

ارزیابی فنوتیپی و ردیابی ژن *SIERF1* مرتبط با شیرینی در

خانواده‌های نسل F5 طالبی

Phenotypic evaluation and genotyping of *SIERF1* related to sugar content in F5 families of melon

داریوش تفریحی^۱، محمود لطفی^۲، حسین رامشینی^{۳*}، محمد مهدی عرب^۲، محمد پارسا رضانی نژاد^۴

۱- دانشجوی دکتری علوم و مهندسی باغبانی گرایش اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهان، گروه علوم باغبانی،

دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران

۲- به‌ترتیب دانشیار، محقق پسادکتر، گروه علوم باغبانی، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران

۳- دانشیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران

۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته علوم و مهندسی باغبانی گرایش سبزی‌ها، دانشکده فناوری کشاورزی

ابوریحان، دانشگاه تهران

Tafrihi D¹, Lotfi M², Ramshini H^{3*}, Arab MM², Ramazani Nejad MP⁴

1- PhD Student of Horticultural Science- Plan Breeding and Biotechnology, Department of Horticultural Science, College of Abouraihan, University of Tehran

2- Associate Professor, Post-doctoral Researcher, Department of Horticultural Science, College of Abouraihan, University of Tehran

3- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Abouraihan, University of Tehran

4- MSc Graduate Student of Horticultural Science- Vegetables, College of Abouraihan, University of Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ramshini_h@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۳۰)

چکیده

یکی از اهداف مهم در برنامه‌های اصلاحی طالبی افزایش قند میوه است. با هدف تولید ارقام هیبرید دارای صفات مطلوب و شیرینی بالا، مهم‌ترین ارقام طالبی ایرانی سمسوری و ساوه با رقم خارجی گالیا تلاقی داده شده و خانواده‌های نسل F5 با روش شجره‌ای به‌دست آمدند. در این مطالعه ۳۲ خانواده نسل F5 به‌همراه والدین در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در شرایط مزرعه کشت شدند و صفات عملکرد میوه، تعداد میوه در بوته، رسیدگی، مشخصات ظاهری و شیرینی میوه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد از نظر همه صفات به‌جز تعداد میوه در بوته بین خانواده‌ها تفاوت بسیار معنی‌دار ($p \leq 0.01$) وجود دارد. نشانگر SNP مرتبط با شیرینی میوه (*SIERF1*) در ۴۱ بوته که به‌صورت تصادفی از این خانواده‌ها انتخاب شده بودند تعیین ژنوتیپ شد. توالی قطعه تکثیر شده از بخشی از ژن یاد شده با توالی یابی تایید شد و نشان داد والدین در SNP مرتبط با شیرینی میوه تفاوت دارند. با توجه به نتایج به‌دست آمده ژنوتیپ نمونه‌های مورد بررسی A1A1 و یا A2A2 بودند و ژنوتیپ هتروزیگوت مشاهده نشد. نتایج نشان داد گیاهانی که در نسل F5 دارای آلل مطلوب (A1A1) هستند نسبت به آن‌ها که آلل نامطلوب دارند (A2A2) تفاوت بسیار معنی‌داری (به‌ترتیب با شیرینی ۱۲/۷ و ۱۰/۳ واحد بریکس) در قند میوه نشان می‌دهند ($p \leq 0.01$). نتایج مطالعه حاضر کارآیی نشانگر SNP مرتبط با شیرینی (*SIERF1*) در گزینش لاین‌های مطلوب را تأیید نمود. در نتیجه این نشانگر می‌تواند در تسریع برنامه‌های به‌نژادی آینده نقش مهمی ایفا نماید. ۱۵ لاین برتر دارای ژنوتیپ مطلوب (A1A1) شناسایی شده می‌توانند در برنامه‌های تولید ارقام هیبرید مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

روش HRM

ژن *SIERF1*

طالبی سمسوری و ساوه

گزینش به کمک نشانگر

میزان قند از صفات مهم در تعیین کیفیت میوه در طالبی می‌باشد. در این گونه ارقام و توده‌هایی دارای میوه‌های غیر شیرین غیر معطر از گروه flexosus تا طالبی‌های شیرین و معطر گروه cantalupensis وجود دارند (Fernández-Trujillo et al. 2011). تفاوت در محتوای قند در ارقام به‌طور عمده تفاوت در تجمع ساکارز را نشان می‌دهد (Stepansky et al. 1999) که تفاوت اصلی بین ارقام شیرین و غیر شیرین را توضیح می‌دهد و چندین مکان صفات کمی (QTL) برای تجمع قند گزارش شده است (Diaz et al. 2011). تجمع ساکارز توسط یک ژن اصلی کنترل می‌شود (Burger et al. 2002) که ارقام شیرین و غیرشیرین را تفکیک می‌نماید. مسیر متابولیکی متابولیسم قند در میوه طالبی در چندین مطالعه بررسی شده است (Dai et al. 2011; Leida et al. 2015). مانند سایر خانواده کدوئیان، طالبی نیز دارای مکانیسم بارگیری آوند آبکش سیمپلاستی می‌باشد که الیگوساکاریدهای خانواده رافینوز (RFOs)، استاکیوز و همچنین ساکارز را از برگ‌های منبع به بافت‌های مقصد مانند میوه‌های در حال رشد ارسال می‌کند (Zhang et al. 2012). انباشت ساکارز به‌طور تکاملی توسط متابولیسم کربوهیدرات‌های موجود در مخزن میوه کنترل می‌شود. انباشت ساکارز زمانی آغاز می‌شود که میوه به پایان مرحله رشدی خود می‌رسد. در این مرحله در میوه تغییر متابولیک آغاز می‌شود (Burger and Schaffer 2007). در این مرحله بیان گروه‌های متمایز از ژن‌ها انجام می‌شود (Dai et al. 2011).

در مطالعات قبلی تنوع چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) زیادی مرتبط با قند میوه در طالبی شناسایی شده است (Argyris et al. 2015; Harel-Beja et al. 2010; Leida et al. 2017). در یک تحقیق مجموعه‌ای از ۱۷۵ توده طالبی از ۵۰ نقطه مختلف دنیا برای بررسی رسیدگی میوه و تجمع قند مورد استفاده قرار گرفت، تنوع چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNPs) در ۵۳ ژن کاندیدای انتخاب شده درگیر در تجمع قند و فرآیندهای رسیدن میوه و همچنین ارتباط آن‌ها با تنوع فنوتیپی صفات مرتبط مورد مطالعه قرار گرفت و چندین نشانگر SNP مرتبط با تجمع قند در طالبی شناسایی شده است. یکی از نشانگرهای شناسایی شده که ارتباط بسیار قوی با شیرینی میوه نشان داده است نشانگر *SIERF1* SNP

