بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کدوتخم‌کاغذی (*Cucurbita pepo* var. styriaca) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

پریا امیری[1]، احمد اسماعیلی[2,*] و جواد هادیان[3]

١- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
٢- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
٣- دانشیار، گروه باغبانی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

(تاریخ دریافت: ١٣٩٦/٠١/٢٢ – تاریخ پذیرش: ١٣٩٦/٠٥/٠٨)

چکیده

مطالعه تنوع ژنتیکی در گیاهان دارویی، یکی از اهداف مهم به‌نژادی است. پیشرفت های اخیر در کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، امکان بررسی افراد یک جمعیت را در تعداد مکان‌های ژنی بیشتری از ژنوم فراهم ساخته است و از میان نشانگرهای مولکولی DNA، نشانگر ISSR نیز به طور موفقیت آمیزی در مطالعات مختلف تنوع ژنتیکی گیاهان استفاده شده است. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ٤٣ نمونه از ٥ جمعیت کدوتخم‌کاغذی و ٤ نمونه از ١ جمعیت کدوتنبل کشت شده در کلکسیون دانشگاه شهید بهشتی توسط ١٢ نشانگر ISSR بررسی شد. در مجموع ٨٣ نوار قابل امتیازدهی به‌دست آمد و میانگین نوارهای تولیدی توسط نشانگرها ٦/٩١ بود و ١٠٠ درصد نوارهای قابل امتیازدهی چند شکلی نشان دادند. دندروگرام بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش خوشه‌بندی CLink (Complete Linkage)، ترسیم گردید و پنج گروه اصلی به‌دست آمد. نتایج به دست آمده از گروه‌بندی با دو روش تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه خوشه‌ای نشان داد که گروه‌بندی ارایه شده توسط دو روش مزبور با یکدیگر مشابه بودند. ضریب کوفنتیک محاسبه و ٠/٩٧ به‌دست آمد. در مجموع نتایج نشان داد که برخی از نشانگرهای ISSR استفاده شده در این تحقیق، برای مطالعات آینده تنوع ژنتیکی در گونه *Cucurbita pepo* مفید است.

واژگان کلیدی: کدو تخم کاغذی، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی، اطلاعات چندشکلی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **ismaili.a@lu.ac.ir**

مقدمه

جنس کدو با نام علمی *Cucurbita* متعلق به خانواده *Cucurbitaceae* و طایفه *Cucurbiteae* است و شامل ۱۲ گونه است (Grisales *et al*., 2009). همه گونه‌های جنس *Cucurbita* دارای ۲۰ جفت کروموزوم (۲n=٤٠) بوده و تعداد کروموزوم‌های پایه در آنها ۱۰ عدد (x=۱۰) می باشد. از این تعداد تنها ۵ گونه دارای اهمیت زراعی هستند که اهلی شده و مورد کشت و کار قرار می‌گیرند. این گونه‌ها شامل کدو تخم‌کاغذی (*Cucurbita pepo*)، کدو حلوائی (*C. moschata* Duch.)، کدو تنبل (*C. maxima* Duch.) و دو گونه‌ی دیگر از انواع کدو تنبل (*C. argyrosperma* Hubber. و *C. ficifolia* Bouche.) می‌باشند (Nee, 1990)؛ اگرچه گونه‌های *C. moschata*، *C. maxima* و *C. pepo* دارای معروفیت بیشتری هستند. کدوسانان یکی از تیره‌های بزرگ گیاهی هستند که در تغذیه بشر استفاده می‌شوند و به علت رشد سریع در دوره رشد خود و تولید میوه‌های خوراکی آبدار مورد توجه‌اند. کدو، خربزه، خیار، هندوانه و طالبی جز این خانواده هستند و در سراسر ایران کشت می‌شوند و به آب‌وهوای مناطق شمال و جنوب ایران هم سازگار می‌باشند (Grisales *et al*., 2009). در طب سنتی از قسمت‌های مختلف گوشتی انواع کدو به‌عنوان ماده ضد قند و تأمین-کننده املاح بدن استفاده شده است. روغن‌های دانه گیاهان این جنس به‌طور مؤثری در درمان کرم‌های روده ای، هیپوتروفی پروستات، التهاب معده و تصلب شرایین و همچنین در جلوگیری از انقباضات نامنظم قلب، کاهش خطر تشکیل سنگ مثانه و کلیه نقش مؤثری دارند. قطره پروستاتان دارویی است که از بذور این گیاه تولید شده و برای درمان بیماری‌های دستگاه ادرار کاربرد دارد (Zargari, 2005).

مطالعات ژنوتیپی برای شناسایی ژنوتیپ‌های مشابه به‌منظور حفظ، ارزیابی و استفاده از ذخایر ژنتیکی، مطالعه تنوع ژرم‌پلاسم وحشی، بومی یا اصلاح‌شده قبل از شروع برنامه‌های اصلاحی و همچنین شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌ها از هم بسیار حائز اهمیت است (De Girorgio, 2007; Arab Tajandareh *et al*., 2016). از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR به عنوان ابزار قدرتمند برای شناسایی چندشکلی و مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان استفاده می‌شود (Zietkiewiz *et al*., 1994). امروزه استفاده از توالی‌های تکراری ساده داخلی به‌عنوان نشانگرهای مبتنی بر تکرارهای دی‌نوکلئوتید، ترانوکلئوتید یا پنتانوکلئوتید، در میان محققان به صورت یک روش متداول درآمده است (Zietkiewiz *et al*., 1994). نشانگرهای ISSR نیمه‌تصادفی بوده و از تکرارپذیری و چندشکلی بالایی برخوردار است و در دامنه وسیعی از گیاهان کاربرد دارد (Denduangboripant *et al*., 2010). این روش شامل تکثیر قطعه‌های DNA موجود در فواصل بین دو ناحیه تکراری ریزماهواره‌ای است که در دو سوی آن قرار دارند (Shi *et al*., 2010). نشانگر ISSR مانند RAPD یک نشانگر غالب است، اما نسبت به آن تکثیرپذیری و تنوع‌پذیری بالاتری داشته، سریع بوده و روشی آسان است. این نشانگرها نیاز کم به DNA الگو دارند. این نشانگرها تکرارپذیری نشانگرهای ریز ماهواره (SSR) را به دلیل طویل بودن طول نشانگرهایشان دارا می‌باشند. در واقع این تکنیک اغلب مزایای ریزماهواره‌ها را دارد و روش‌های AFLP و RAPD را در هم می‌آمیزد (Chen *et al*., 2008).

