

نشانه‌های ریز ماهواره پیوسته به ژن‌های کنترل کننده زمان گلدهی و برخی صفات مهم در جمعیت F<sub>1</sub>  
بادام حاصل از تلاقی کنترل شده (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲

## Microsatellite Markers Linked to the Genes Controlling Flowering Time and some Important Traits in F<sub>1</sub> Almond Population Resulting from Controlled Crosses of 'Tuono' (♂) × 'Shahrood-12' (♀)

موسی رسولی<sup>۱</sup>، محمدرضا فتاحی مقدم<sup>۲</sup>، ذبیح اله زمانی<sup>۳</sup>، علی ایمانی<sup>۴</sup>  
و پدرو مارتینز گومز<sup>۵</sup>

۱- استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر

۲ و ۳- به ترتیب دانشیار و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۴- دانشیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

۵- استاد، مؤسسه تحقیقات CEBAS کشور، اسپانیا

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۲۶

### چکیده

رسولی، م.، فتاحی مقدم، م. ر.، زمانی، ذ.، ایمانی، ع. و مارتینز گومز، پ. ۱۳۹۲. نشانه‌های ریز ماهواره پیوسته به ژن‌های کنترل کننده زمان گلدهی و برخی صفات مهم در جمعیت F<sub>1</sub> بادام حاصل از تلاقی کنترل شده (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۹: ۸۲۲-۸۰۵.

در این تحقیق زمان گلدهی و برخی صفات رویشی، خشک میوه و مغز بادام در جمعیت F<sub>1</sub> شامل ۷۲ نتاج حاصل از تلاقی رقم‌های 'تونو' میان گل و 'شاهرود ۱۲' دیرگل مورد ارزیابی قرار گرفت. از روش تجزیه تفرق توده‌ای تغییر یافته با استفاده از ۸۷ نشانه ریز ماهواره هسته‌ای و ۵ نشانه ریز ماهواره کلروپلاستی برای شناسایی نشانه‌های پیوسته با زمان گلدهی در دانها‌های انتخاب شده و نهایتاً کل جمعیت استفاده شد. نتایج نشان داد که توارث زمان گلدهی در نتاج به صورت کمی بود. نتاج محدوده وسیعی از زمان گلدهی را نسبت به والدین نشان دادند و برخی از نتاج زودتر از والد میان گل 'تونو' به گل رفتند. دو مکان ریز ماهواره CPPCT008 و EPPCU2584 با زمان دیر گلدهی پیوسته بودند. پس از تهیه نقشه ژنتیکی، تجزیه QTL برای زمان گلدهی و برخی صفات رویشی، خشک میوه و مغز انجام شد. نتایج نشان داد که مکان UDP97403 به میزان ۴ و ۰ سانتی مورگان به ترتیب با یکی از مکان‌های ژنی کنترل کننده عادت رشدی درخت و عرض خشک میوه، ضخامت خشک میوه و عرض مغز و مکان BPPCT007 به فاصله ۲ سانتی مورگان با یکی از مکان‌های ژنی کنترل کننده صفت عرض مغز فاصله داشتند. نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از این نشانه‌ها در جهت انتخاب غیر مستقیم نتاج مناسب از نظر زمان گلدهی و دارای خصوصیات برتر خشک میوه و مغز موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه می‌شود و می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی بادام و سایر گونه‌های Prunus از آن‌ها استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بادام، گلدهی، خشک میوه، مغز، تجزیه تفرق توده‌ای، QTL، انتخاب به کمک نشانه همراه.

## مقدمه

تهیه نقشه‌های ژنتیکی است که براساس آن می‌توان جایگاه ژنی و کروموزومی ژن‌های تعیین کننده صفات مطلوب (یعنی ترتیب و فاصله ژن‌ها و نشانگرها از یک‌دیگر روی کروموزوم‌ها) را تعیین کرد. نقشه لینکاژ ژنتیکی در واقع نمایش گرافیکی آرایش مکان‌های ژنی است. تهیه نقشه و توالی‌یابی ژنوم‌های گیاهی به درک عمل، تنظیم و بیان ژن‌ها کمک شایانی می‌کند. برای تعیین مکان ژنی یک صفت، پیوستگی ژنتیکی مجموعه‌ای از نشانگرها که با آن صفت تفرق همزمان (co-segregation) نشان می‌دهند، مورد آزمون قرار می‌گیرد. بدین منظور نیاز به تعداد زیادی نشانگر مختلف در طول هر کروموزوم است که در بهترین حالت باید در فواصل یکنواخت نسبت به یک‌دیگر قرار گرفته باشند. با دانستن جایگاه یک ژن روی نقشه ژنتیکی می‌توان از نشانگرهای مجاور آن برای احراز وجود صفت متناظر استفاده کرد. بدین ترتیب نیازی به انتظار برای ظهور آثار آن ژن نیست. این مزیت در مورد گیاهان چندساله مانند درختان باغی اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. بنابراین با استفاده از نشانگرهای DNA می‌توان صفات و مشخصات آینده یک نهال بادام، یک درخت جنگلی و یا یک نشاء برنج را پیش‌بینی کرد و در نتیجه با آگاهی کامل اتخاذ تصمیم کرده تا نسبت به انهدام موارد نامطلوب و پیش‌برد گیاهان مناسب دارای صفات مطلوب اقدام شود (Ballester *et al.*, 2001)؛ (Dong *et al.*, 2000).

زمان گلدهی یک صفت مهم در درختان میوه است که به طور عمده نیازمند به همزمانی گلدهی ارقام برای گرده‌افشانی بسته به شرایط محیطی در طول فصل گلدهی است (Albuquerque *et al.*, 2008). بارندگی در زمان گلدهی و گرده‌افشانی و همچنین سرمای بهاره به میزان قابل توجهی محصول را کاهش داده و حتی در برخی از مواقع کل محصول را از بین می‌برند، به همین دلیل دیر گلدهی می‌تواند یکی از اهداف اصلی برنامه‌های به‌نژادی در بادام باشد تا گلدهی زمانی اتفاق بیفتد که خطر سرمازدگی بهاره بسیار کم و یا اصلاً وجود نداشته باشد (Kester and Gradziel, 1996). زمان گلدهی به دمای زمستان، میزان سرمای لازم برای شکستن خواب جوانه‌ها و نیاز گرمایی وابسته است (Lander *et al.*, 1987)؛ (Lander and Botstein, 1989)؛ (Tabuenca *et al.*, 1972). زمان گلدهی در اکثر گونه‌های گیاهی به خصوص در گونه‌های جنس پرونوس یک صفت کمی است (Anderson and Seeley, 1993). بیشتر نتایج در مورد نحوه توارث زمان گلدهی در بادام نشان دهنده توارث کمی این صفت در بادام بوده است (Kester, 1965). که با دامنه وراثت‌پذیری بین ۰/۶۷ تا ۰/۸ (Dicenta *et al.*, 1993) متفاوت است. از مهم‌ترین کاربردهای نشانگرهای DNA

برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با مکان‌های ویژگی‌های خاص میوه در تلاقی‌های هلو × بادام استفاده شده است (Warburton *et al.*, 1996).