طالبی (*Cucumis melo* L. cucurbitaceae; $2n=2x=24$) گونه‌ای است که در سراسر جهان کشت می‌شود و طیف گسترده‌ای از تغییرات فنوتیپی را به‌ویژه در صفات میوه نشان می‌دهد. بنابراین، تنوع زیادی در بین ارقام از نظر وزن میوه (از چند صد گرم تا چند کیلوگرم)، شکل (از گرد تا بسیار کشیده) و رنگ پوست مشاهده می‌شود (Diaz et al. 2015). تولید جهانی طالبی ۲۸ میلیون میلیون تن در سال ۲۰۲۰ بوده است (www.fao.org). تولیدکنندگان اصلی در مناطق معتدل قرار دارند و بعد از چین که حدود ۵۰٪ از کل تولید جهانی را دارا می‌باشد، ترکیه، ایران و ایالات متحده آمریکا قرار دارند. از نظر صفات گوناگون، از جمله شاخ و برگ گیاه، جنسیت گل‌ها، عملکرد و ویژگی‌های میوه، تنوع ژنتیکی و فنوتیپی زیادی وجود دارد. از نظر ارگانولپتیک، تنوع زیادی نیز در میزان قند، اسیدیته و مشخصات عطر و طعم میوه یافت می‌شود (Fernández-Trujillo et al. 2011). بخشی از این تنوع فنوتیپی توسط نقشه‌های ژنتیکی صفات کمی (QTL) مکان‌یابی شده است (Díaz et al. 2014; Eduardo et al. 2018; Harel-Beja et al. 2010). میوه‌های طالبی از نظر شکل، اندازه، رنگ و طرح پوست، استحکام، رنگ و طعم گوشت بسیار متغیر هستند. میوه ژنوتیپ‌های وحشی و زراعی سطوح مختلفی از قندهای محلول، اسیدهای آلی، رنگدانه‌ها و مواد معطر فرار را دارا هستند (Burger et al. 2002; Harel-Beja et al. 2010; Périn et al. 2002). کیفیت میوه طالبی از طریق شبکه‌های پیچیده‌ای از مسیرهای متابولیکی که در زمان رسیدن میوه فعال هستند، مورد بررسی قرار می‌گیرد (Harel-Beja et al. 2010).

برنامه‌های به‌نژادی ژنتیکی طالبی به‌طور مستمر در تلاش برای بهبود صفات کیفی میوه است که تأثیر مستقیمی بر ارزش غذایی، طعم و ظاهر دارد. این صفات را می‌توان به اجزای کامل میوه، اجزای داخلی (مزوکارپ) و خارجی (اکزوکارپ) تقسیم کرد. ویژگی‌های مزوکارپ شامل رنگ گوشت، بافت، عطر، اسیدیته و محتویات قند است، در حالی که برخی از ویژگی‌های اکزوکارپ شامل شکل، اندازه، رنگ پوست، شیار (شکاف) و توری (شبکه) است. از تنوع ژنتیکی طالبی برای اصلاح ژنتیکی این صفات در تولید ارقام جدید می‌توان استفاده بهینه نمود (Pitrat 2013).

۱۹۸۰ در سراسر اروپای غربی گسترش یافت، تا جایی که به‌عنوان یک محصول منحصر به فرد جدید در بازار طالبی محبوب شد. رقم گالیا شکل گرد، شبکه پوست میوه ظریف و یکنواخت و گوشت سبز می‌باشد (Benedetti et al. 2008; Cohen et al. 2005). رقم گالیا به جهت مزه و شیرینی بسیار خوب می‌تواند به‌عنوان یک والد مناسب در برنامه‌های به‌نژادی جهت بهبود کیفیت میوه مورد استفاده قرار گیرد (Gal et al. 2008). در این پژوهش به‌منظور انتقال صفات مطلوب رقم گالیا به توده‌های طالبی ساوه و سمسوری تلاقی بین آن‌ها انجام شد و در سال‌های گذشته یک جمعیت اصلاحی با استفاده از روش شجره‌ای تا نسل پنجم اصلاحی توسعه داده شده است (Ramezani et al. 2020). هدف از پژوهش حاضر انتخاب لاین‌های برتر نسل پنجم حاصل از دو تلاقی ساوه در گالیا و سمسوری در گالیا از نظر دارا بودن ژن درگیر در متابولیسم قند میوه به کمک آنالیز HRM می‌باشد. همچنین بهترین خانواده‌های نسل F5 شناسایی شدند و از آن‌ها برای تولید لینه‌های خالص برتر استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در بهار سال ۱۳۹۶ برای بهبود ویژگی‌های توده‌های بومی سمسوری و ساوه این دو توده بومی با رقم تجاری گالیا تلاقی داده شدند که توده‌های ساوه و سمسوری به‌عنوان والد پدری و رقم گالیا به‌عنوان والد مادری در نظر گرفته شدند. گیاهان حاصل از این تلاقی خود گشن شدند و ۲۵۰۰ گیاه نسل F2 به‌دست آمدند از بین گیاهان نسل F2 ۸۵ بوته انتخاب شدند (Ramezani et al. 2020) و با استفاده از روش شجره‌ای و دوبار کشت در سال تا نسل F5 توسعه داده شدند. تعداد خانواده‌های منتخب در نسل پنجم ۳۲ خانواده بود.

خانواده‌های نسل پنجم حاصل از تلاقی ساوه در گالیا و سمسوری در گالیا به‌همراه ارقام والدی (سمسوری، ساوه و گالیا) در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار کشت و مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمایش در سال ۱۳۹۹ در مزرعه زراعی دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان دانشگاه تهران واقع در شهر پاکدشت با مختصات ۳۵ درجه شمالی و ۵۱ درجه شرقی و

است. در این نقطه توالی GC مربوط به آل افزایشنده قند میوه و توالی AT مربوط به آل کاهشنده قند میوه است (Leida et al. 2015). بعد از تأیید کارایی این نشانگر SNP می‌توان از آن در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر استفاده کرد.

نشانگرهای DNA پتانسیل بسیار زیادی برای بهبود کارایی و دقت اصلاح گیاهان از طریق گزینش به کمک نشانگر (MAS) دارند. چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) به‌دلیل فرآیندهای ساده‌تر و سریع‌تر در ردیابی و ژنوتیپ‌سنجی نمونه سطوح بالاتری از توان عملیاتی را در مقایسه با سایر نشانگرها ارائه می‌دهند. SNPها فراوان‌ترین تنوع در توالی ژنومی هستند و بنابراین پتانسیل ارائه بالاترین وضوح نقشه را دارند (Jones et al. 2007). تجزیه و تحلیل ذوب با وضوح بالا (HRM) یک روش پس از PCR^۱ است که برای تشخیص جهش و ژنوتیپ‌سنجی SNP در جمعیت‌های اصلاحی بسیار حساس، ساده، سریع و مقرون به صرفه است. تعداد زیادی از مطالعات مکان‌یابی کمی صفات (QTL) برای گونه‌های مختلف محصولات زراعی، ارتباط نشانگر با صفات مهم را مشخص کرده است (Collard and Mackill 2008). کاربرد روش HRM با تعیین ژنوتیپ گونه‌های مختلف گیاهی، مانند *Medicago sativa* L (Han et al. 2012)، *Zea mays* L (Yu et al. 2011)، *Oryza sativa* L (Li et al. 2011) و *Lupinus albus* L (Croxford et al. 2008) تأیید شده است. HRM جایگزینی برای تکنیک‌های وقت‌گیر و پر زحمت مبتنی بر ژل است.