با توجه به مشخصات نشانگر ISSR در مقایسه با نشانگر-های دیگر، در مطالعات ژنتیکی بین افراد بسیار نزدیک وطبقه‌بندی کولتیوارها، برتری دارد (Chen *et al*., 2008; Powell *et al*., 1996). این تکنیک همچنین برای مطالعات تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی که هیچ نوع اطلاعی از توالی آن در دسترس نیست مناسب است (Godwin *et al*., 1997). بر اساس بررسی‌های پیشین از نشانگرهای ISSR روی گیاهانی مثل ریحان (*Ocimum basillicum*) توسط Shinde و همکاران (Shinde *et al*., 2010)، پنیرک (*Malva sylvestris*) توسط Celka و همکاران (Celka *et al*., 2010)، بنگ‌دانه (*Hyoscyamus muticus* L.) توسط

El- shawaf و همکاران (El-shawaf *et al*., 2009)، گل ساعت (*Passiflora caerulea*) توسط Dos Santos (Dos Santos, 2011)، توتون (*Nicotiana tabacum* L.) توسط Shazdehahmadi و Kharazi (Shazdehahmadi and Kharazi, 2016)، و ۵ جنس مختلف از کدوی ایران توسط Esmailnia و همکاران (Esmailnia *et al*., 2015)، استفاده شده است. هدف از این پژوهش شناسایی و معرفی جمعیت‌هایی با تنوع مناسب به‌منظور پایه‌ریزی برنامه‌های اصلاح گونه مورد مطالعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ۵ جمعیت کدو تخم‌کاغذی و ۱ جمعیت کدو تنبل، که از مزرعه کلکسیون دانشگاه شهید بهشتی شهر تهران جمع‌آوری شدند، به منظور دست‌یابی به اطلاعات تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی آنها جهت استفاده در برنامه‌ریزی‌های اصلاحی بعدی با استفاده از روشهای مولکولی DNA مورد بررسی قرار گرفتند. پنج جمعیت از کدو تخم‌کاغذی متعلق به تهران، همدان، زردبند، فارس، نمونه نامشخص کلکسیون و ۱ جمعیت از کدو تنبل همدان بود. از جمعیت تهران ۹ نمونه، همدان ۱۰ نمونه، زردبند ٤ نمونه، فارس ۱۰ نمونه، نمونه نامشخص کلکسیون دانشگاه شهید بهشتی ۱۰ نمونه و کدو تنبل همدان ٤ نمونه جمع آوری شد (جدول ۱).

در ابتدا برای استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان در حال رشد نمونه‌گیری شد و در تانک حاوی ازت مایع نگهداری و بلافاصله به فریزر ۸۰- منتقل شد. DNA ژنومی از برگ‌های پودر شده در ازت مایع توسط کیت استخراج DNA شرکت توپاز ژن استخراج شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. برای بررسی کیفیت با این روش نمونه‌هایی که جذب آنها بین ۲-۱/۸ بود، انتخاب شدند. همچنین برای بررسی بیشتر کیفیت DNA استخراجی و بررسی عدم شکستگی (Smear) مولکول، نمونه‌ها روی ژل آگارز ۰/۸ درصد با بافر TBE 0/5x و ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شدند. در نهایت غلظت DNAهایی که از نظر کیفیت مناسب بودند برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر رسانده شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۱۰ میکرولیتر برای تمامی نمونه‌ها بهینه شد. مواد واکنش PCR برای نشانگر ISSR، شامل ۳ میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰ نانوگرم در هر میکرولیتر، ۰/۷ میکرولیتر نشانگر با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر، ۱/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و ٤/۸ میکرولیتر از کیت مسترمیکس PCR با غلظت 2X بود. شرایط تکثیر PCR برای ISSR شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه و پس

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های جمع‌آوری شده

Table 1. Characteristics of collected samples

کد Code	توده/جمعیت Population	گونه Species
T1-T9	تهران Tehran	کدوتخم‌کاغذی *C. pepo*
H1-H10	همدان Hamedan	کدوتخم‌کاغذی *C. pepo*
Z1-Z4	زردبند Zardband	کدوتخم‌کاغذی *C. pepo*
F1-F10	فارس Fars	کدوتخم‌کاغذی *C. pepo*
C1-C10	نمونه نامشخص از کلکسیون دانشگاه شهید بهشتی Uncertain sample of Shahid Beheshti University Collection	کدوتخم‌کاغذی *C. pepo*
KTH1-KTH4	همدان Hamedan	کدوتنبل *C. maxima*