در خصوص مکان‌یابی ژن‌های مرتبط با صفات مختلف در نقشه‌های لینکاژی جنس پرونوس نیز مطالعاتی انجام شده است. در نقشه ژنتیکی بادام با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و ریبونوکلئازهای خامه (Stylar RNase) در یک جمعیت F1 (۵۸ فرد) حاصل از تلاقی دو رقم بادام، مکان ژن خودناسازگاری در گروه ۶ لینکاژی نقشه مذکور تعیین شد (Ballester *et al.*, 2001). همچنین در جمعیت F1 دیگری (حاصل از تلاقی دو رقم بادام) شامل ۱۳۴ ژنوتیپ بادام با استفاده از روش BSA (Bulk Segregation Analysis) نشانگر RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) مرتبط با زمان گلدهی در گروه ۴ لینکاژی نقشه بادام شناسایی شد. برای مکان‌یابی صفات دیگری نظیر رنگ گل، مقاومت به نماتد و رنگ بساک از نشانگرهای RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) استفاده شده است (Ballester *et al.*, 2001).

کامپونی و همکاران (Campoy *et al.*, 2010 a, b) پس از تهیه نقشه ژنتیکی زردآلو با استفاده از ۴۶ نشانگر (Simple Sequence Repeat: SSR) زردآلو و

انتخاب به کمک نشانگر (Marker Assisted Selection: MAS) یک راه و روش بسیار قابل قبول و مهم برای افزایش و کارآیی اهداف انتخابی است (Luby and Shaw, 2001)؛ (Arus and Moreno-Gonzalez, 1993). اطلاع از پیشرفت‌های ژنتیکی، سرعت و کارآیی اصلاح ارقام را با استفاده از این روش‌های مولکولی تامین می‌کند. انتخاب زودتر با استفاده از نشانگرهای مولکولی اجازه غربال‌گری درست دانه‌ها را سال‌ها قبل از رسیدن به بلوغ و ارزیابی مزرعه‌ای فراهم می‌کند. همچنین ارزیابی QTL‌های (Quantitative Trait Locus) مختلف برای رسیدن به صفات مهم و مورد توجه از نظر باغبانی امکان‌پذیر می‌شود. کم کردن تعداد نسل تولید شده برای دستیابی به ژنوتیپ مورد نظر پس از تلاقی خاص با ژنوتیپ دیگر یا گونه وحشی نیز به کمک نشانگرهای مولکولی فراهم می‌شود (Baird *et al.*, 1996)؛ (Arus and Moreno-Gonzalez, 1993). تجزیه تفرق توده (Bulk Segregation Analysis: BSA) جایی که دو نمونه DNA مخلوط شده از منابع گیاهی با پیش‌زمینه ژنتیکی مشابه اما متفاوت در یک صفات خاص است، یک رهیافت قوی برای بررسی مولکولی پیوستگی نشانگر-صفات محسوب می‌شود. استراتژی ترکیب نشانگرهای مختلف با تجزیه توده در حال تفرق

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی، ثبت زمان گلدهی و انتخاب

#### توده‌های فنوتیپی

زمان گلدهی برای ۷۲ نتاج حاصل از تلاقی رقم 'شاهرود ۱۲' به عنوان والد مادری و رقم 'تونو' به عنوان والد پدری که در کلکسیون تحقیقاتی کمال آباد کرج وابسته به موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کشت شده‌اند، در سن شش، هفت و هشت سالگی برای دو سال متوالی (۱۳۸۹-۱۳۸۸) یادداشت برداری شد. کد دهی زمان گلدهی بر اساس توصیف نامه بادام انجام شد. از بین ۷۲ دانهال مورد بررسی، دو گروه شامل گروه خیلی زودگل و گروه خیلی دیر گل که هر گروه شامل چهار دانهال بودند همراه با والد مادری (شاهرود ۱۲) و والد پدری (تونو) انتخاب شدند. چهار نتاج ۱۹، ۳۰، ۳۱ و ۷۸ به عنوان زودگل‌ترین و چهار نتاج شامل ۷، ۱۱، ۱۷ و ۲۷ به عنوان دیرگل‌ترین گروه‌های فنوتیپی انتخاب شدند.

#### استخراج DNA و تعیین کمیت و کیفیت آن

برگ‌های جوان و نمو یافته در اردیبهشت ماه از تمام دانهال‌های جمعیت تهیه و در فریزر  $80^{\circ}\text{C}$  - ذخیره شد. روش Murray and Thompson (1980) تغییر یافته و Doyle and Doyle (1987) و Sonnevld *et al.* (2001) برای استخراج DNA ژنومی به کار گرفته شد. با استفاده از

هلو، از آن به منظور شناسایی مکان‌های کنترل‌کننده صفت کمی زمان گلدهی زردآلو استفاده کردند. تجزیه QTL برای زمان گلدهی اجازه شناسایی یک مکان مهم روی گروه لینکاژی شماره ۵ والد Z506-07 را نشان داد و بسیاری از تفاوت‌های فنوتیپی را تفسیر کرد. در نهایت این محققین دو مکان ریزماهواره UDAP-423r و AMPA-105 را شناسایی کردند که پیوستگی نزدیکی با صفت زمان گلدهی در زرآلو داشتند. از آن جایی که زمان گلدهی در بادام یک صفت کمی است، لذا شناسایی نشانگرهای همبسته با مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفت کمی زمان گلدهی در بادام می‌تواند در توسعه و انتخاب ارقام جدید به کمک نشانگر MAS کمک کند. هدف از این تحقیق ارزیابی افراد جمعیت به دست آمده از تلاقی دو رقم بادام 'شاهرود ۱۲' (به عنوان والد مادری) و 'تونو' (به عنوان والد پدری) از نظر صفت گلدهی، برخی صفات مهم رویشی، خشک میوه و مغز و جستجو برای برخی از نشانگرهای کاندید پیوسته با زمان گلدهی و برخی صفات مهم با استفاده از روش تجزیه تفرق توده به وسیله نشانگر مولکولی SSR در این جمعیت حاصل از تلاقی کنترل شده بود.

