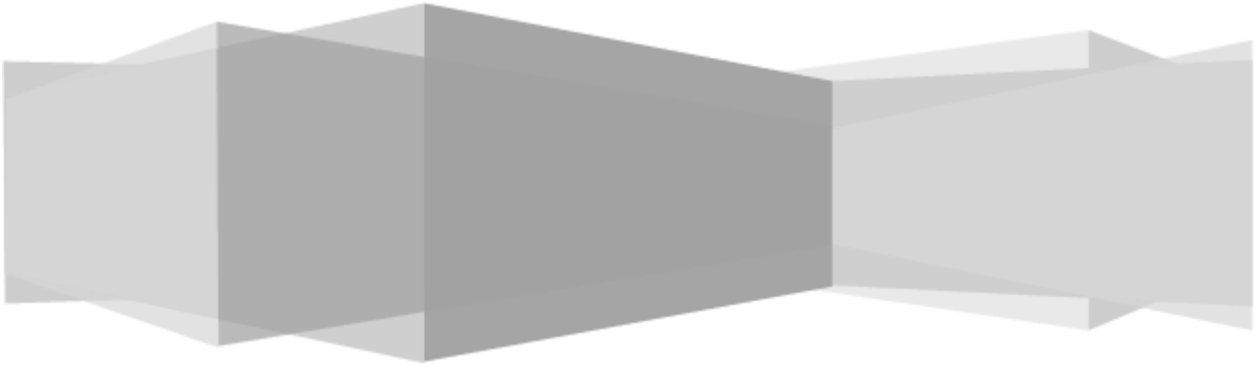
شکل ۴-۸: نمودار دو بعدی پراکنش توده‌ها و ارقام براساس نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) ۸۹

شکل ۴-۹: نمودار سه بعدی پراکنش توده‌ها و ارقام براساس نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) ۸۹

فصل اول

مقدمه و اهداف

Introduction & Purposes



۱–۱– مقدمه

گونه ملون (*Cucumis melo* L.) یکی از انواع گیاهان صیفی جالیزی از خانواده کدوئیان است که گسترش جهانی دارد. این گونه دگربارور، دیپلوئید (2n=2x=24)، یک‌ساله و اغلب یک‌پایه می‌باشد. این گیاه بومی آفریقا بوده و مراکز تنوع ثانویه آن خاورمیانه و هند می‌باشد. کدوئیان از لحاظ اهمیت اقتصادی پس از خانواده بادنجانیان در رتبه دوم قرار می‌گیرند. علی‌رغم تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی بالا در ژرم پلاسم ملون و وجود ژن‌های مقاومت متعدد، این تنوع به اندازه کافی در برنامه‌های اصلاحی ملون و تولید ارقام مقاوم به بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار نگرفته است و اغلب ارقام زراعی موجود عموما بر پایه یک یا چند والد تولید شده‌اند. بنابراین جهت بهره‌برداری از تنوع موجود در ژرم پلاسم ملون، ارزیابی تنوع ژنتیکی و صفات مورفولوژیکی و زراعی آن ضروری است.

خانواده کدوئیان و بویژه گونه *C. melo* به علت اهمیت غذایی و دارویی آن و نیز به خاطر نوع تمایز جنسی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. متاسفانه اکثر پژوهش‌های صورت گرفته بر محور افزایش عملکرد و سایر صفات کمی استوار بوده و کمتر به افزایش مقاومت این گیاه در برابر بیمارگرها و آفات پرداخته شده است. از مهم‌ترین موانع موجود در تولید تجاری برخی از انواع واریته‌های ملون، آسیب‌پذیری آنها در برابر بیمارگرها و آفات مختلف می‌باشد، بویژه بیماری‌های ویروسی که بر خلاف سایر بیمارگرها و آفات بوسیله تیمار با سموم قابل کنترل و پیشگیری نیستند و تنها راه مدیریت آنها استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. ارقام مقاوم را به دو صورت می‌توان تهیه نمود؛ از طریق مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان تراریخت، که به علت خطرات بیولوژیکی احتمالی، بازده پایین و عدم اطمینان از فعالیت ژن در طی نسل‌های آتی زیاد قابل اعتماد نیست، و روش دوم استفاده از ارقام و توده‌های حاوی ژن‌های مقاومت و تولید ارقام هیبرید می‌باشد. گام اساسی در این روش، شناسایی افراد و توده‌های حامل ژن‌های مقاوم به بیمارگرها مورد نظر است. در تحقق این هدف می‌توان از تجزیه