از آن ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال نشانگر در دمایی بین ۵۲-٤۹ سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بود. در پایان چرخه‌ها، برای اطمینان از سنتز کامل تمامی رشته‌ها، بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای بررسی محصولات تکثیر شده PCR، نمونه‌ها برروی ژل آگارز ۳ درصد با جریان ۸۰ ولت به مدت ۱۵۰ دقیقه در دستگاه الکتروفورز بارگذاری شدند. برای تعیین حدود اندازه نوارها روی ژل، از اندازه نشانگر ۱۰۰ جفت باز استفاده شد. برای مشاهده نوارها، عکس‌برداری زیر نور UV به‌وسیله ژلداک صورت گرفت. در این پژوهش از ۱۲ نشانگر ISSR که در مطالعات قبلی توانستند چند شکلی بالایی نشان دهند (Karimi *et al*., 2014) استفاده شد؛ که نشانگرهای شماره ۱ تا ۱۰ نشانگر IS و نشانگرهای ۱۱ و ۱۲ نشانگرهای UBC بودند (جدول ۲).

آنالیز داده‌ها: نوارها بر اساس حضور (۱) و عدم حضور (۰) امتیازدهی شدند و هر نوار به عنوان یک جایگاه ژنی در نظر گرفته شد (شکل ۱). محاسبات با نرم افزار NTSYS-PC نسخه ۲/۰۲ انجام شد. دندروگرام با روش Clink با واحد SHAN توسط همین نرم‌افزار ترسیم گردید. از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA: Principal Coordinate Analysis) برای گروه‌بندی بر پایه ضریب تشابه یا واریانس/کوواریانس در بین داده‌ها استفاده شد که اطلاعات مفیدتری درباره تمایز گروه‌های اصلی ارائه می کند (Rohlf, 1987). محتوی اطلاعات چندشکل (PIC: Polymorphic Information Content) برای هر نشانگر با استفاده از فرمول $PIC=\Sigma[2pi\ (1-pi)]$ محاسبه گردید. در این رابطه PIC، محتوای اطلاعات چند شکل، p_i، فراوانی نوار i ام و $(1-p_i)$ فراوانی نوار iام در حالت عدم وجود نوار می‌باشد (Thimmappaiah *et al*., 2008). شاخص نشانگر (MI: Marker Index) بر اساس فرمول $MI = PIC.N.\beta$ (Thimmappaiah *et al*., 2008) محاسبه گردید، که N تعداد کل نوارها برای هر نشانگر و β درصد چندشکلی (تعداد جایگاه‌های چندشکل تقسیم بر تعداد کل جایگاه‌ها) برای هر نشانگر می‌باشد. شاخص نشانگر پتانسیل هر نشانگر برای تولید نوار بیشتر را نشان می‌دهد (Powell *et al*., 1996; Anderson *et al*., 1993).

نتایج و بحث

تمامی نشانگرهای استفاده شده ISSR، چندشکلی قابل توجهی نشان دادند. از مجموع ۱۲ نشانگر ISSR، ۸۳ نوار تولید شد که تمامی نوارها در سطح جمعیت چندشکل بودند. تعداد نوارهای چندشکل بین ۵ (برای نشانگرهای IS4، IS5، IS6 وIS21) تا ۹ (برای نشانگرهایIS7، IS8 وIS11) متغیر بود. درصد چندشکلی ۱۰۰ درصد محاسبه گردید (جدول ۳). میانگین محتوی اطلاعات چند شکل نشانگرها ۰/۲۳ برآورد شد که بین ۰/۱٤ (برای نشانگر IS4) تا ۰/۳۲ (برای نشانگرهای UBC868 وIS5) قرار داشت. بنابراین نشانگرهای UBC868 و IS5 بهتر از سایر نشانگرهای به‌کار رفته توانستند فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کنند. محاسبه شاخص نشانگر MI برای هر کدام از نشانگرهای مورد استفاده نشان داد که بیشترین میزان شاخص نشانگر مربوط به نشانگر IS11 (۲/۳٤) و کمترین مقدار مربوط به نشانگرها IS4 (۰/۷) بود. این شاخص نشان داد که نشانگر IS11 نسبت به سایر نشانگرها پتانسیل بالاتری در تولید نوار بیشتر دارد.

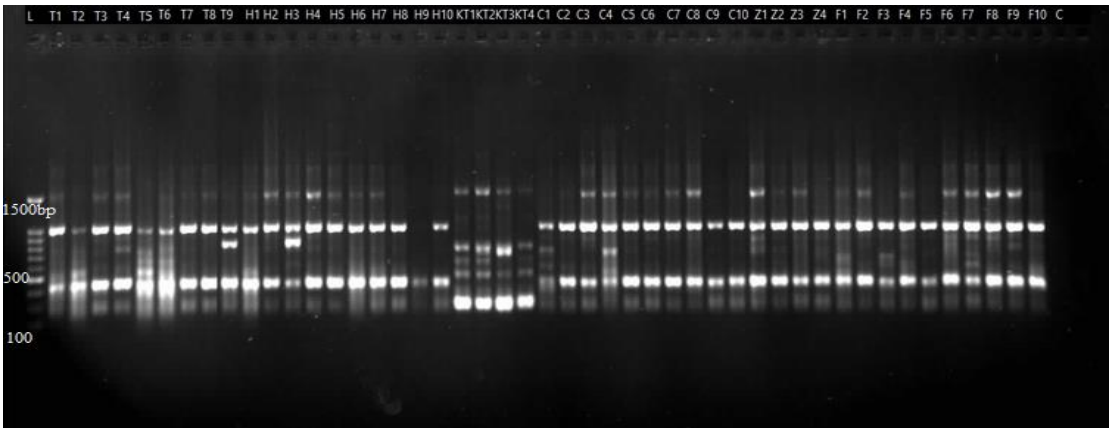
در این پژوهش، بر اساس داده‌های حاصل از نشانگرهای ISSR، دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش Clink و بر اساس ماتریس تشابه جاکارد با نرم‌افزار NTSYS-PC ترسیم شد (شکل۲). در مجموع دندروگرام حاصل از داده‌های ISSR، ٤۷ فرد این ٦ جمعیت را بر اساس ضریب تشابه حدود ۰/٤۵ در پنج گروه طبقه‌بندی کرد. گروه اول شامل فرد شماره ۱ از جمعیت تخم‌کاغذی نامشخص کلکسیون، گروه دوم شامل فرد شماره ۹ از جمعیت تخم‌کاغذی همدان، گروه سوم شامل افراد جمعیت کدو تنبل همـــدان و گروه چهارم شامل افراد شماره ۵ از جمعیت تخم‌کاغذی تهران، شمـــاره ۹ از