طالبی سمسوری و ساوه از ارقام بومی ایران هستند و به‌طور خاص در ایران کشت می‌شوند و بیشترین سطح کشت را در کشور دارا می‌باشند. این ارقام به‌علت دارا بودن ویژگی‌های مطلوب دارای جایگاه ویژه برای مصرف کننده هستند. این ارقام دارای طعم مناسب، رنگ گوشت سبز و شبکه و خط مناسب هستند که بازار پسندی این ارقام را موجب شده است. با وجود تمام ویژگی‌های مطلوب، میزان قند میوه در این ارقام کم تا متوسط می‌باشد. هیبرید گالیا یک رقم طالبی است که در سال ۱۹۷۴ معرفی و در بین پرورش دهندگان طالبی محبوب شد و جایگزین انواع دیگری از بازار خربزه در بازار شد و در دهه

¹ Polymerase Chain Reaction

(Leida et al. 2015)، آغازگر مناسب با کمک نرم افزار Primer3 طراحی شد (جدول ۱). با کمک آنالیز HRM تفاوت میان بوته‌های مورد آزمایش تعیین شد. برای انجام روش HRM از دستگاه Real-time PCR (Roche, Germany) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای این منظور در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش دارای ۴ میکرولیتر از مستر میکس HiFi HRM (شرکت فارابین طب)، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۱۳ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر DNA الگو (با غلظت ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر) بود. چرخه دمایی به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه جهت فعال سازی آنزیم تک پلیمرز بود (آنزیم از نوع Hot Start بود). سپس ۴۰ بار چرخه زیر تکرار شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه. در نهایت واکنش HRM طبق پیش فرض دستگاه، بدون خارج سازی نمونه‌ها انجام شد. سپس محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بدون خارج سازی از دستگاه با استفاده از مقایسه منحنی‌های ذوب هر نمونه بررسی شدند. برای تأیید وجود چندشکلی در نشانگر SNP در پایان با توجه به منحنی‌ها، چند قطعه تکثیر شده حاصل برای توالی‌یابی انتخاب شد. به عبارتی نمونه‌هایی که دارای نمودار کاملاً یکسان بودن انتخاب شدند و دو نمونه که نمودار کاملاً یکسانی داشتند مخلوط شدند و برای توالی‌یابی ارسال شدند. به این ترتیب از هر دو الگو نمونه‌های جداگانه برای توالی‌یابی ارسال شد. توالی‌یابی توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد، توالی‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار BioEdit بررسی شده و SNP موجود که تفاوت در آلل مطلوب و نامطلوب را نشان می‌داد شناسایی شد. همانگونه که پیش‌بینی می‌شد تفاوت بین قطعه تکثیر شده در رقم گالیا و ارقام ساوه و سمسوری تنها در یک جفت نوکلئوتید بود. برای تعیین ارتباط آماری بین ژنوتیپ نشانگر SNP شناسایی شده در ژن *SIERF1* و میزان شیرینی میوه از تک بوته‌هایی که استخراج DNA انجام شد آخر فصل میوه برداشت شد و میزان شیرینی میوه با دستگاه رفراکتومتر اندازه‌گیری شد. در مجموع با توجه به اینکه برخی از نمونه‌های DNA کیفیت مناسبی نداشتند DNA ژنومی ۴۴ گیاه شامل ارقام والدی گالیا، سمسوری، ساوه و ۴۱ لاین نسل

ارتفاع ۱۰۱۳ از سطح دریا صورت گرفت. ابتدا بذر گیاهان در گلخانه تحقیقاتی در سینی حاوی کوکوپیت و پرلیت کشت و بعد از ۱۴ روز نشاها در مرحله سه برگگی به مزرعه انتقال یافتند. جمعیت مورد مطالعه در مراحل مختلف رویشی نسبت به صفات کنترل کننده کیفیت میوه مورد ارزیابی فنوتیپی قرار گرفت. از آنجا که هدف از این پژوهش، به‌نژادی صفت شیرینی میوه در تلاقی‌های مورد نظر و دستیابی به ژنوتیپ‌هایی بود که ظاهری شبیه ارقام ایرانی داشته باشند و با این وجود شیرینی مطلوبی را دارا باشند، بنابراین باید در نسل پنجم گیاهانی با ویژگی‌های مطلوب مانند پوست مشبک و خط دار، طول، عرض و وزن میوه مناسب و همچنین گوشت سبز رنگ و آبدار گزینش شوند. همزمان با رسیدن میوه برداشت صورت گرفت و تعداد و وزن میوه یادداشت شد، بررسی صفات طول و عرض میوه، قطر گوشت و خط دار بودن پوست میوه به صورت مشاهده‌ای انجام شد. از مهم‌ترین اهداف این آزمایش بررسی شیرینی و مواد جامد محلول میوه بود که یک صفت تعیین کننده در کیفیت میوه می‌باشد، برای اندازه‌گیری مواد جامد محلول میوه از دستگاه رفراکتومتر استفاده شد.

جهت تأیید حضور و بررسی وجود چندشکلی در ژن *SIERF1* مرتبط با شیرینی در گیاهان، در مرحله ۲-۳ برگگی نمونه‌برداری از برگ گیاهان والدی و گیاهان نسل پنجم (حدود ۵۰ گیاه) انجام شد و استخراج DNA با روش CTAB تغییر یافته (Murray and cetyltrimethylammonium bromide) (Thompson 1980) انجام گرفت. انتخاب گیاهان به صورت تصادفی از خانواده‌های نسل F5 انجام شد. البته از همه خانواده‌ها دست کم یک نماینده برای تعیین ژنوتیپ ژن *SIERF1* وجود داشت. پس از تعیین کیفیت و کمیت DNA به روش اسپکتوفتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ و همچنین الکتروفورز DNA استخراج شده تعداد ۴۱ نمونه از گیاهان نسل F5 به همراه ارقام والدی برای ادامه آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند (بقیه نمونه‌ها به دلیل کیفیت پایین DNA و عدم تکثیر مناسب حذف شدند). ارقام شاهد گالیا، ساوه و سمسوری نیز به‌عنوان شاهد در آزمایش گنجانده شدند. برای SNP از پیش شناسایی شده مرتبط با قند میوه در ژن کاندید (*SIERF1*)

شیرینی بالا و همچنین ویژگی‌های مطلوب ارقام بومی از لحاظ اقتصادی به صرفه بوده و همچنین موجب حفظ ژرم پلاسم طالبی بومی خواهد شد.

برنامه‌های اصلاح ژنتیکی در طالبی به طور مستمر در تلاش برای بهبود صفات کیفی میوه است که تأثیر مستقیمی بر ارزش غذایی، طعم و ظاهر دارد. این صفات را می‌توان به اجزای کامل میوه شامل اجزای داخلی (مزوکارپ) و خارجی (اگزوکارپ) تقسیم کرد. ویژگی‌های مزوکارپ شامل رنگ گوشت، بافت، عطر، اسیدیته و محتویات قند است، در حالی که برخی از ویژگی‌های اگزوکارپ شامل شکل، اندازه، رنگ پوست، شیار (شکاف) و توری (شبه‌که) است (Oren et al. 2020). با توجه به اهمیت این صفات برای کشاورزان و مصرف کنندگان، صفات قطر گوشت، قطر حفره داخلی، طول و عرض میوه‌های برداشت شده، مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). در این جدول آماره‌های توصیفی برای صفات اندازه‌گیری شده گزارش شده است. بیشترین ضریب تنوع برای صفت عملکرد در بوته (۴۵/۸ درصد) و کمترین ضریب تنوع برای عرض میوه (۹/۱۷) دیده شد.

F5 حاصل از تلاقی آن‌ها برای انجام واکنش PCR و سپس آنالیز HRM مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به ژنوتیپ به دست آمده با آزمایش PCR و HRM ارتباط بین داده‌های ژنوتیپی با داده‌های فنوتیپی (میزان قند میوه) بررسی شد. این بررسی با نرم‌افزار SPSS و آزمون مقایسه میانگین دو نمونه مستقل (آزمون t) انجام گرفت.