### انجام آزمایش SSR

#### آغازگرهای مورد استفاده

در این تحقیق از ۹۲ نشانگر ریز ماهواره هسته‌ای (شامل ۸۷ مکان) و کلروپلاستی (۵ مکان) برای شناسایی ژن (های) کنترل کننده زمان گلدهی در افراد مختلف انتخاب شده از نتایج مورد بررسی استفاده شد. این مکان‌های ریز ماهواره‌ای مربوط به گونه‌های مختلف جنس پرونوس شامل بادام، هلو، گیلاس، آلو و زردآلو که چند شکلی بالایی در مطالعات محققین مختلف نشان داده بودند، انتخاب شدند.

#### تنظیم شرایط PCR برای نشانگر SSR

اجزاء واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر بر اساس روش Sánchez-Pérez *et al.* (2004, 2007) تهیه شد. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی، شرایط PCR شامل غلظت‌های مورد استفاده (خصوصاً آنزیم تک پلیمرراز و DNA) و نیز چرخه‌های حرارتی (شامل تعداد، دما و نیز مدت هر یک از چرخه‌ها) بهینه‌سازی شد.

#### تهیه نقشه ژنتیکی

داده‌های مولکولی جمعیت به همراه والدین 'شاهرود ۱۲' و 'تونو' شامل ۱۵۵ آغازگر RAPD و ۹۲ مکان SSR ابتدا روی والدین و توده تفرق یافته آزمایش شد، سپس آغازگرها و مکان‌هایی که بین دو والد و دو توده چندشکلی نشان دادند انتخاب شده و سپس کل

### دستگاه نانودراپ مدل

(NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7)

ساخت شرکت بایورد امریکا کمیت DNA استخراج شده بر مبنای طیف جذبی در طول موج بین ۲۲۰ تا ۳۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین کیفیت DNA از ژل آگاروز ۱/۲٪ با ولتاژ ۷۵ به مدت یک ساعت الکتروفورز و عکس برداری توسط دستگاه ژل‌داک استفاده شد. در نهایت DNA پایه (gDNA) و نمونه‌های رقیق شده DNA در فریزر  $20^{\circ}\text{C}$  تا زمان استفاده، نگهداری شدند.

#### استفاده از تجزیه تفرق توده تغییر یافته برای

#### غربالگری نشانگرهای SSR

روش تلفیق DNA پیشنهاد شده توسط Michelmore *et al.* (1991) و Canli *et al.* (2004) تغییر یافته برای پیدا کردن نشانگرهای کاندید پیوسته با زمان گلدهی مورد استفاده قرار گرفت. تغییرات انجام شده به این صورت بود که DNA هر گیاه در گروه یکسان به صورت جداگانه در کنار هم مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تعداد افراد هر گروه برای اطمینان بیشتر از نتایج به دست آمده به چهار عدد افزایش یافت و در کنار آن‌ها DNA والدین نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از پیدا کردن نشانگرهای کاندید نیز روی تمام نتایج حاصل از تلاقی همراه با والدین مورد آزمایش قرار گرفت.

بود که نشان دهنده توارث کمی این صفت است. توزیع زمان گلدهی در نتاج حاصل از تلاقی در هر دو سال نرمال بود. ارزیابی زمان گلدهی نتاج و والدین در سال اول نشان داد که درصد بیشتر نتاج مانند والد پدری تونو دارای زمان گلدهی متوسط گل تا متوسط دیر گل بودند (شکل ۱). اما در سال دوم ارزیابی درصد بیشتر نتاج دارای زمان گلدهی متوسط دیر گل بودند، هر چند که فراوانی نتاج دارای زمان گلدهی زود تا متوسط گل و متوسط گل نیز بالا بود (شکل ۲). ارزیابی والدین و نتاج از نظر زمان گلدهی نشان داد که برخی از نتاج از نظر توزیع زمان گلدهی فراتر و یا متفاوت از والدین تلاقی داده شده بودند و این حالت به صورت زود گلدهی در برخی نتاج نسبت به والد میان گل 'تونو' مشاهده شد (شکل های ۱ و ۲). در شکل ۳ زمان گلدهی نتاج و همچنین موقعیت والدین و توده های فنوتیپی انتخاب شده از نظر زمان گلدهی مشخص شده است.

اسامی و توالی مکان های ریزماهواره پیوسته به ژن (های) کنترل کننده زمان گلدهی در جدول ۱ ذکر شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، از بین ۹۲ مکان ریزماهواره مورد بررسی (جدول ۲)، دو مکان ریزماهواره کاندید پیوسته با دیرگلدهی در جمعیت حاصل از تلاقی (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲ شناسایی شد (شکل های ۴ و ۵).

این دو مکان ریزماهواره CPPCT008 و EPPCU2584 بودند. مکان CPPCT008 یک

جمعیت با استفاده از آن‌ها مورد ارزیابی ژنتیکی قرار گرفت. تعداد آغازگرهای انتخاب شده شامل ۱۱ آغازگر RAPD و ۳۳ مکان ریزماهواره بود که در مجموع ۱۴۴ باندها حاصل از ۴۴ نشانگر جهت تهیه نقشه ژنتیکی رتبه‌بندی شد.

#### روش‌های آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از ثبت زمان گلدهی، فراوانی زمان گلدهی بر اساس توصیف گر بادام (Gulcan, 1985) در نتاج مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار اکسل (۲۰۱۰) محاسبه شد. پس از انجام آزمایش SSR نشانگرهایی که در بین والدین و دو گروه زودگل و دیرگل چند شکلی نشان دادند، انتخاب شدند. مواردی که در گروه زودگل دارای باندها بودند اما در گروه دیرگل فاقد باندها بودند و یا حالت برعکس نیز انتخاب شدند. نقشه ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزارهای Mapmaker و JoinMap3.0 با استفاده از تابع کوزامبی تهیه شد (van Ooijen and Voorrips, 2001). همچنین برای مکان‌یابی صفت زمان گلدهی در جمعیت مورد مطالعه از نرم‌افزار QTL Cartographer V1.30 استفاده شد.