جمعیت تخم‌کاغذی نامشخص کلکسیون، شماره ۱۰ از جمعیت

جدول ۲- توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این تحقیق (R=A/T, Y=G/C)

Table 2. Sequences of ISSR primers used in present study (R=A/T, Y=G/C)

ردیف Row	کد مشخصه نشانگر Code of marker	توالی نشانگر (´۳ →´۵) Primer Sequence (5´→3´)
1	IS4	CACACACACACACACACAG
2	IS5	GACACACACACACACACC
3	IS6	CACACACACACACACACC
4	IS7	ACGACGACGACGACGG
5	IS8	ACGACGACGACGACGC
6	IS9	TCGTCGTCGTCGTCGG
7	IS11	ACACACACACACACACG
8	IS13	TAGAGAGAGAGAGAGAY
9	IS21	AGAGAGAGAGAGAGAGRC
10	IS23	CTCCTCCTCCTCRC
11	UBC849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA
12	UBC868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA



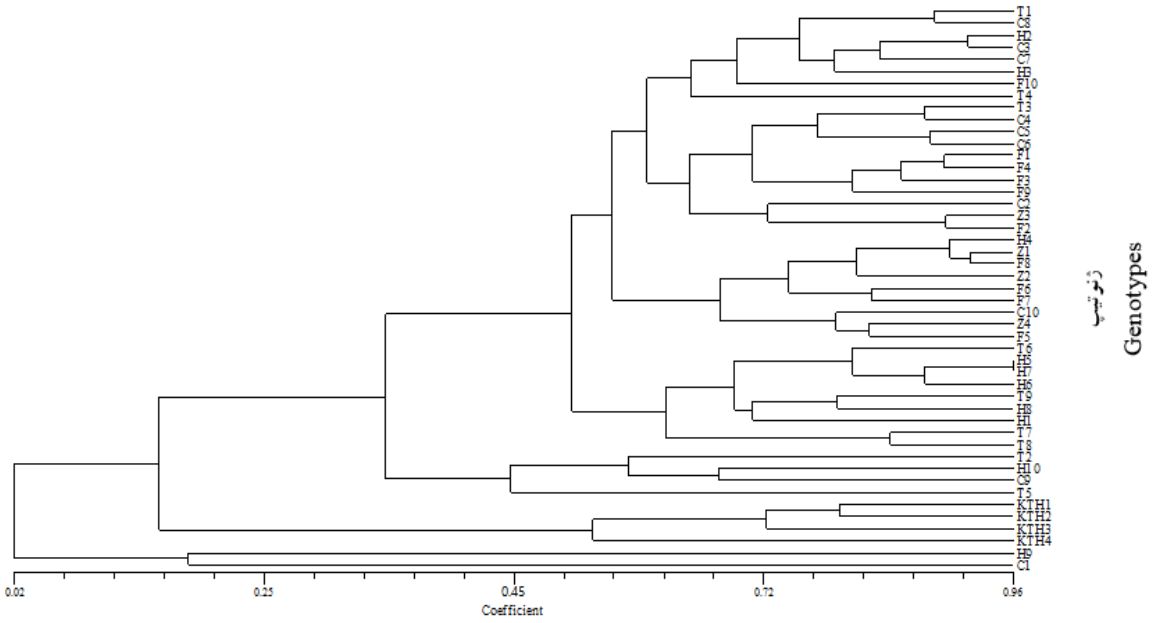
شکل ۱- محصول واکنش نشانگر ISSR11 روی ژل آگارز ۳ درصد. L: نشانگر اندازه 100 bp، C: شاهد منفی. کدها بیانگر افراد است

Figure 1. Product of ISSR11 marker reaction on 3% agarose gel, L: 100bp DNA ladder, C: negative control. The codes represent studied genotypes

جدول ۳- مشخصات چندشکلی نشانگرهای ISSR استفاده شده

Table 2. Polymorphic properties of used ISSR markers

ردیف Row	نام نشانگرها Markers name	کل نوارها Total bands	نوارهای چندشکل Polymorphic bands	درصدچندشکلی Percent of polymorphism	میزان‌اطلاعات چندشکلی PIC	شاخص نشانگر MI
1	IS4	5	5	100	0.14	0.7
2	IS5	5	5	100	0.32	1.6
3	IS6	5	5	100	0.16	0.8
4	IS7	9	9	100	0.23	2.07
5	IS8	9	9	100	0.25	2.25
6	IS9	8	8	100	0.26	2.08
7	IS11	9	9	100	0.26	2.34
8	IS13	8	8	100	0.22	1.76
9	IS21	5	5	100	0.2	1
10	IS23	6	6	100	0.26	1.56
11	UBC849	7	7	100	0.16	1.12
12	UBC868	7	7	100	0.32	2.24