نتایج و بحث

صفات مرتبط با کیفیت میوه در نسل F5

هیبرید تجاری گالیا دارای کیفیت میوه مناسب از جمله میزان شیرینی بالا است ولی از نظر ویژگی‌های ظاهری میوه و رنگ گوشت و مطبوعیت مورد پسند سلیقه مصرف کننده در ایران نمی‌باشد. همچنین این رقم وارداتی بوده و سالانه مقدار قابل توجهی ارز به دلیل واردات بذر این رقم و سایر ارقام وارداتی از کشور خارج و همچنین موجب وابستگی در تهیه بذر طالبی مورد نیاز کشاورزان می‌شود. در نتیجه به‌نژادی و تولید ارقام داخلی با

جدول ۱- توالی آغازگر طراحی شده برای تکثیر بخشی از ژن *SIERF1* که ارتباط معنی‌دار آن با شیرینی میوه طالبی پیش از این گزارش شده است (Leida et al. 2015)

Candidate gene	Primer name	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)
<i>SIERF1</i>	HRM-SIE1	TCGAAACGGCTGAAGATGCT CCATACAGCAACGGTGGAGT	61

جدول ۲- آماره‌های توصیفی مربوط به میانگین صفات اندازه‌گیری شده در ۳۲ خانواده نسل F5 حاصل از تلاقی رقم ساوه در گالیا و رقم سمسوری در گالیا به همراه سه رقم والدی ارزیابی شده در طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار برای صفات مختلف اندازه‌گیری شده در طالبی. مخفف نام متغیرها داخل پرانتز نوشته شده است.

statistics	Yield per plant(Y)	Fruit number per plant(N)	Days to harvest(H)	Fruit weight(W)	Fruit length(L)	Fruit width(Wi)	Cavity diameter(C)	Flesh thickness(T)	Flesh to cavity(FC)	TSS(S)
Unit	g	No.	days	g	cm	cm	cm	cm	-	%brix
Min.	1208.92	1.23	21.77	631.74	9.73	11.36	4.86	2.65	0.45	7.90
Max.	6827.19	3.17	39.37	2004.77	17.23	16.36	7.75	4.82	1.01	12.32
Mean	2393.03	2.12	29.88	1100.06	12.99	13.26	6.39	3.69	0.60	10.23
SD ^a	1096.16	0.45	3.62	317.80	1.57	1.22	0.68	0.52	0.11	0.98
CV ^b	45.81	21.33	12.13	28.89	12.05	9.17	10.65	14.07	18.51	9.58

^aSD is an abbreviation of standard deviation measured from the means of 35 genotypes evaluated in 3 replications.

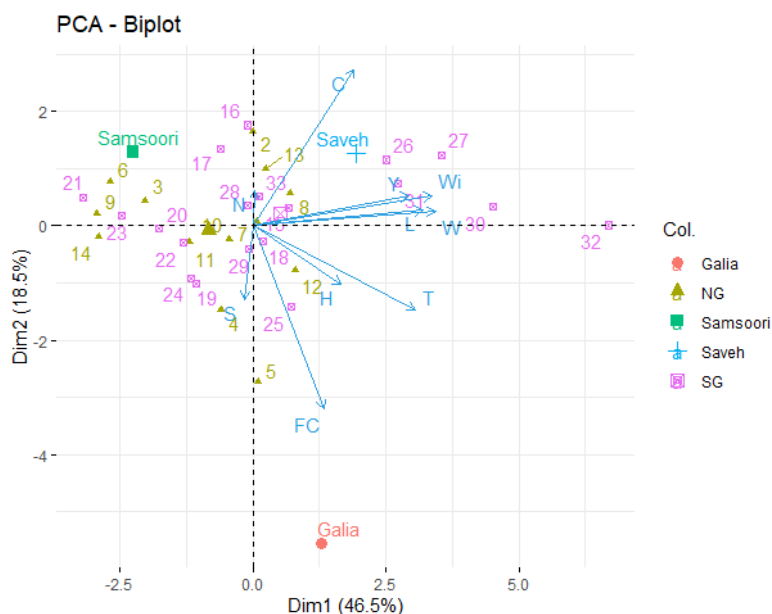
^bCV is an abbreviation of coefficient of variation, which was estimated as the ratio of the standard deviation to the mean of all genotypes.

بالا، صفات ظاهری ارقام ایرانی را نیز دارا باشند. با توجه به نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ برای نشانگر *SIERFI* و صفات مربوط به میوه بهترین لاین‌ها برای ادامه برنامه به‌نژادی انتخاب شدند. برای شناسایی الگوهای تنوع در بین ژنوتیپ‌ها از نظر صفات اندازه‌گیری شده تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار R انجام شد. این تجزیه روشی است برای کاهش دادن ابعاد داده‌ها تا بتوان در یک نمودار دو بعدی وضعیت کلی ژنوتیپ‌ها را نسبت به هم مقایسه کرد. بردارهای ویژه در این تجزیه در نمودار دوبعدی نشان داده شده است. کسینوس زاویه بین بردارها همبستگی بین آن‌ها را نشان می‌دهد (شکل ۱).

برای صفاتی که ضرایب تنوع بالاتری دارند می‌توان انتظار داشت گیاهان برتر از نظر ژنتیکی انتخاب شوند. برای اطلاع از تفاوت بین خانواده‌های نسل F5 با یکدیگر و مقایسه آن‌ها با والدین تجزیه واریانس انجام شد. به‌جز صفت تعداد میوه در بوته، از نظر بقیه صفات اندازه‌گیری شده تفاوت بسیار معنی‌دار بین خانواده‌های نسل F5 دیده شد. جدول ۳ میانگین مربعات تجزیه واریانس را برای صفات اندازه‌گیری شده در ۳۲ خانواده و ۳ رقم والدی نشان می‌دهد. هدف از این پژوهش اصلاح رقمی است که مشخصات مطلوب رقم گالیا و توده‌های ایرانی ساوه و سمسوری را به‌صورت نوترکیب و همزمان داشته باشد، بنابراین از نسل F2 تا نسل F5 گیاهانی گزینش شدند که علاوه بر دارا بودن شیرینی

جدول ۳- میانگین مربعات تجزیه واریانس ۳۲ خانواده نسل F5 حاصل از تلاقی رقم ساوه در گالیا و رقم سمسوری در گالیا به‌همراه سه رقم والدی ارزیابی شده در طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار برای صفات مختلف اندازه‌گیری شده در طالی.

Source of variation	df	Yield per plant(Y)	Fruit number per plant(N)	Days to harvest(H)	Fruit weight(W)	Fruit length(L)	Fruit width(Wi)	Cavity diameter(C)	Flesh thickness(T)	Flesh to cavity(FC)	TSS(S)
Replication	2	2618236*	1.44	17.90	5403.8	1.54	0.86	0.42	0.10	0.01	0.53
Treatment	34	2298670**	0.55	35.25**	257006.2**	6.32**	3.83**	1.25**	0.69**	0.032**	2.72**
Error	68	786610	0.56	10.42	44718.5	1.03	0.93	0.29	0.27	0.012	1.12
C.V.		37.6	35.3	10.80	19.17	7.78	7.24	8.40	13.96	18.9	10.3



شکل ۱- نمودار دو بعدی (بای پلات) دو مؤلفه اول تجزیه به مؤلفه‌های اصلی. کسینوس زاویه بین بردارها همبستگی بین آن‌ها را نشان می‌دهد. هر چه دو بردار با یکدیگر همسوتر باشند همبستگی بین این دو صفت بیشتر است. ارقام والدی و خانواده‌های حاصل از تلاقی سمسوری در گالیا (NG) و ساوه در گالیا (SG) با رنگ‌های متفاوت از یکدیگر تفکیک شده‌اند. N: تعداد میوه، Y: عملکرد، C: قطر حفره داخلی، S: میزان قند، Wi: عرض میوه، L: طول میوه، W: وزن میوه، T: ضخامت گوشت، H: روز تا رسیدگی و FC: نسبت ضخامت گوشت به قطر حفره داخلی.