#### نتایج و بحث

##### ارزیابی زمان گلدهی

زمان گلدهی برای جمعیت حاصل از تلاقی به طور پیوسته و دارای تغییر نسبی در هر دو سال

همراه با توالی آن‌ها SSR جدول ۱- اسامی آغازگرهای پیوسته با برخی صفات مهم بادام در آنالیز

Table 1. Name of linked primers with some almond important traits in SSR analysis with their sequences

ردیف	نوع نشانگر	باند کاندید	توالی آغازگر	صفت همبسته	فاصله از محل ژن کنترل کننده	
No.	Primer type	Candidate band	Sequence	Linked trail	Distance from controlling gene	
1	SSR	BPPCT002	F: TCGACAGCTTGATCTTGACC R: CAATGCCTACGGAGATAAAAGAC	Flowering	گلدهی	24cM
2	SSR	BPPCT007	F: TCATTGCTCGTCATCAGC R: CAGATTTCTGAAGTTAGCGGTA	Growth habit	عادت رشدی	21cM
3	SSR	BPPCT007	F: TCATTGCTCGTCATCAGC R: CAGATTTCTGAAGTTAGCGGTA	Nut width	عرض خشک میوه	25cM
4	SSR	BPPCT007	F: TCATTGCTCGTCATCAGC R: CAGATTTCTGAAGTTAGCGGTA	Nut diameter	ضخامت خشک میوه	25cM
5	SSR	BPPCT007	F: TCATTGCTCGTCATCAGC R: CAGATTTCTGAAGTTAGCGGTA	Kernel width	عرض مغز	2cM
6	SSR	CPPCT008	F: GAGCTCTCACGCATTAGTTT R: TTTGACTGCATAACAAAACG	Flowering	دیر گلدهی	0cM
7	SSR	EPPCU2584	F: TTCAGCTCATCTAGTTTCATCACC R: CACGGTTCGAACAACATCTG	Flowering	دیر گلدهی	37cM
8	SSR	UDP97403	F: CTGGCTTACAACCTCGCAAGC R: CGTCGACCAACTGAGACTCA	Growth habit	عادت رشدی	4cM
9	SSR	UDP97403	F: CTGGCTTACAACCTCGCAAGC R: CGTCGACCAACTGAGACTCA	Nut width	عرض خشک میوه	0cM
10	SSR	UDP97403	F: CTGGCTTACAACCTCGCAAGC R: CGTCGACCAACTGAGACTCA	Nut diameter	ضخامت خشک میوه	0cM
11	SSR	UDP97403	F: CTGGCTTACAACCTCGCAAGC R: CGTCGACCAACTGAGACTCA	Kernel width	عرض مغز	0cM

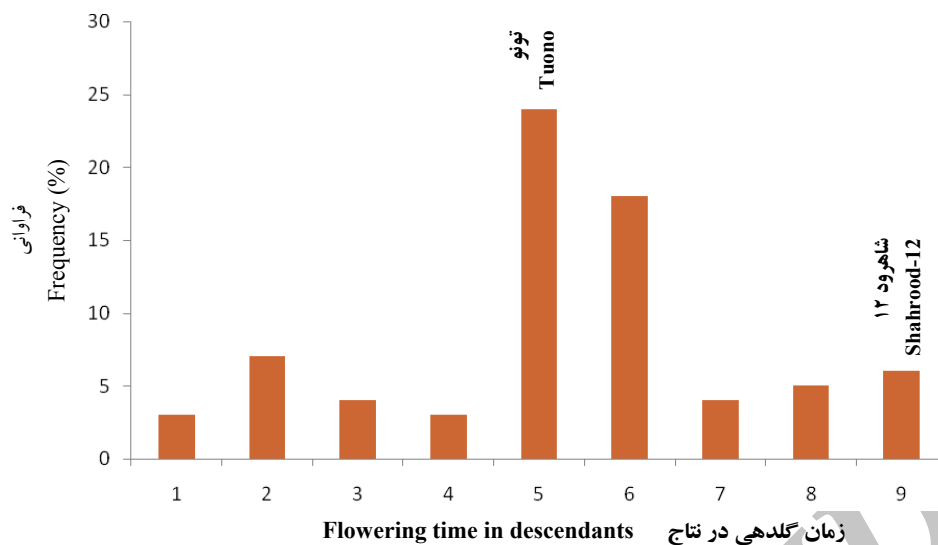
جدول ۲- نشانگرهای توالی ساده تکرار شونده (SSR) استفاده شده جهت مکان یابی ژنهای کنترل کننده زمان گلدهی در بادام

Table 2. Simple sequence repeat (SSR) markers used for detection of genetics controlling flowering time in almond

SSR گروه نشانگر	تعداد مکان تکثیر شده	تعداد مکان چند شکل	میوه	مرجع
SSR primer group	Sequenced sites No.	Polymorphic sites No.	Fruit	Reference
BPPCT	32	12	Peach	هلو Dirlwanger <i>et al.</i> (2002, 2004)
CPDCT	4	3	Almond	بادام Mnejja <i>et al.</i> (2005)
CPPCT	18	8	Peach	هلو Aranzana <i>et al.</i> (2003)
EPDCU	3	3	Almond	بادام GDR <sup>1</sup>
EPPCU	2	2	Peach	هلو GDR <sup>1</sup>
MA	1	1	Peach	هلو Yamamoto <i>et al.</i> (2002)
PceGA	1	1	Sweet cherry	گیلاس Downey and Iezzoni (2000)
pchcms	1	1	Peach	هلو Sosinski <i>et al.</i> (2000)
pchgms	1	1	Peach	هلو Sosinski <i>et al.</i> (2000)
PMS	1	1	Sweet cherry	گیلاس Cantini <i>et al.</i> (2001)
PS	1	1	Sweet cherry	گیلاس Sosinski <i>et al.</i> (2000)
Tpsep	5	0	Plum	آلو Ohta <i>et al.</i> (2005)
UDA	2	2	Almond	بادام Testolin <i>et al.</i> (2004)
UDP	14	10	Peach	هلو Cipriani <i>et al.</i> (1999)
UDP	6	5	Peach	هلو Testolin <i>et al.</i> (2000)
Total	92	51	-	--