شکل ۲- دندروگرام حاصل نشانگرهای ISSR بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش گروه‌بندی Clink

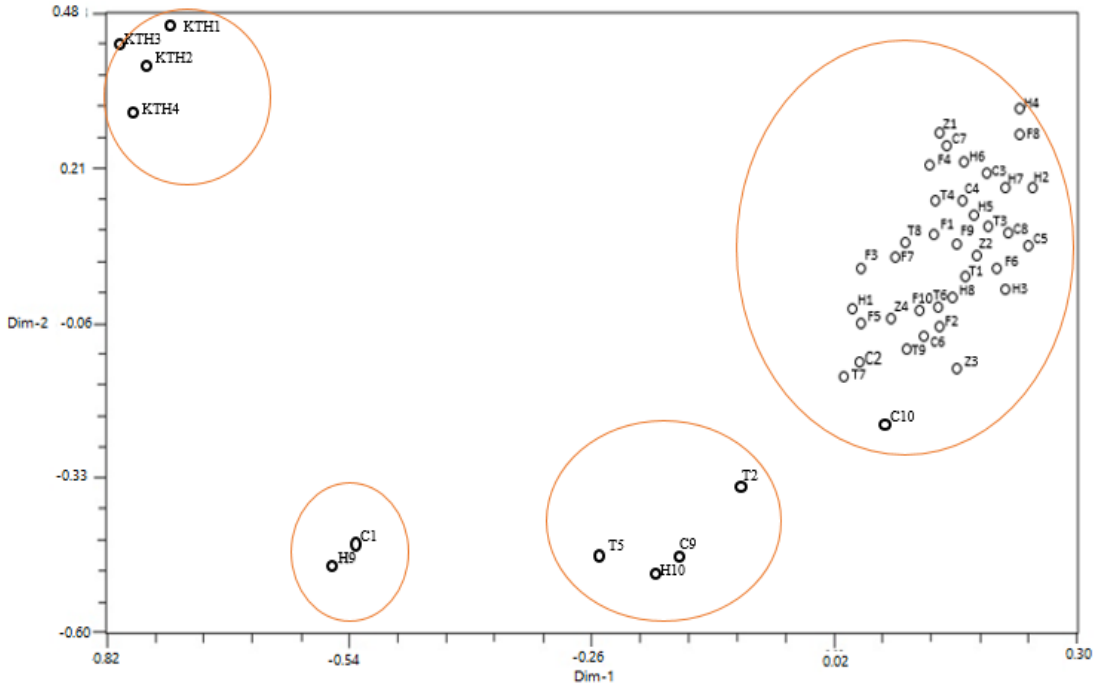
Figure 2. Dendrogram of the ISSR markers based on the Jaccard similarity coefficient and the Clink grouping method

تخم‌کاغذی همدان و شماره ۲ از جمعیت تخم‌کاغذی تهران بود. گروه پنجم شامل ۳۷ فرد دیگر جمعیت‌های تخم‌کاغذی بود که در این گروه بیشترین شباهت (۰/۹۶ درصد) بین دو فرد شماره ۵ و ۷ از جمعیت همدان بود. تجزیه به مختصات اصلی یک روش مقیاس‌گذاری یا مختصات‌یابی است که با ماتریس شباهت‌ها یا تفاوت‌های بین مجموعه‌ای از افراد شروع می‌شود و هدف از آن به وجود آوردن یک نمودار گرافیکی از داده‌ها با ابعاد کمتر است؛ بطوریکه فاصله بین نقاط در نمودار، نزدیک به تفاوت‌های اصلی می‌باشد (Rohlf, 1987). بر این اساس برای نشانگرهای ISSR، دو مؤلفه اصلی اول ۳۱/۴۱ درصد از واریانس کل را توجیه نمودند (جدول ٤) و نمودار دو بعدی (شکل ۳) بر اساس این دو مؤلفه ترسیم گردید که افراد را به پنج گروه تقسیم نمود. در گروه اول ۱ فرد، گروه دوم ۱ فرد، گروه سوم ٤ فرد، گروه چهارم ٤ فرد و در گروه پنجم ۳۷ فرد قرار گرفت که مشابه گروه-بندی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بود. با مقایسه فواصل فضایی و فواصل ژنتیکی مشاهده شد که هر دو روش افراد را به طور مشابهی از هم تفکیک کردند. در کل این نمودارها با دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای تطابق داشتند.

در این مطالعه نشانگرهای استفاده شده چندشکلی بالایی (۱۰۰ درصد چندشکلی) را در بین نمونه‌های جمعیت‌های کدو از خود نشان دادند، این وضعیت از مزایای نشانگرهای ISSR به‌کار رفته است. از دوازده نشانگر استفاده شده، شش نشانگر (IS5, IS8, IS9, IS11, IS23, UBC868) دارای PIC بین ۰/۲۵ تا ۰/۵ بودند که نشان می‌دهد اطلاعات سودمندی را دارا می‌باشند. شش نشانگر دیگر (IS4, IS6, IS7, IS13, IS21, UBC849) دارای PIC کمتر از ۰/۲۵ بودند که نشان می‌دهد اطلاعات سودمند اندکی دارند. بنابراین می‌توان گفت، برخی از نشانگرهای ISSR برای مطالعه تنوع ژنتیکی کدو سودمند واقع شدند. بوستون و همکاران بیان کردند آغازگرهایی که PIC بزرگتر از ۰/۵ داشته باشند دارای اطلاعات

سودمند زیادی هستند، آغازگرهایی که مقادیر PIC آنها بین ۰/۲۵ تا ۰/۵ باشند سودمند و آنهایی که کمتر از ۰/۲۵ باشند دارای اطلاعات سودمند اندکی هستند (Botstain *et al.*, 1980).