می‌توان انتظار داشت لاین‌هایی با میوه‌های درشت تولید کنند. همچنین از خانواده‌های ۵، ۲۵ و ۴ می‌توان لاین‌هایی با ضخامت گوشت بالا برای تولید هیبرید استفاده کرد. آنچه از اهمیت بالایی برخوردار است این است که تأثیر شیرینی بر مؤلفه اول و دوم زیاد نیست بنابراین با کمک این نمودار نمی‌توان بهترین خانواده‌ها را انتخاب کرد. بررسی داده‌ها نشان داد که خانواده‌های ۲۹، ۲۶، ۲۲ و ۱۴ به ترتیب با شیرینی میوه ۱۲/۳، ۱۱/۹، ۱۱/۶ و ۱۱/۳ بهترین خانواده‌ها برای گزینش لاین‌هایی با شیرینی میوه بالا هستند.

تعیین ژنوتیپ گیاهان نسل پنجم با روش HRM

ژن *SIERF1*

با توجه به آغازگر طراحی شده برای آنالیز HRM گیاهان طالبی نسل F5 حاصل از تلاقی سمسوری × گالیا و ساوه در گالیا نمودار حاصل نشان داد (شکل ۲) که تنها دو ژنوتیپ A1A1 و A2A2 مشاهده شد و ژنوتیپ هتروزیگوت مشاهده نشد. همچنین با توجه به نتایج حاصل از آنالیز ژن *SIERF1* نشان داد که میانگین شیرینی برای گیاهان A1A1 و A2A2 به ترتیب برابر ۱۲/۷ و ۱۰/۳ به دست آمد با توجه به خلوص ژنتیکی ۹۳ درصدی گیاهان در این نسل، این نتیجه دور از انتظار نبود. در نمودار حاصل A1A1 شبیه گالیا و A2A2 شبیه سمسوری و ساوه است.

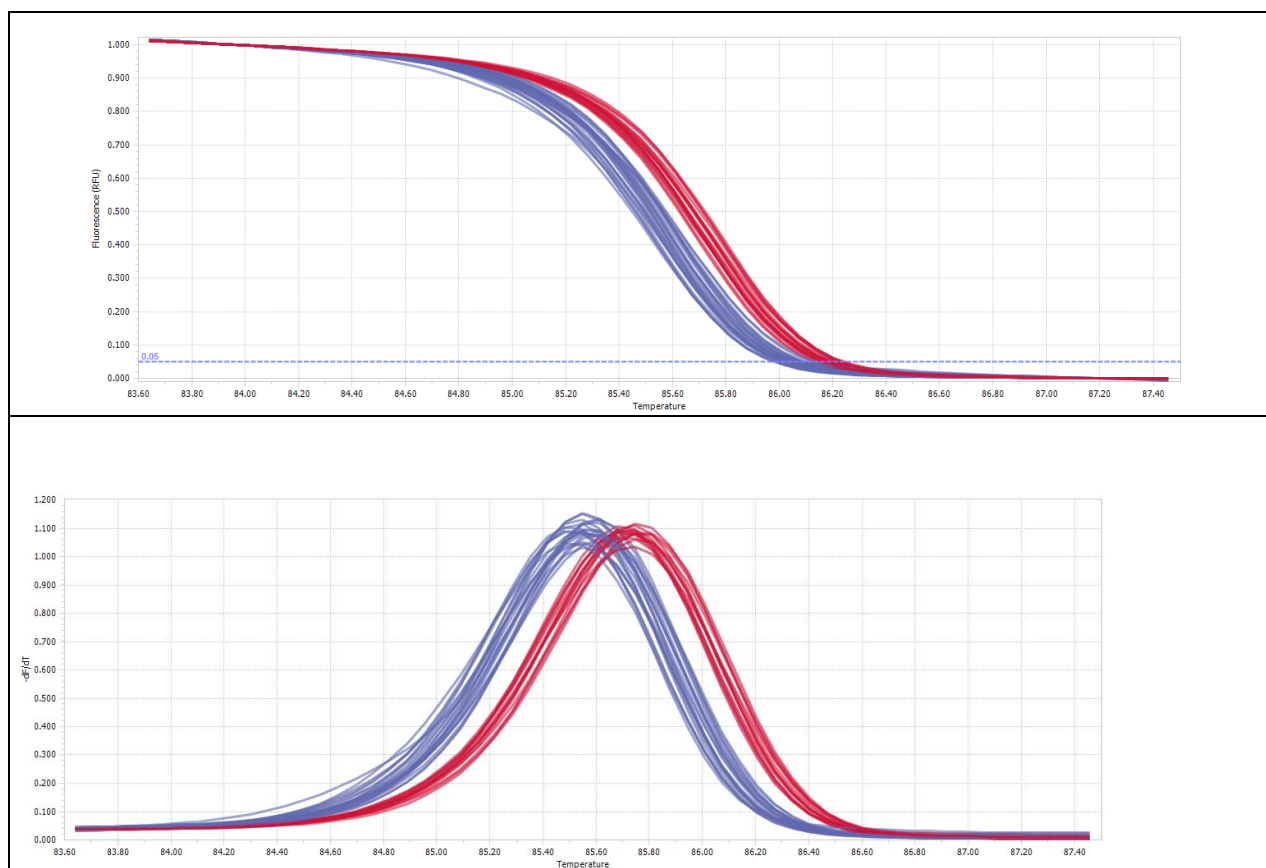
ارتباط بین ژن *SIERF1* و میزان قند

میزان قند میوه در ۴۱ بوته از خانواده‌های مختلف نسل F5 به همراه ارقام والدی گالیا، ساوه و سمسوری با دستگاه رفرکتومتر اندازه‌گیری شد. به منظور پیدا کردن ارتباط بین این مکان ژنی و میزان قند آزمون t انجام شد. تفاوت بین دو گروه از نظر میزان شیرینی یا قند میوه بسیار معنی‌دار بود. شکل ۳ میانگین شیرینی میوه در این دو گروه را نشان می‌دهد. در مجموع در نسل F5 تعداد ۱۵ گیاه دارای ژنوتیپ A1A1 و ۲۶ گیاه دارای ژنوتیپ A2A2 بودند. در این شکل اشتباه معیار میانگین‌ها نیز نشان داده شده است. میانگین قند میوه در گیاهانی که ژنوتیپ A1A1 و A2A2 داشتند به ترتیب برابر ۱۲/۷ و ۱۰/۳ به دست آمد. در مطالعه Ramezani et al. (2020) در جمعیت F2 مطالعه شده سه ژنوتیپ A1A1، A1A2 و A2A2 شناسایی شد. در مطالعه یاد شده میزان قند میوه این سه ژنوتیپ در جمعیت F2 حاصل از تلاقی گالیا در