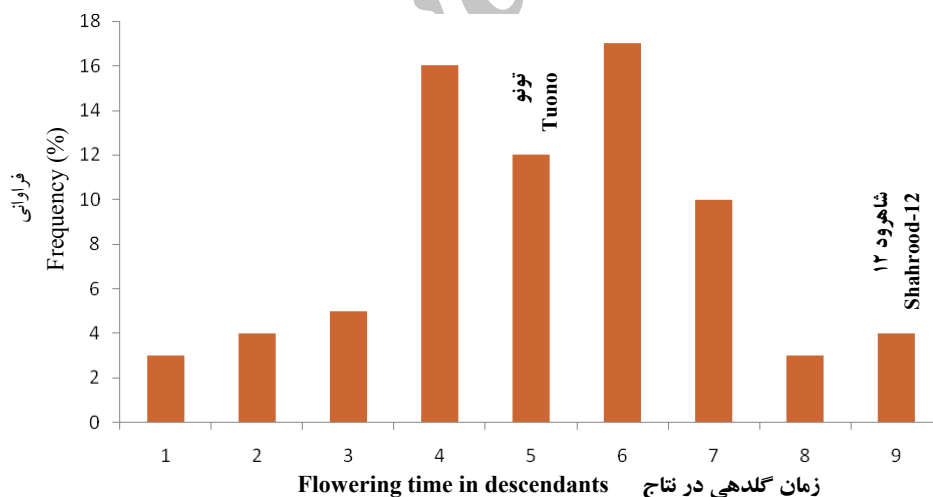
<sup>1</sup> GDR, Genome data base for Rosaceae (<http://www.rosaceae.org.peach.genome>)





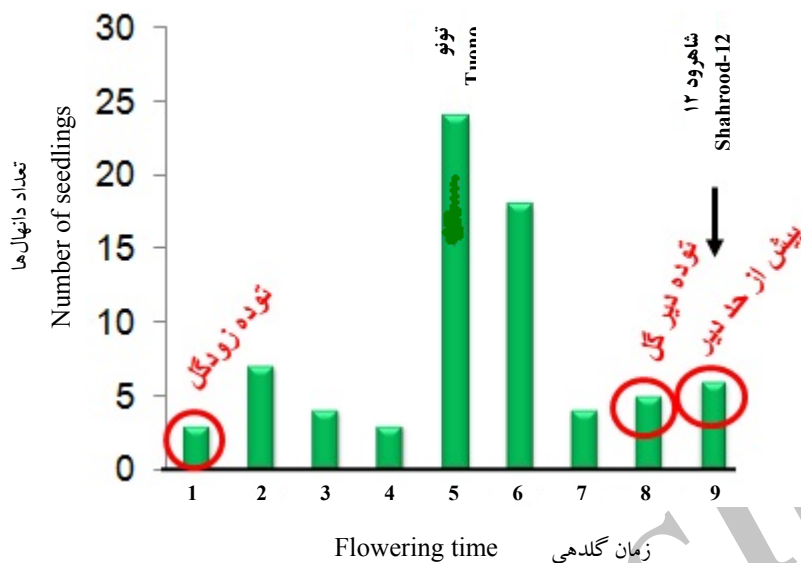
شکل ۱- فراوانی زمان گلدهی در دانه‌های حاصل از تلاقی (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲ در سال اول آزمایش (۱: بیش از حد زود گل؛ ۲: خیلی زود گل؛ ۳: زود گل؛ ۴: زود تا متوسط گل؛ ۵: متوسط گل؛ ۶: متوسط تا دیر گل؛ ۷: دیر گل؛ ۸: خیلی دیر گل؛ ۹: بیش از حد دیر گل)

Fig. 1. Frequency of flowering time in seedlings from the cross between 'Tuono' (♀) × 'Shahrood-12' (♂) in the first year (1: Extremely early; 2: Very early; 3: Early; 4: Early / intermediate; 5: Intermediate; 6: Intermediate / late; 7: Late; 8: Very late; 9: Extremely late)

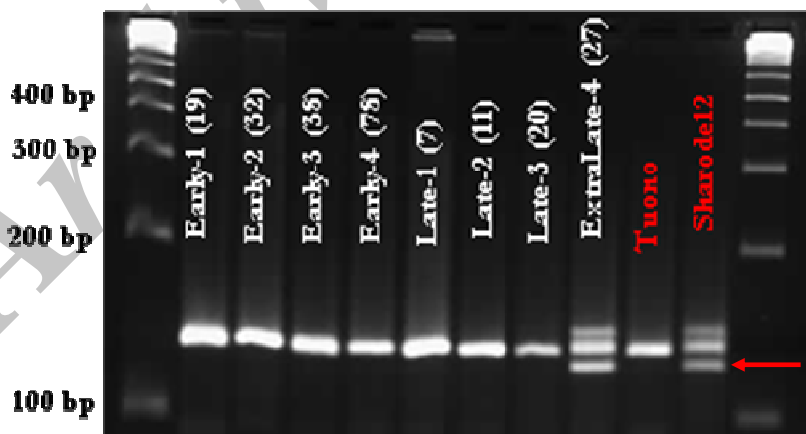


شکل ۲- فراوانی زمان گلدهی در دانه‌های حاصل از تلاقی (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲ در سال دوم آزمایش (۱: بیش از حد زود گل؛ ۲: خیلی زود گل؛ ۳: زود گل؛ ۴: زود تا متوسط گل؛ ۵: متوسط گل؛ ۶: متوسط تا دیر گل؛ ۷: دیر گل؛ ۸: خیلی دیر گل؛ ۹: بیش از حد دیر گل)

Fig. 2. Frequency of flowering time in seedlings from the cross between 'Tuono' (♀) × 'Shahrood-12' (♂) in the second year (1: Extremely early; 2: Very early; 3: early; 4: Early / intermediate; 5: Intermediate; 6: Intermediate / late; 7: Late; 8: Very late; 9: Extremely late)