لینکاژ و مکان‌یابی مبتنی بر لینکاژ بهره برد که این روش محدودیت‌های زیادی به همراه دارد. بنابراین امروزه از دیدگاه مکان‌یابی ارتباطی[1] و تجزیه ارتباط صفت- نشانگر استفاده می‌شود. در روش مکان‌یابی ارتباطی، ارتباط داده‌های مولکولی و نتایج حاصل از ارزیابی‌های بررسی می‌شود. مکان‌یابی ارتباطی خود به دو روش ژن کاندید[2] و مکان‌یابی ارتباطی کل ژنوم GWAS[3] صورت می‌گیرد که روش مکان‌یابی ارتباطی کل ژنوم به علت عدم نیاز به اطلاعات قبلی و پوشش کل ژنوم اطلاعات جامع‌تر و کامل‌تری را در زمینه تنوع ژنتیکی و وجود مکان‌های احتمالی مسئول بروز مقاومت و حساسیت ارائه می‌نماید. بررسی ژنوم با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA صورت می‌گیرد. این نشانگر تنوع و چندشکلی موجود در توالی DNA افراد مختلف را شامل می‌شوند که این تفاوت‌ها ناشی از اضافه شدن، حذف‌شدگی، دوبرابرشدگی و جهش‌های نقطه‌ای در توالی DNA می‌باشد. این نشانگرها بسته به چگونگی نشان‌دادن تفاوت، به دو روش مبتنی بر PCR و غیر مبتنی بر PCR تقسیم می‌شوند. در نشانگرهای مبتنی بر PCR از واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر قطعات DNA مجزا که توالی‌های اطراف آنها بسیار مشابه آغازگرها باشد استفاده می‌شود. نشانگر ISSR یک نشانگر مبتنی بر PCR بر پایه روش ریزماهواره می‌باشد که به اطلاعات اولیه در زمینه ژنوم و طراحی آغازگر نیاز ندارد. این نشانگر غالب بوده و توارث ساده مندلی دارد.

از مهم‌ترین مشکلات در انجام مکان‌یابی ارتباطی، پیوستگی‌های دروغین نشانگر- صفت بخاطر وجود ساختار در جمعیت است. برای برآورد آن و حذف اثر آن از دو نرم افزار Sructure و TASSEL و روش محاسباتی MLM استفاده می‌شود. نرم‌افزار Sructure میزان K را در بین افراد مورد آزمایش محاسبه کرده و از روی آن ماتریس Q را که بیان‌کننده ساختار جمعیت است، ارائه می‌نماید که با استفاده از این ماتریس در نرم افزار TASSEL ارتباط بین ارزیابی‌های سرولوژیک و داده‌های مولکولی بررسی شده و تجزیه ارتباط بدون نتایج مثبت کاذب صورت می‌گیرد.

در این پژوهش سعی شده است تا میزان مقاومت ارقام هیبرید و توده‌های بومی ملون ایرانی را نسبت به ویروس ZYMV با روش آزمون سرولوژیک DAS-ELISA ارزیابی نموده و داده‌های سرولوژیک حاصل با داده‌های مولکولی حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR جهت تجزیه ارتباط

[1] Association mapping
[2] Candide gene
[3] Gnome-wide association mappimg

و شناسایی مکان‌های مرتبط با مقاومت و حساسیت به ویروس ZYMV شناسایی شوند و مکان‌یابی ارتباطی در سطح ژنوم در مورد صفت مقاومت به ویروس مذکور انجام شود.

تاکنون نشانگرهای مولکولی مرتبط با مقاومت به این ویروس در ملون با روش مکان‌یابی ارتباطی شناسایی نشده و به علت دقت بالای این روش، پژوهشی با اهداف ذیل پایه‌ریزی شد.

۱-۲- اهداف:

۱) ارزیابی سرولوژیک میزان مقاومت و حساسیت ارقام هیبرید و توده‌های بومی ملون ایرانی به ویروس ZYMV با استفاده از روش سرولوژیک ELISA

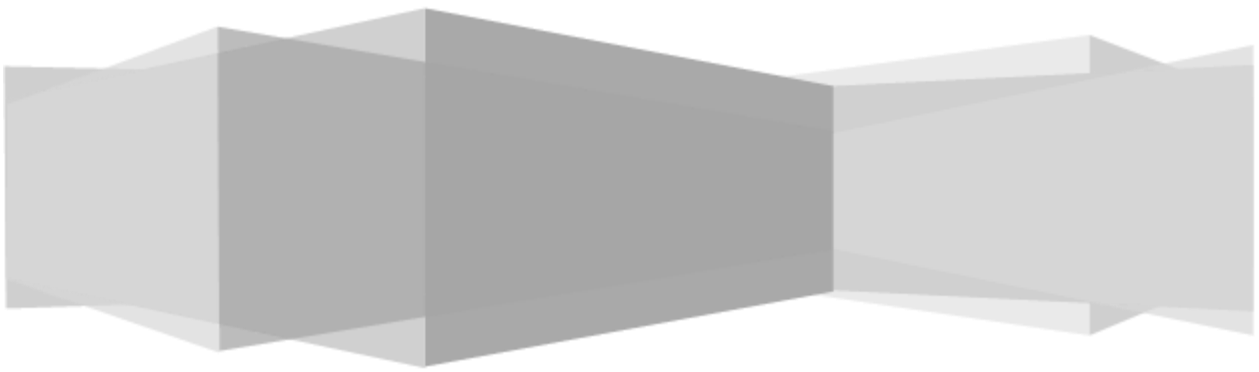
۲) بررسی تنوع ژنتیکی ارقام هیبرید و توده‌های بومی ملون ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