در پژوهش حاضر تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های کدو تخم-کاغذی و کدوتنبل با نشانگرهای ISSR، بررسی شد. این نشانگرها توانستند ٤٧ فرد ٥ جمعیت کدو تخم‌کاغذی و ١ جمعیت کدو تنبل را از هم تفکیک کنند. نتایج تجزیه خوشه‌ای به روش CLink و ضریب تشابه جاکارد نشان داد که بیشترین شباهت ژنتیکی (٩٦ درصد تشابه) بین دو فرد H5 و H7 از جمعیت کدو تخم‌کاغذی از استان همدان بود که علت را می‌توان در یکسان بودن نوع گونه (*C. pepo*) آنها دانست. قرار گرفتن افراد جمعیت کدوتنبل استان همدان در یک گروه جداگانه را احتمالاً می‌توان به این علت دانست که این افراد متعلق به گونه‌ای متفاوت (*C. maxima*) هستند. اغلب ژنوتیپ‌های مربوط به جمعیت‌های مختلف کدو تخم‌کاغذی به صورت پراکنده کنار هم در یک گروه قرار گرفتند که این امر نشان دهنده عدم مطابقت فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های جمعیت‌های مختلف کدو تخم‌کاغذی با منشأ جغرافیایی بود. با توجه به اینکه افراد جمعیت کدو تنبل در کنار یکدیگر و در یک گروه مجزا قرار گرفتند می‌توان نتیجه گرفت که نشانگرهای ISSR توانستند تا حدودی افراد را بر اساس نوع گونه از هم تفکیک کنند و نه منشأ جغرافیایی.



شکل ٣- بای پلات دوبعدی مربوط به تجزیه مختصات اصلی جمعیت‌های کدو

Figure 3. Two-dimensional plot related to the principal coordinates analysis of Cucurbita populations

جدول ٤- تجزیه به مختصات اصلی مربوط به نشانگر ISSR

Table 4. Principal coordinate analysis of the ISSR marker

	مؤلفه ١ Component 1	مؤلفه ٢ Component 2
واریانس نسبی Relative variance	20.19	11.21
واریانس تجمعی	20.19	31.41

Cumulative variance

در مطالعه‌ای که توسط Hatami و همکاران روی تنوع ژنتیکی سه جمعیت کدو حلوایی با استفاده از نشانگر ISSR انجام شد، درصد چندشکلی ۱۰۰ درصد به‌دست آمد (Hatami *et al.*, 2017). در پژوهشی توسط Barzegar که به بررسی تنوع ژنتیکی ۵۰ نمونه کدو از گونه‌های *C. pepo*، *C.maxima* و *C. moschata* با استفاده از نشانگر SSR انجام گرفت، ۱۰۰ درصد چندشکلی مشاهده شد (Barzegar, 2014). در مطالعه‌ی دیگری توسط Esmailnia و همکاران تنوع ژنتیکی ۳۰ گونه‌ی بومی از کدوی ایرانی از پنج جنس مختلف با استفاده از نشانگر ISSR بررسی شد، درصد چند شکلی ۹۲/۹۳ درصد به‌دست آمد (Esmailnia *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای که توسط Kameli و همکاران روی تنوع ژنتیکی سه گونه مرزه (*S. spicigera*, *S. rechingeri*, *S. khuzistanica*) با استفاده از نشانگر ISSR انجام شد، درصد چندشکلی ۱۰۰ درصد به‌دست آمد (Kameli *et al.*, 2013). در پژوهشی دیگر توسط Song و همکاران که به بررسی تنوع ژنتیکی مریم‌گلی (*Salvia miltiorrhiza*) با استفاده از نشانگر ISSR پرداختند، درصد چندشکلی ۱۰۰ درصد به‌دست آمد (Song *et al.*, 2010). میزان اطلاعات چندشکلی یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز به شمار می‌رود. مقادیر بالای آنها دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد. بنابراین نشانگرهایی با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌هایی با خویشاوندی نزدیک اهمیت بالایی دارد. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد که از میان نشانگرهای به‌کار رفته، نشانگرهای IS5 و UBC868 بیشترین PIC را دارا بودند. از میان نشانگرهای مورد استفاده نشانگرIS11، بیشترین شاخص نشانگر و بنابراین بیشترین پتانسیل تولید حداکثر نوار را دارا بود. میانگین میزان اطلاعات چندشکلی ۰/۲۳ برآورد گردید که نشان دهنده تنوع ژنتیکی قابل توجه در افراد جمعیت‌های کدو تخم‌کاغذی و کدوتنبل است.