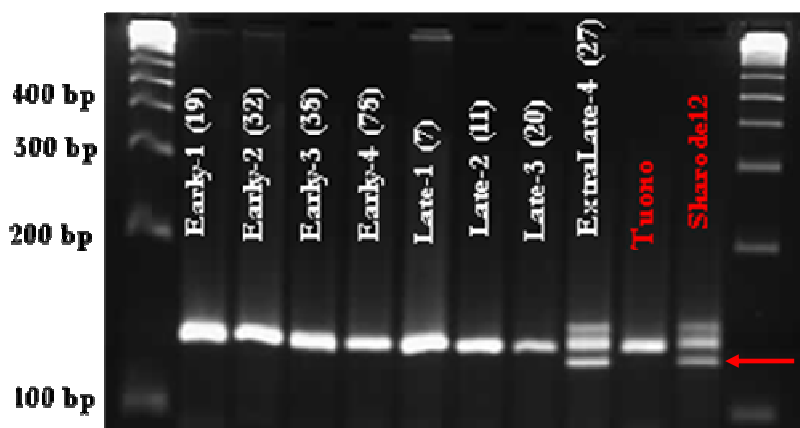
شکل ۳- نمودار موقعیت توده های فنوتیپی انتخاب شده (داخل بیضی) در دانهالهای حاصل از تلاقی (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲ به همراه والدین (۱: بیش از حد زود گل؛ ۲: خیلی زود گل؛ ۳: زود گل؛ ۴: زود تا متوسط گل؛ ۵: متوسط گل؛ ۶: متوسط تا دیر گل؛ ۷: دیر گل؛ ۸: خیلی دیر گل؛ ۹: بیش از حد دیر گل)  
 Fig. 3. Position of selected phenotypic mass in seedlings from the cross between 'Tuono' (♀) × 'Shahrood-12' (♂) with parents (1: Extremely early; 2: Very early; 3: Early; 4: Early / intermediate; 5: Intermediate; 6: Intermediate / late; 7: Late; 8: Very late; 9: Extremely late)



شکل ۴- باند کاندید پیوسته با زمان دیر گلدهی در بادام تکثیر یافته به اندازه تقریبی ۲۰۰ bp حاصل از مکان ریزماهوره CPPCT008  
 Fig. 4. Candidate linked band to late flowering time in almond with 200 bp size from CPPCT008 microsatellite locus

دیرگلدهی به اندازه تقریبی ۱۲۵ bp و ۱۵۰ bp را تکثیر نمود که تنها در نتایج خیلی دیرگل شماره ۲۷ و والد دیرگل شاهرود ۱۲ مشاهده شدند. این باندها در توده زودگل و والد میان گل تونو مشاهده نشدند (شکل ۵).

باند پیوسته با زمان دیرگلدهی به اندازه ۲۰۰ bp را تکثیر کرد که تنها در نتایج خیلی دیرگل شماره ۲۷ و والد دیرگل شاهرود ۱۲ مشاهده شد. این باندها در توده زودگل و والد میان گل تونو مشاهده نشد (شکل ۴). مکان EPPCU2584 نیز دو باند پیوسته با زمان



شکل ۵- دو باند کاندید پیوسته با زمان دیر گلدهی در بادام تکثیر یافته به اندازه تقریبی ۱۲۵bp و ۱۵۰bp حاصل از مکان ریز ماهواره EPPCU2584

Fig. 5. Two candidate linked band to late flowering time in almond with 125 bp and 150 bp size from EPPCU2584 microsatellite locus

منتخب استفاده شد. نقشه ژنتیکی با دو گروه لینکاژی که گروه اول شامل ۱۲ نشانگر و گروه دوم نیز شامل ۱۲ نشانگر بود، تهیه شد. نقشه به دست آمده برای تجزیه و مکان‌یابی ژن (های) کنترل‌کننده صفات کمی مورد استفاده قرار گرفت.

مکان‌یابی نشانگر(های) پیوسته به ژن (های) کنترل‌کننده برخی صفات مهم در بادام مکان‌یابی ژن (های) کنترل‌کننده

#### تهیه نقشه ژنتیکی

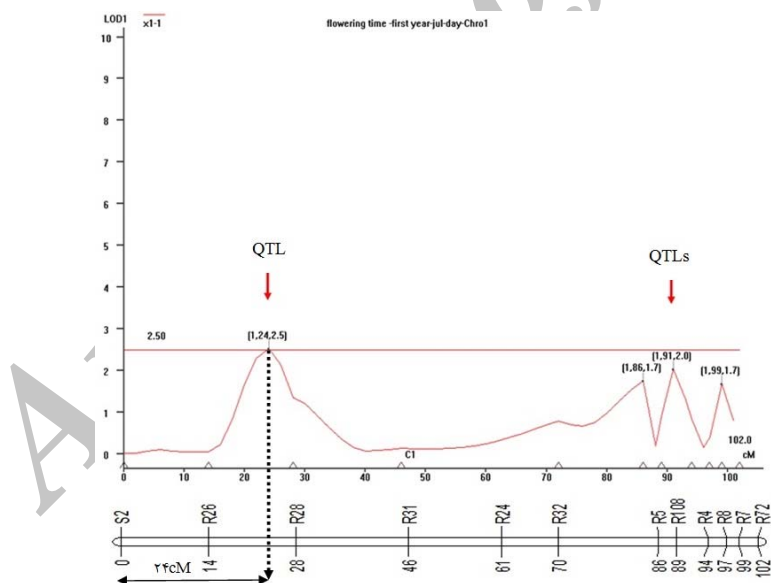
ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Mapmaker نقشه ژنتیکی برای ۱۴۴ باند حاصل از ۴۴ نشانگر منتخب (آغاز‌گرها ذکر نشده‌اند) با ۵ گروه لینکاژی تهیه شد. در گروه اول دو باند، در گروه دوم ۸۵ باند، در گروه سوم دو باند، در گروه چهارم ۱۸ باند و گروه پنجم ۲ باند قرار گرفتند و ۳۵ باند در هیچ گروهی قرار نگرفت. برای تهیه نقشه ژنتیکی از نرم‌افزار JoinMap3.0 نیز با استفاده از ۱۴۴ باند حاصل از ۴۴ نشانگر

سال اول آزمایش، یک QTL با فاصله ۲۴ سانتی‌مورگان از مکان BPPCT002 و با  $\text{Logarithm of odds: LOD}$  برابر ۲/۵ روی گروه لینکاژی شماره یک، شناسایی شد. همچنین یک QTL با فاصله ۹۱ سانتی‌مورگان از مکان BPPCT002 و با  $\text{LOD}$  برابر ۲/۰ روی گروه لینکاژی شماره یک شناسایی شد (شکل ۶). بر اساس نتایج حاصل از تجزیه QTL برای صفت زمان گلدهی در جمعیت مورد بررسی در سال اول آزمایش، نشان داد که روی گروه لینکاژی شماره ۲، QTL با  $\text{LOD}$  مساوی یا بیشتر از ۲ شناسایی نشد.