۳) تجزیه ارتباط برای مقاومت به ویروس ZYMV با استفاده از داده‌های مولکولی حاصل از نشانگرهای ISSR

فصل دوم

کلیات و بررسی منابع

Doctrine & Survey of References



۲-۱- گیاه‌شناسی

۲-۱-۱- اهمیت و گسترش جهانی ملون‌ها

خانواده کدوئیان[1] از مهم‌ترین منابع غذایی بشر بوده و از لحاظ اهمیت اقتصادی پس از خانواده بادنجانیان[2] در رتبه دوم قرار می‌گیرد. این خانواده شامل ۱۱۸ جنس و ۸۲۵ گونه است که گسترش جهانی داشته اما اغلب در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان انتشار یافته‌اند (Wang et al. 2007). اقتصادی‌ترین محصولات این خانواده، هندوانه[3]، خیار[4] و ملون[5] می‌باشند. بیشترین تحقیقات ژنتیکی در مورد خیار و ملون صورت گرفته و در مقایسه با آنها، در مورد سایر اعضای این خانواده اطلاعات کمی بدست آمده است.

[1] *Cucurbitaceae*
[2] *Solanaceae*
[3] Watermelon: *Citrallus lanatus*
[4] Cucumber: *Cucumis sativus*
[5] Melon: *Cucumis melo*

در ایران ۲۱/۵ میلیون تن سبزی در سال در سطحی معادل ۸۰۴ هزار هکتار تولید می‌شود که ۳۲/۲ درصد این تولید به تیره کدوئیان تعلق دارد. خربزه و طالبی از مهم‌ترین سبزی‌های این تیره هستند که سهمی معادل ۲۳ درصد تولید این تیره را دارا می‌باشد. گیاهان خانواده کدوئیان از نظر اقتصادی اهمّیت فراوانی دارند به طوری که با تولید سالانه بیش از ۶۰ میلیون تن، حدود ۱۴ درصد تولید سبزی‌ها را به خود اختصاص می‌دهند (صالحی و همکاران، ۱۳۸۷). طبق آمار سازمان خواروبار و کشاورزی[1] در سال ۲۰۰۶ میلادی، ایران با تولید ۱/۲۳ میلیون تن انواع ملون، پس از کشورهای چین و ترکیه، سومین تولیدکننده بزرگ این محصولات در جهان است (جدول ۲-۱).

جدول ۲-۱: میزان تولید ملون، خیار و هندوانه براساس آمار سازمان جهانی فائو در سال ۲۰۰۶ میلادی (Wang et al. 2007).

ملون			خیار			هندوانه	
کشور	سطح زیر کشت*	تولید**	کشور	سطح زیر کشت	تولید	کشور	سطح زیر کشت	تولید
چین	۵۷۸۵۰۰	۱۵۱۳۸۰۰۰	چین	۱۵۵۳۱۰۰	۲۶۵۵۹۶۰۰	چین	۲۰۱۱۴۵۰۰	۶۹۳۱۵۰۰۰
ترکیه	۱۰۳۰۰۰	۱۷۰۰۰۰۰	ترکیه	۶۰۰۰۰	۱۷۲۵۰۰۰	ترکیه	۱۳۷۰۰۰	۳۸۰۰۰۰۰
ایران	**۸۰۰۰۰**	**۱۲۳۰۰۰۰**	ایران	۸۰۰۰۰۰	۱۴۰۰۰۰۰	ایران	۱۰۰۰۰۰	۲۱۵۰۰۰۰
اسپانیا	۳۵۲۰۰	۱۱۷۶۹۰۰	آمریکا	۶۸۶۶۰	۹۶۹۴۰۰	آمریکا	۵۷۱۴۰	۱۶۶۹۹۴۰
آمریکا	۴۵۱۸۰	۱۱۵۰۴۴۰	ژاپن	۱۴۵۰۰	۶۸۰۰۰۰	مصر	۶۲۰۰۰	۱۵۰۰۰۰۰
جهان	۱۳۰۸۰۱۸	۲۸۳۲۱۱۵۹	جهان	۲۴۸۸۶۰۰	۴۱۷۴۳۸۴۰	جهان	۳۴۲۴۵۰۷	۹۵۲۹۲۰۵۱