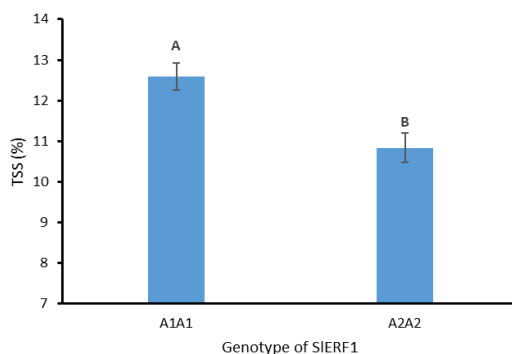
نتایج نشان داد جمعیت ساوه در گالیا دارای میوه‌های درشت‌تر بوده و همچنین دیررس‌تر بوده‌اند. در مجموع ۵ مؤلفه اول ۹۵ درصد تغییرات را توجیه کردند. مؤلفه اول ۴۶/۵ درصد تغییرات فنوتیپی را توجیه کرد. این مؤلفه بیشترین همبستگی را با عملکرد ($r=0.38$)، وزن میوه ($r=0.45$)، طول میوه ($r=0.41$)، عرض میوه ($r=0.44$) و ضخامت گوشت ($r=0.40$) نشان داد. همراستایی بالاتر بردارهای ویژه صفات یاد شده در شکل با مؤلفه اول نیز این نتایج را گویاتر نشان می‌دهد. مؤلفه دوم ۱۸/۵ درصد از تغییرات فنوتیپی را نشان داد و بیشترین همبستگی را با قطر حفره ($r=0.56$) و نسبت ضخامت گوشت به قطر حفره ($r=-0.65$) نشان داد. همراستایی مثبت بردار ویژه صفت قطر حفره و همراستایی عکس بردار ویژه ضخامت گوشت به قطر حفره با مؤلفه دوم نیز در شکل کاملاً گویا است. در مجموع دو مؤلفه اول ۶۵ درصد تغییرات را نشان می‌دهد. خانواده‌های ۳۲، ۳۰، ۲۷، ۳۱ و ۲۶ که همگی از تلاقی ساوه در گالیا به دست آمده‌اند دارای طول، عرض، وزن و عملکرد بالایی هستند. بیشترین نسبت ضخامت گوشت به قطر حفره داخلی در رقم گالیا دیده می‌شود. این رقم به ضخامت گوشت بالا و شیرینی بالا معروف است. Ramezani et al. (2020) جمعیت F2 حاصل از تلاقی ساوه در گالیا را بررسی کرده بودند. در این تحقیق ۴۲ بوته مطلوب از نظر صفات رویشی و تحمل به بیماری و ویروس از یک جمعیت بزرگ F2 انتخاب شده بود و به همراه رقم والدی گالیا و ساوه بررسی شد. نکته جالب توجه اینجاست که از نظر وزن میوه در جمعیت F2 مورد بررسی تنوع بسیار بیشتری نسبت به خانواده‌های گزینش یافته نسل F5 دیده می‌شود. در جمعیت F2 گزارش شده توسط نویسنده یاد شده وزن میوه از ۷۸۵ گرم تا ۳۰۶۱ گرم متغیر بوده است. در حالی که در خانواده‌های F5 تنوع بین ۶۳۱ تا ۲۰۰۴ گرم متغیر است. همچنین میزان قند میوه از ۴ تا ۱۴ در جمعیت F2 متغیر بود در حالی که در خانواده‌های گزینش یافته قند میوه ۷/۲ تا ۱۲/۳ است که نشان می‌دهد در فرآیند گزینش، خانواده‌هایی که شیرینی بسیار کمی داشته‌اند رفته رفته حذف شده‌اند. با کمک تجزیه به مؤلفه‌های اصلی می‌توان بهترین خانواده‌ها را برای تولید لاین‌های برتر گزینش کرد. بر این اساس خانواده‌های ۳۲، ۳۰، ۳۱، ۲۷ و ۲۶ خانواده‌هایی هستند که

F2 و F5 در یک جمعیت اصلاحی مشترک به اثبات رسید و این نتیجه نشان می‌دهد که می‌توان با اطمینان از این نشانگر برای گزینش گیاهان برتر یا گزینش به کمک نشانگر (MAS) استفاده کرد.

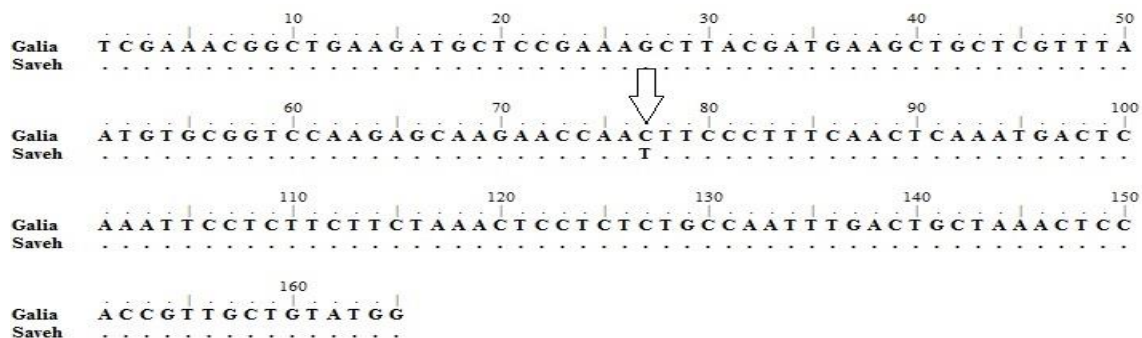
ساوه به ترتیب ۱۱/۷۵، ۱۰/۸۵ و ۶/۶۸ به دست آمد. تفاوت بین ژنوتیپ‌های A1A1 و A1A2 معنی‌دار نبود در حالی که این دو ژنوتیپ به طور معنی‌داری میزان قند بالاتری نسبت به ژنوتیپ A2A2 نشان دادند. بنابراین کارایی نشانگر *SIERF1* در دو نسل



شکل ۲- منحنی میزان فلورسنس به ازای افزایش دما (بالا) و منحنی تغییرات فلورسنس به ازای افزایش دما (پایین) در گیاهان نسل F5 به همراه گیاهان والدی (گالیا، ساوه و سمسوری). رنگ قرمز مربوط به نمونه‌هایی است که دارای ژنوتیپ A1A1 هستند یعنی در SNP مورد نظر توالی GC دارند در حالی که رنگ آبی نشان دهنده ژنوتیپ‌های A2A2 است. این ژنوتیپ‌ها در SNP مورد نظر توالی AT را دارا هستند. ژنوتیپ گالیا A1A1 و ژنوتیپ سمسوری و ساوه A2A2 است.



شکل ۳- مقایسه میانگین میزان قند در دو ژنوتیپ نشانگر SNP ارزیابی شده در ۴۴ گیاه طالبی شامل ارقام گالیا، سمسوری و ساوه و تعداد ۴۱ گیاه نسل F5 (ستون‌های دارای حروف متفاوت در سطح احتمال ۰/۰۱ از نظر قند میوه تفاوت معنی‌دار دارند). تفاوت بین دو میانگین -2.36 و اشتباه معیار تفاوت دو میانگین 0.42 و $t=-5.62$ به دست آمد که در سطح احتمال $p=0.01$ بسیار معنی‌دار بود.



شکل ۴- بخشی از توالی ژن *SIERF1* در دو ژنوتیپ گالیا و ساوه، در این بازه یک SNP وجود دارد. این قطعه توسط آغازگر HRM-SIE1 تکثیر شد که طولی برابر ۱۶۵ جفت باز داشت. به دلیل وجود SNP الگوی منحنی در افراد شیرین هموزیگوت و افراد دارای شیرین کم هموزیگوت متفاوت بود که به این روش می‌توان به ژنوتیپ گیاه مورد نظر پی برد.

توالی‌یابی

به دست آمده از جمعیت F2 که توسط (Ramezani et al. 2020)

گزارش شد یکسان است.