برخی صفات مهم در بادام در جمعیت مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار QTL Cartographer V1.30 (2001) انجام شد. نتایج به دست آمده از تجزیه QTL برای زمان گلدهی و سایر صفات مورد بررسی که برای آن‌ها QTL با  $\text{LOD}$  بالای ۲ شناسایی شد به شرح ذیل بود (شکل‌های ۶ و ۷).

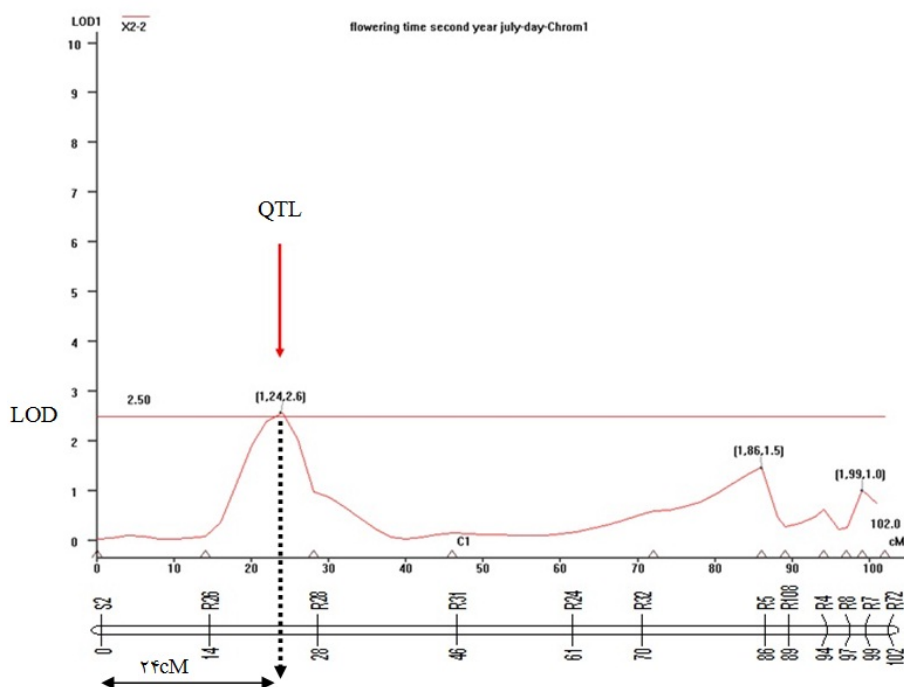
### سال اول ارزیابی زمان گلدهی

در تجزیه QTL برای صفت زمان گلدهی در جمعیت مورد بررسی در



شکل ۶- موقعیت، فاصله و  $\text{LOD}$  مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفت کمی زمان گلدهی در بادام شناسایی شده روی گروه لینکاژی شماره یک نقشه تهیه شده از جمعیت حاصل از تلاقی (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲ در سال اول آزمایش

Fig. 6. Position, distance and  $\text{LOD}$  of flowering time QTL identified in linkage groups on a map prepared of population from the cross between 'Tuono' (♀) × 'Shahrood-12' in the first year



شکل ۷- موقعیت، فاصله و LOD مکان های ژنی کنترل کننده صفت کمی زمان گلدهی در بادام شناسایی شده روی گروه لینکاژی شماره یک نقشه تهیه شده از جمعیت حاصل از تلاقی (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲ در سال دوم آزمایش Fig. 7. Position, distance and LOD of flowering time QTL identified in linkage groups on a map prepared of population from the cross between 'Tuono' (♂) × 'Shahrood-12' (♀) in the second year

نتایج حاصل از تجزیه تفرق توده‌ای مبنی بر این که دو مکان ریز ماهواره CPPCT008 و EPPCU2584 کاندید پیوسته با زمان دیر گلدهی بودند و از طرفی این دو در نقشه اولیه به دست آمده از تجزیه با استفاده از نرم افزار Mapmaker در گروه لینکاژی شماره ۲ قرار گرفتند اما در نقشه نهایی تهیه شده با استفاده از نرم افزار JoinMap3.0 در هیچ گروهی قرار نگرفتند.

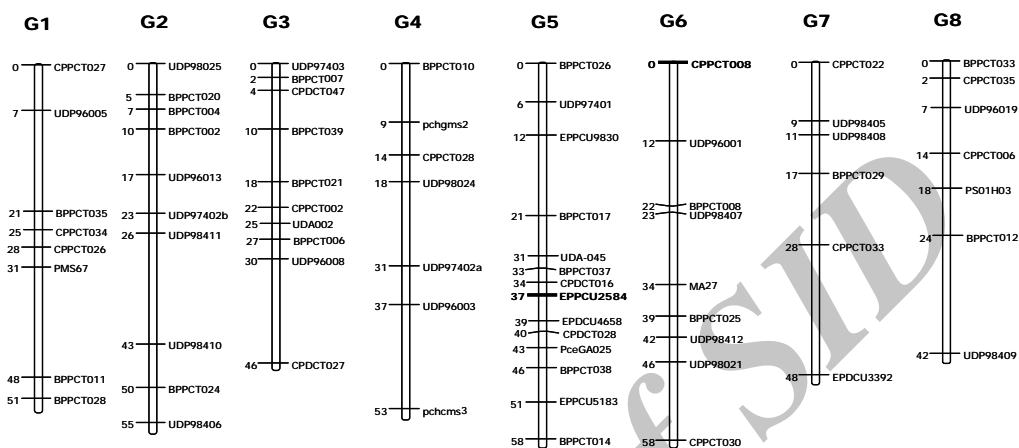
این دو مکان روی یک جمعیت دیگر به تعداد ۱۶۷ نتاج که نقشه ژنتیکی آن با ۵۶ مکان ریز ماهواره توسط (a) (۲۰۰۷) Sanchez-Perez *et al.* تهیه شده بود و بعداً نیز

### سال دوم ارزیابی زمان گلدهی

نتایج به دست آمده از سال دوم ارزیابی زمان گلدهی با اندکی تفاوت نتایج حاصل از سال اول آزمایش را تایید کرد. تجزیه QTL برای صفت کمی زمان گلدهی در جمعیت مورد بررسی در سال دوم آزمایش مشابه سال اول آزمایش یک QTL با فاصله ۲۴ سانتی مورگان از مکان BPPCT002 و با LOD برابر ۲/۶ (سال اول این مقدار ۲/۵ بود) روی گروه لینکاژی شماره یک، شناسایی کرد (شکل ۷). همچنین مشابه نتایج سال اول آزمایش، روی گروه لینکاژی شماره ۲ مکان ژنی با LOD مساوی یا بیشتر از ۲ شناسایی نشد. با توجه به

مکان ریزماهواره CPPCT008 در گروه ۶ لینکاژی و با صفر سانتی مورگان از مبدا (در اول گروه لینکاژی و نقطه صفر) قرار گرفت (شکل ۸).