*سطح زیر کشت بر حسب هکتار **تولید برحسب تن

۲-۱-۲- ویژگی‌های فیلوژنتیک و تاکسونومیک گیاه

خربزه، طالبی، گرمک، دستنبو و خیار چنبر گروه‌های مختلفی از گونه *Cucumis melo* هستند که با هم براحتی تلاقی یافته و انواع حد واسط آنها تشکیل می‌شود. اصطلاح ملون[2] به عنوان نام کلی آنها بکار می‌رود. ملون‌ها (خربزه‌ئیان) گیاهانی جالیزی، یک‌پایه و دگربارور، با اهمیت اقتصادی فراوان هستند که میزان دگرباروری آنها به فعالیت حشرات گرده‌افشان بستگی دارد (Kirkbride, 1993). جنس *Cucumis* sp. شامل ۳۲ گونه است که ۱۳ گونه آن و از جمله *C. melo* پایه کروموزومی n=12 دارند (Kerje and Grum, 2000). ملون‌ها گیاهانی دیپلوئید 2n=2x=24 می‌باشند. در مورد طبقه‌بندی ملون‌ها، Charls Naudian (گیاه‌شناس فرانسوی) براساس

[1] Food and agriculture organization FAO
[2] Melon

صفات رویشی و تنوع میوه این گونه را به ده گروه تقسیم‌بندی نمود (Robinson et al.1997) که بعدها مانگر و رابینسون سیستم سه نامی را برای آنها پیشنهاد نمودند(Munger and Robinson, 1991) . از شناخته‌شده‌ترین گروه‌ها در ایران، می‌توان به گروه *Canaloupensis* با نام طالبی، گروه *Inodorus* با نام خربزه و گروه *Flexouous* با نام خیار چنبر اشاره نمود (جدول۲-۲).

منشا ملون مورد بحث است، برخی پژوهشگران جنوب‌غربی و مرکز آسیا، یعنی کشورهای ترکیه، سوریه، ایران، افغانستان، شمال و مرکز هند، ماوراء قفقاز، تاجیکستان و ازبکستان را مراکز اولیه تنوع ملون‌ها می‌دانند (Kerje et al. 2000). لیکن با توجه به توزیع ملون‌های وحشی در مونوگراف کیرکبراید (Kirkbride, 1993)، به نظر می‌رسد آفریقا مرکز اولیه تنوع باشد. تحقیقات جدیدتر نشان می‌دهد که اجداد وحشی ملون و هندوانه زراعی از آفریقا منشا گرفته‌اند و البته گونه‌های وحشی و آزادزی کوکوربیت[1] امروزه نیز در این قاره یافت می‌شوند. دو گونه ملون و هندوانه در مناطق متعددی از مراکز تنوع ثانویه نظیر خاور میانه و هند اهلی شده‌اند. در مقابل، گونه خیار[2] از مناطق جنوب غربی آسیا منشا گرفته است. شواهد باستانی و اسناد تاریخی نشان می‌دهد که ملون‌ها بویژه خربزه برای نخستین بار ۳۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح در کشورهای مصر و ایران اهلی شده‌اند و کشت آنها نخستین بار در سواحل مدیترانه، خاور میانه و سپس آسیا گسترش یافته و از مدیترانه به اروپا و آمریکا راه یافته است (Staub et al. 1997).

۲-۱-۳- ویژگی‌های ژنتیکی و ژنوم گیاه

همان‌گونه که اشاره شد، ملون‌ها گیاهانی دیپلوئید با 2n=2x=24 می‌باشند. ژنوم ملون اندازه کوچکی دارد. مطالعات اندازه ژنوم آن را ۵۰۰-۴۵۰ میلیون جفت باز (Mbp) تخمین می‌زنند که تقریبا برابر با ژنوم برنج (۴۱۹ میلیون جفت باز) بوده و سه برابر بزرگتر از ژنوم گیاه مدل، آرابیدوپسیس[3]، (۱۲۵میلیون جفت باز) می‌باشد. نقشه ژنتیکی ملون در حد ۱۰۲۱ سانتی مورگان برآورد شده است که هر سانتی مورگان بطور تقریبی ۴۴۰ کیلو جفت باز را پوشش می‌دهد (Puigdomenech et al. 2007).

گیاهان خانواده کدوئیان به خاطر نوع تمایز جنسی شهرت دارند. همانند سایر اعضای این خانواده، ملون‌ها نیز گیاهانی دوجنسی و تک‌جنسی تولید می‌کنند که منجر به تمایز در فنوتیپ‌های جنسی، به علت

[1] Cucurbit
[2] *Cucumis sativus*
[3] *Arabidopsis taliana*