بنابراین در ژنوتیپ شیرین خالص که به صورت A1A1 بود همه قطعات تکثیر شده در PCR در این نقطه دارای GC خواهند بود. از طرفی در ژنوتیپ دارای شیرینی کم و متوسط به پایین که به صورت A2A2 بود همه قطعات تکثیر شده در PCR دارای جفت‌باز AT در این نقطه هستند که منحنی ذوب مخصوص به خود را خواهند داشت و منحنی ذوب آن‌ها با منحنی ذوب ژنوتیپ‌هایی با شیرینی بالا متفاوت خواهد بود. به این ترتیب هر کدام از دو ژنوتیپ را می‌توان با دقت بالا تعیین کرد.

برای تایید نشانگر SNP با توجه به منحنی‌های به دست آمده چند قطعه تکثیر یافته از هر الگو برای توالی‌یابی انتخاب شدند. توالی‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار BioEdit بررسی شد. یک ناحیه به طول ۱۶۵ جفت‌باز شناسایی شد که در این ناحیه تفاوت بین لاین‌ها و والدین شیرین و دارای شیرینی کم یک نوکلئوتید بود که در آل رقم شیرین گالیا در این نقطه جفت‌باز GC و در آل رقم ساوه و سمسوری با شیرینی کم در این نقطه باز AT مشاهده شد (شکل ۴). نتیجه این توالی‌یابی نیز دقیقاً با نتیجه

جدول ۴- مشخصات لاین‌های دارای ژنوتیپ A1A1. ستون اول شجره هر لاین را نشان می‌دهد. اعداد به ترتیب مربوط به شماره گیاه انتخاب شده از نسل F2 تا نسل F5 در هر ردیف کشت هستند.

Line code	Yield per plant	Fruit number per plant	Days to harvest	Fruit weight	Fruit length	Fruit width	Cavity diameter	Flesh thickness	Flesh to cavity	TSS
NG14-2-2-1	3071.8	2.8	26.7	1117.0	13.5	14.2	7.8	3.4	0.5	13.1
NG14-3-2-2	3090.7	3.3	25.4	927.2	12.9	12.8	6.2	3.6	0.6	12.9
NG18-1-2-2	1262.5	1.5	23.0	841.7	11.3	13.3	6.0	4.2	0.7	14.4
NG18-4-3-3	4272.7	3.7	28.4	1068.2	13.1	12.4	5.6	3.7	0.7	12.7
NG26-2-2-1	1028.0	1.8	25.4	571.1	11.4	11.0	5.5	2.9	0.6	11.1
NG5-3-1-3	2119.0	1.8	32.4	1177.2	13.9	13.9	6.2	4.1	0.7	12.7
SG25-1-1-3	2331.1	3.1	31.7	741.7	12.0	11.5	5.7	3.3	0.6	11.6
SG25-3-1-2	1842.8	1.8	38.4	1023.8	12.9	12.4	5.5	3.6	0.7	13.3
SG26-1-2-1	2131.0	1.3	30.0	1598.3	14.3	15.5	5.8	4.8	0.8	12.6
SG26-2-1-3	1945.5	1.3	32.8	1556.4	15.6	15.6	8.5	3.9	0.5	15.4
SG26-3-2-2	4406.0	2.3	32.3	1888.3	15.1	17.0	8.8	5.6	0.7	11.8
SG29-2-2-2	2327.2	2.3	27.0	872.7	14.1	13.1	6.5	3.4	0.5	12.0
SG32-1-1-1	1256.6	1.2	18.0	1047.2	12.2	12.7	6.8	3.7	0.5	14.1
SG38-1-2-2	3729.8	2.0	29.4	1864.9	17.9	14.6	6.4	4.2	0.7	10.7
SG38-2-1-4	4420.7	3.0	29.3	1473.6	15.3	15.3	6.6	4.8	0.8	12.2

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق ارزیابی های فنوتیپی نشان داد که میزان قند میوه در طالبی بومی ساوه و سمسوری بسیار پایین بوده و نیاز به به‌نژادی و بهبود دارد. همچنین نتایج نشان داد والد گالیا برای اصلاح ژنتیکی شیرینی میوه بسیار مناسب بوده است چرا که آلل ژن *SIERFI* در این رقم میزان قند را در جمعیت F5 به مقدار بسیار زیادی بالا برد. میزان قند میوه رقم گالیا (TSS=۱۲/۴) بسیار بالا به دست آمد. با توجه به نتایج حاصل از آنالیز HRM ژن شیرینی *SIERFI* میزان قند لاین‌های انتخابی نسل F5 به میزان قابل توجهی افزایش یافت. علت نبودن ژنوتیپ هتروزیگوت در نتایج حاصل به این دلیل است که در نسل F5 میزان خلوص بسیار بالاست اگر چه اگر تعداد گیاهان بیشتر بود ممکن بود گیاه هتروزیگوت شناسایی شود. تعیین ژنوتیپ گیاهان نسل F5 حاصل از تلاقی‌های گالیا × سمسوری و گالیا × ساوه با نشانگر (SIEI-HRM) کارایی بالای این نشانگر در گزینش لاین‌های داری میزان قند مطلوب را تأیید نمود. این نشانگر دارای تکرارپذیری نزدیک به صد درصد می‌باشد و استفاده از آن راحت و سریع است. در نتیجه به‌کارگیری این نشانگر برنامه‌های به‌نژادی طالبی را تسریع خواهد نمود. لاین‌های برتر گزینش شده در این مطالعه می‌توانند در درآینده برای تولید ارقام هیبریدی که صفات ظاهری مشابه طالبی ساوه و سمسوری و شیرینی مشابه رقم گالیا داشته باشند مورد استفاده قرار گیرند. با گزینش این گیاهان و خودگشنی آن‌ها می‌توان در آینده با استفاده از تلاقی ارقام هیبرید تولید کرد که کیفیت مطلوب‌تری نسبت به ارقام ساوه و سمسوری داشته باشد و رقمی تولید کرد داشته باشد.

در نقطه وجود این SNP، پیش از این چندین QTL که میزان قند میوه را کنترل می‌کنند، نقشه‌یابی شده است (Dai et al. 2011; Harel-Beja et al. 2010; Diaz et al. 2015). در یک مطالعه که از تجزیه ارتباطی روی ۱۷۵ ژنوتیپ مختلف از سراسر دنیا انجام شده بود، به‌صورت دقیق مشخص شده است که این نشانگر روی کروموزوم شماره ۳ قرار دارد و به تنهایی بیش از ۱۱ درصد تغییرات در میزان ساکارز را به خود اختصاص داده است (Leida et al. 2015). نشانگر *SIERFI* در واقع ارتولوگ ژن عامل پاسخ دهنده به اتیلن (ethylene responsive factor) در گیاه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) است. به‌نظر می‌رسد این ژن در رسیدگی میوه و تجمع قند نقش داشته باشد (Leida et al. 2015).

معرفی لاین‌های برتر

جدول ۴ مشخصات ۱۵ لاینی که دارای آلل A1A1 هستند را نشان می‌دهد. ستون اول این جدول مربوط به شجره هر لاین است. همان‌گونه که مشخص است در بین لاین‌ها می‌توان لاین‌هایی را پیدا کرد که علاوه بر شیرینی بالای میوه، ضخامت گوشت بالایی دارند. به‌عنوان مثال لاین‌های SG26-1-2-1 و SG38-2-1-4 می‌توانند به‌عنوان لاین‌های برتر برای تولید هیبرید استفاده شود. ضخامت گوشت این دو لاین ۴/۸ سانتی‌متر است. علاوه بر این عملکرد لاین SG-38-1-2-4 بالای ۴/۴ کیلوگرم در بوته است. نکته مهم در مورد انتخاب بهترین لاین‌ها این است که نمی‌توان تنها به یک صفت توجه داشت. اگر چه لاین SG26-2-1-3 دارای بیشترین شیرینی میوه است ولی عملکرد آن در واحد بوته کمتر از ۲ کیلوگرم است. بنابراین می‌تواند با یک لاین با عملکرد بالا تلاقی داده شود تا این نقطه ضعف جبران شود.