تجزیه به مختصات اصلی ابزار دیگری برای نشان دادن نحوه پراکنش افراد است که به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای به کار می‌رود و نتایج حاصل از این آزمون با دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای تطابق داشت. اگرچه نشانگر مولکولی ISSR، به‌خوبی توانست تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها را مشخص کند اما بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای و با توجه به پراکنده بودن اغلب افراد جمعیت‌های مختلف کدو تخم‌کاغذی در کنار یکدیگر به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که نشانگر ISSR نتوانست به‌خوبی نمونه‌ها را بر حسب منشأ جغرافیایی از هم تفکیک کند. به عنوان مثال Ehteshamnia و همکاران، تنوع ژنتیکی ۹۶ ژنوتیپ از ۵ جمعیت طبیعی گردوی ایرانی در استان گلستان را با استفاده از ۱۱ مکان ژنی ریز ماهواره مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج به‌دست آمده، دسته‌بندی جمعیت‌ها با استفاده از داده‌های مولکولی با دسته‌بندی آنها بر اساس موقعیت جغرافیایی انطباق پیدا نکرد (Ehteshamnia *et al.*, 2009). بنابراین معنی‌دار نبودن همبستگی بین فواصل جغرافیایی و فواصل ژنتیکی آنها نشان دهنده ارتباط ژنتیکی بین جمعیت‌های جدا از هم از طریق جریان ژنی است (Alikhani *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای، Mohammadi و همکاران، تنوع ژنتیکی ۳۵ جمعیت جد

گندم (*Aegilops cylindrical*) را با استفاده ۱۷ نشانگر ISSR، بررسی کردند. بر اساس نتایج به‌دست آمده توسط آنها، روش‌های گروه‌بندی خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نتوانست جمعیت‌ها را به طور کامل از هم تفکیک کند و عدم ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی را نشان داد که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالای این جمعیت ها بود (Mohammadi *et al*., 2014). عدم مطابقت الگوی گروه‌بندی با منشأ جغرافیایی در تجزیه خوشه‌ای می‌تواند دو دلیل داشته باشد: دلیل اول کافی نبودن تعداد نشانگرهای استفاده شده و در نتیجه عدم پوشش تمامی ژنوتیپ‌ها، و دلیل دوم وجود یکسری مضاعف‌شدگی‌ها در ژرم‌پلاسم پس از ذخیره طولانی مدت و استفاده مجدد که باعث بروز یکسری اشتباهات و در نتیجه عدم تفکیک ژنوتیپ‌های یکسان از یکدیگر می‌شود (Chen *et al*., 2012).

از آنجا که اجرای هر برنامه اصلاحی وابسته به وجود تنوع می‌باشد؛ بنابراین انتخاب والدین مناسب در برنامه های تلاقی برای تولید هیبریدهایی با حداکثر هتروزیگوستی امری ضروری است. وقتی والدین از نظر ژنتیکی فاصله بیشتری از هم داشته باشند به تعداد کمتری تلاقی برای دستیابی به بهترین جمعیت نیاز است و هتروزیس قوی‌تری در نتاج ظاهر می‌شود. بنابراین، با اجرای تلاقی برای تولید ارقام مناسب با داشتن خصوصیات مورد نظر از ارقامی که دارای بیشترین فاصله ژنتیکی و صفات مورد نظر باشند، می‌توان استفاده نمود. در نهایت لازم به ذکر است، با توجه به ویژگی‌های دارویی گیاه کدوتخم‌کاغذی و کدوتنبل و تنوع ژنتیکی نسبتاً بالای آن، حفاظت در محل برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه‌ها توصیه می‌شود.

References

Alikhani, L., Rahmani, M.S., Shabanian, N. and Badakhshan, H. (2014). Genetic diversity assessment of *Quercus Infectoria* and *Q. libani* populations in North-Zagros forests based on ISSR and IRAP markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, **22**:79-90.

Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Thanksley, S.D. and Sorrells, M.E. (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage map. *Genome*, **36**: 181-186.

Shi, A., Kantartzi, S., Mmbaga, M. and Cen, P. (2010). Development of ISSR PCR markers for diversity study in dogwood. *Agriculture and Biology Journal of North America*, **1(3)**: 189-194.

Arab Tajandareh, E., Ismaili, A., Rezaei Nenejad, A.H. and Karami, F. (2016). Assessment of Genetic Diversity and Heritability of Physiological and Phenological Characteristics of some Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) Genotypes under Climatic Conditions of Kurdistan, Iran. *Plant Genetic Researches*, **3(2)**: 43-58 (In Persian).

Barzegar, R. (2014). Genetic diversity of samples of Iranian pumpkin species using molecular and biochemical morphological characteristics. Ph.D. Thesis, 142p (In Persian).

Botstain, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, **32**: 314-331.

Celka, Z., Szczecinska, M. and Sawicki, J. (2010). Genetic relationship between some of Malva species as determined with ISSR and ISJ markers. *Biodiversity Research and Conservation*, **19**: 23-32.

Chen, Y., Zhau, R., Lin, X., Wu, K., Qian, X. and Huang, Sh. (2008). ISSR analysis of genetic diversity in sacred lotus cultivars. *Aquatic Botany*, **89**: 311-316.

Chen, Z.W., Lu, R.J., Zou, L., Du, Z.Z., Gao, R.H., He, T. and Huang, J.H. (2012). Genetic diversity analysis of barley landraces and cultivars in the Shanghai region of China. *Genetic and Molecular Researches*, **11**: 644-650.

Denduangboripant, J., Sornsuda, S. and Suwanprasart, W. (2010). Determination of local tobacco cultivars using ISSR Molecular Marker. *Chiang Mai Journal of Science*, **37**: 293-303.

Dos Santos, L.F., De Oliveria, E.J., Dos Santos Silva, A., De Carvalho, F.M., Costa, J.L. and Padua, J.G. (2011). ISSR Markers as a tool for the Assessment of Genetic Diversity in *Passiflora Biochem*, *Biochem Genet*. **49**: 540- 554.