منابع

Argyris JM, Díaz A, Ruggieri V, Fernández M, Jahrman T, Gibon Y, Picó B, Martín-Hernández AM, Monforte AJ, Garcia-Mas J (2017) QTL analyses in multiple populations employed for the fine mapping and identification of candidate genes at a locus affecting sugar accumulation in melon (*Cucumis melo* L.). *Frontiers in Plant Science* 8:1-20.

Benedetti BC, Gómez P, Martins M, Conesa A, Artés F (2008) Effect of Pre-processing Controlled Atmosphere

Storage on the Quality of Fresh-cut Galia Melons. *Food Science and Technology International* 14:13-19.

Burger Y, Saar U, Katz N, Paris HS, Yeselson Y, Levin I, Schaffer AA (2002) A single recessive gene for sucrose accumulation in *Cucumis melo* fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127:938-943.

Burger Y, Schaffer AA (2007) The contribution of sucrose metabolism enzymes to sucrose accumulation in *Cucumis melo*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132:704-712.

- Cohen R, Burger Y, Horev C, Porat A, Edelstein M (2005) Performance of Galia-type melons grafted on to Cucurbita rootstock in *Monosporascus cannonballus*-infested and non-infested soils. *Annals of Applied Biology* 146:381-387.
- Collard BCY, Mackill DJ (2008) Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363:557-572.
- Croxford AE, Rogers T, Caligari PDS, Wilkinson MJ (2008) High-resolution melt analysis to identify and map sequence-tagged site anchor points onto linkage maps: A white lupin (*Lupinus albus*) map as an exemplar. *New Phytologist*, 180:594-607.
- Dai N, Cohen S, Portnoy V, Tzuri G, Harel-Beja R, Pompan-Lotan M, Carmi N, Zhang G, Diber A, Pollock S, Karchi H, Yeselson Y, Petreikov M, Shen S, Sahar U, Hovav R, Lewinsohn E, Tadmor Y, Granot D, ... Schaffer, A A (2011) Metabolism of soluble sugars in developing melon fruit: A global transcriptional view of the metabolic transition to sucrose accumulation. *Plant Molecular Biology* 76:1-18.
- Diaz A, Fergany M, Formisano G, Ziarsolo P, Blanca J, Fei Z, Staub JE, Zalapa JE, Cuevas HE, Dace G, Oliver M, Boissot N, Dogimont C, Pitrat M, Hofstede R, van Koert P, Harel-Beja R, Tzuri G, Portnoy V, ... Monforte AJ (2011) A consensus linkage map for molecular markers and Quantitative Trait Loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology* 11:1-17.
- Diaz A, Forment J, Argyris JM, Fukino N, Tzuri G, Harel-Beja R, Katzir N, Garcia-Mas J, Monforte AJ (2015) Anchoring the consensus ICuGI genetic map to the melon (*Cucumis melo* L.) genome. *Molecular Breeding* 35:1-7.
- Díaz A, Zarouri B, Fergany M, Eduardo I, Álvarez JM, Picó B, Monforte AJ (2014) Mapping and introgression of QTL involved in fruit shape transgressive segregation into "Piel de Sapo" melon (*Cucumis melo* L.). *PLoS ONE* 9:1-12.
- Eduardo I, Arús P, Monforte AJ, Obando JM, Fernández-Trujillo JP, Martínez JA, Alarcón AL, Álvarez JM, Van Der Knaap E, Esteras C, Formisano G, Roig C, Díaz A, Blanca J, Garcia-Mas J, Gómez-Guillamón ML, López-Sesé AI, Lázaro A, Monforte AJ, ... Pitrat M (2018) SNP genotyping in melons: Genetic variation, population structure, and linkage disequilibrium. *Theoretical and Applied Genetics* 121:1017-1034.
- Fernández-Trujillo JP, Picó B, Garcia-Mas J, Álvarez J M, Monforte AJ (2011) Breeding for Fruit Quality in Melon. *Breeding for Fruit Quality*. John Wiley and Sons, Inc., 261-278.
- Gal S, Alkalai-Tuvia S, Pertzalan Y, Elkind Y, Ravid U, Fallik E (2008) Sensory evaluation of 'Galia'-type melons treated with 1-methylcyclopropene after prolonged storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 83:589-594.
- Han Y, Khu DM, Monteros MJ (2012) High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Molecular Breeding* 29:489-501.
- Harel-Beja R, Tzuri G, Portnoy V, Lotan-Pompan M, Lev S, Cohen S, Dai N, Yeselson L, Meir A, Libhaber SE, Avisar E, Melame T, van Koert P, Verbakel H, Hofstede R, Volpin H, Oliver M, Fougodoire A, Stalh C, ... Katzir N (2010) A genetic map of melon highly enriched with fruit quality QTLs and EST markers, including sugar and carotenoid metabolism genes. *Theoretical and Applied Genetics* 121:511-533.
- Jones ES, Sullivan H, Bhattaramakki D, Smith JSC (2007) A comparison of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism marker technologies for the genotypic analysis of maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 115:361-371.
- Leida C, Moser C, Esteras C, Sulpice R, Lunn JE, de Langen F, Monforte AJ, Picó B (2015) Variability of candidate genes, genetic structure and association with sugar accumulation and climacteric behavior in a broad germplasm collection of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Genetics* 16: 1-17.
- Li J, Wang X, Dong R, Yang Y, Zhou J, Yu C, Cheng Y, Yan C, Chen J (2011) Evaluation of High-Resolution Melting for Gene Mapping in Rice. *Plant Molecular Biology Reporter* 29:979-985.
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8:4321-4326.
- Oren E, Tzuri G, Dafna A, Meir A, Kumar R, Katzir N, Elkind Y, Freilich S, Schaffer AA, Tadmor Y, Burger J, Gur A (2020) High-density NGS-based map construction and genetic dissection of fruit shape and rind netting in *Cucumis melo*. *Theoretical and Applied Genetics* 133:1927-1945.
- Périn C, Hagen LS, De Conto V, Katzir N, Danin-Poleg Y, Portnoy V, Baudracco-Arnas S, Chadoeuf J, Dogimont C, Pitrat M (2002) A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. *Theoretical and Applied Genetics* 104:1017-1034.
- Pitrat M (2005) Melon. 1993 1-2.
- Pitrat M (2013) Phenotypic diversity in wild and cultivated melons (*Cucumis melo*). *Plant Biotechnology* 30:273-278.
- Ramezani F, Ramshini H, Lotfi M, Mohammad S, Mortazavian M, Pour-mombeini S (2020) SNP marker assisted selection for improving the sugar content in the cantaloupe. *Iranian Journal of Horticultural Science* 51:165-176. (In Farsi).
- Stepansky A, Kovalski I, Perl-Treves R (1999) Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. *Plant Systematics and Evolution* 217:313-332.
- Yu RH, Shan XH, Wang S, Li XH, Jiang Y, Tan H, Li YD (2011) A screening method for detecting simple sequence repeat (SSR) polymorphism of *Zea mays* using high-resolution melting-curve analysis. *African Journal of Biotechnology* 10:16443-16447.
- Zhang C, Yu X, Ayre BG, Turgeon R (2012) The origin and composition of cucurbit "Phloem" exudate. *Plant Physiology* 158:1873-1882.