Ehteshamnia, A., Sharifani, M., Vahdati, K. and Erfani Moghaddam, V. (2009). Investigation of genetic diversity among some native populations of walnut (*Juglans regia* L.) in Golestan province by SSR Markers. *Journal of Plant Production*, **16** (4): 39-58. (In Persian)

Esmailnia, E., Arefard, M., Shabani, S., Karimi, M., Vafadar, F. and Dehestani, A. (2015). Genetic diversity and phylogenetic relationship of Iranian indigenous cucurbits investigated by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Biharean Biologist*, **9**: 47-54.

El-Shawaf, I.I.S., Bekhit, M.M.M., Hassan, A.M., El-saied, F.M. and Masoud, I.M. (2009). Use RAPD and ISSR markers for the identification of Egyptian Henbane (*Hyoscyamus muticus* L.) genotypes. *Genetics Cytology*, **38**: 17-28.

De Girorgio, D., Leo, L., Zacheo, G. and Lamasces, N. (2007). Evaluation of 52 almond (Prunus Amygdalus Batsch) cultivars from the Apulia region in Southern Italy. *Horticultural Science and Biotechnology*, **82**: 541-546.

Godwin, I.D., Aitken, E.A.B. and Smith, L.W. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, **18**: 1524- 1528.

Grisales, S.O., García, D.B. and Vallejo Cabrera, F.A.V. (2009). Effect of inbreeding on the quality traits of squash fruit. *Acta Agronómica*, **9**: 58-3.

Hatami, T., Kazemitabar, S.K., Kiani., GH. and Ismailzadehkenari, R. (2017). Genetic variation of squash pumpkins population using ISSR markers. *Medicinal Plants Biotechnology,* **1**: 23-29 (In Persian).

Kameli, M., Hesamzadeh Hejazi, S.M. and Ebadi, M. (2013). Assessment of genetic diversity on populations of three *satureja* species in Iran using ISSR markers. *Scholars Research Library*, **4**: 64-72.

Karimi, A., Hadian, J., Farzaneh, M. and Kadivi-Khub, A. (2014). Evaluation of genetic variability, rust resistance and marker detection in cultivated *Artemisia dracunculus* from Iran. *Gene*, **554(2)**: 224-232

Mohammadi, S., Ashraf Mehrabi, A., Arminian, A. and Fazeli, A. (2014). Genetic Diversity Structure of *Aegilops cylindrica* Accessions Revealed by Genomic ISSR Markers. *Plant Genetic Researches*, **1**:13-26 (In Persian).

Nee, M. (1990). The domestication of *cucurbita* (*Cucurbitaceae*). *Economic Botany*, **44**: 56-68

Powell, W., Morgante, M., Ander, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingy, S. and Rafalaski, V. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2**: 225-238.

Rohlf, F.J. (1987). An empirical comparison of three ordination tech niques in numerical taxonomy. *Systematic Biology*, **21**: 271-280.

Shazdehahmadi, M. and Kharrazi, M. (2016). Application of ISSR Molecular Markers for Genetic Diversity Study of Some Tobacco Genotypes. *Plant Genetic Researches*, **2**: 33-46 (In Persian).

Shinde, K., Shinde, V. and Kurane, J., Harsulkar, A. and Mahadik, K. (2010). Genetic diversity revealed ISSR molecular marker in different species of Ocimum. *Planta Medical*, **76**: 2-5.

Song, Z., Li, X., Wang, H. and Wang, J. (2010). Genetic diversity and population structure of *salvia miltiorrhiza* Bge. In china revealed by ISSR and SRAP. *Genetica*, **138**: 241-49.

Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G.S. (2009). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, **120**: 411-417.

Zargari, A. (2005). *Medical Plants*. Tehran University Press, Tehran, IR (In Persiaon).

Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**: 176-183.

Evaluation of Genetic Diversity of Styrian Pumpkin (*Cucurbita pepo* var. styriaca) Populations, Using ISSR Molecular Markers

Parya Amiri[1], Ahmad ismaili[2,*] and Javad Hadian[3]

1- M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3- Associate Professor, Department of Horticulture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

(Received: April 11, 2017 – Accepted: July 30, 2017)

Abstract

Evaluation of genetic diversity in medicinal plants is one of the most important evolutionary and breeding goals. Recent developments in polymerase chain reaction brings the possibility of evaluation the individuals of a population in more sites of genome, and among different DNA molecular markers, the ISSR marker was successfully used in study of the genetic diversity of different plants. The genetic diversity of 43 individuals from five populations of Styrian Pumpkin (Cucurbita pepo var. styriaca) and 4 individuals from one population of *C. maxima* which cultivated in Shahid Beheshti University collection (Tehran, Iran) was investigated using 12 ISSR markers. Totally, 83 scorable bands were produced by ISSR markers and the mean for the produced band for each marker was 6.91 and 100% of scorable bands were polymorphic. Dendrogram was illustrated based on Jaccard coefficient similarity matric and algorithm of Complete Linkage. Based on cluster analysis, individuals of populations divided into five main groups. The results of the grouping through principal coordinate analysis and cluster analysis showed that groupings by the two mentioned methods were consonant with each other and have made a similarity grouping. The cophenetic coefficient was calculated as 0.97. Totally, the results of present study showed that the some of used ISSR markers could be useful for future study of genetic variation in *Cucurbita pepo*.

Keywords: *Cucurbita pepo* L., Cluster analysis, Principal coordinate analysis, Polymorphic information

* **Corresponding Author, E-mail: ismaili.a@lu.ac.ir**