با تعداد بیشتر نشانگر اشباع شده بود به کار برد شد که پس از آنالیز داده‌ها و تهیه نقشه ژنتیکی مکان ریزماهواره EPPCU2584 در گروه ۵ لینکاژی با فاصله ۳۷ سانتی مورگان از مبدا و



شکل ۸- موقعیت دو مکان ریز ماهواره CPPCT008 و EPPCU2584 (بولد شده) به همراه سایر مکان‌های ریزماهواره در هشت گروه لینکاژی نقشه ژنتیکی بادام تهیه شده توسط

Sanchez-Perez *et al.* (2007)

Fig. 8. Approximate location of SSR markers assayed in the eight linkage groups described in almond according to Sánchez-Pérez *et al.* (2007)

در نقشه می‌تواند اطلاعات مفید پیوستگی بین این نشانگرهای SSR و زمان گلدهی را ارائه دهد. با توجه به پیوستگی کامل (فاصله صفر سانتی مورگان) مکان UDP97403 با یکی از مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات عرض خشک میوه، ضخامت خشک میوه و عرض مغز و فاصله نزدیک (۲ سانتی مورگان) مکان BPPCT007 با یکی از مکان‌های ژنی کنترل کننده صفت عرض مغز، می‌توان از این مکان‌ها جهت انتخاب به کمک نشانگر (MAS) برای ارقام، ژنوتیپ‌ها و نتاج برتر از نظر صفات خشک میوه و مغز استفاده کرد. نشانگرهای

ارتباط معنی‌دار بین نشانگر SSR و زمان گلدهی می‌تواند به وسیله بررسی ژنوتیپی شاهرود ۱۲ و تونو ثابت شود. لذا، نشانگرهای شاخص SSR می‌توانند تبدیل به STS (Sequence Tagged Sites) شده و در انتخاب به کمک نشانگر (MAS) برای دیر گلدهی مورد استفاده قرار بگیرند. جهت درک بهتر اساس ژنتیکی زمان گلدهی، نشانگرهای SSR (CPPCT008 و EPPCU2584) شناسایی شده در این تحقیق می‌توانند در نقشه ژنتیکی بادام و نقشه مرجع جنس پرونوس مورد استفاده قرار گرفته و بررسی شوند. تلفیق این نشانگرها

است، لذا انتخاب ژنوتیپ‌های دیر گل با استفاده از نشانگرهای پیوسته با زمان گلدهی می‌تواند خسارت ناشی از دماهای پایین و سرمازدگی دیررس بهاره را کاهش دهد. مکان‌های ریز ماهواره شناسایی شده در این مطالعه دارای اهمیت زیادی هستند چرا که استفاده از این نشانگرها در انتخاب غیر مستقیم زود هنگام ژنوتیپ‌های مطلوب از نظر زمان گلدهی موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه‌ها نیز می‌شود.

کاندید پیوسته با صفات زمان گلدهی، عرض خشک میوه، ضخامت خشک میوه و عرض مغز می‌توانند به نقشه مرجع موجود *Prunus الحاق* شده و منجر به جداسازی ژن‌های مربوط به صفات ذکر شده شوند. از دیدگاه به‌نژادی، موجود بودن نشانگرهای پیوسته شاخص و موثر با زمان گلدهی مانند CPPCT008 و EPPCU2584 دارای ارزش بسیار زیادی است، چرا که خسارات ناشی از دمای پایین به جوانه‌های گل و گل‌ها در بادام به عنوان یک عامل متداول در کاهش محصول در این گیاه

## References

- Albuquerque, N., García-Montiel, F., Carrillo, A., and Burgos, L. 2008. Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environmental and Experimental Botany* 64: 162-170.
- Anderson, J. L., and Seeley, S. D. 1993. Bloom delay in deciduous fruits. *Horticultural Reviews* 15: 97-144.
- Aranzana, M.J, Cosson, P., Dirlewanger, E., Ascasibar, J., Cipriani, G., Arús, P., Testolin, R., Abbott, A., King, G. J., and Iezzoni, A. F. 2003. A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 819-825.
- Arús, P., and Moreno-González, J. 1993. Marker-assisted selection. pp. 314-331. In: Hayward, M. D., Bosemark, N. O., and Romagosa, I. (eds.) *Plant Breeding. Principles and Prospects*. Chapman and Hall, London, UK.
- Baird, W. V., Ballard, R. E., Rajapakse, S., and Abbott, A. G. 1996. Progress in *Prunus* mapping and application of molecular markers to germplasm improvement. *HortScience* 31: 1099-1106.
- Ballester, J. R., Company, S. I., Arus, P., and Vicente, M. C. 2001. Genetic mapping

- of a major gene delaying blooming time in almond. *Plant Breeding* 120: 268-270.
- Campoy, J. A., Martínez-Gómez, P., Ruiz, D., Rees, J., and Celton, J. M. 2010a.** Inheritance of flowering time in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and analysis of linked quantitative trait loci (QTLs) using simple sequence repeat (SSR) Markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 28: 24-29.
- Campoy, J. A., Martínez-Gómez, P., Ruiz, D., Rees, J., and Celton, J. M. 2010b.** Developing microsatellite multiplex and megaplex PCR systems for high throughput characterization of breeding progenies and linkage maps spanning the apricot genome. *Plant Molecular Biology Reporter* 28: 560-568.
- Canli, F. A. 2004.** A modified segregant analysis for late blooming in sour cherry. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7: 1684-1688.
- Cipriani, G., Lot, G., Huang, W. G., Marrazzo, M. T., Peterlunger, E., and Testolin, R. 1999.** AC/GT and AG/CT microsatellites repeats in peach (*Prunus persica* L. Batsch): isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 713-722.
- Dicenta, F., Garcia, J. E., and Carbonell, E. 1993.** Heritability of flowering, productivity and maturity in almond. *Journal of Horticultural Science* 68: 113-120.
- Dirlewanger, E., Crosson, A., Tavaud, P., Aranzana, M. J., Poizat, C., Zanetto, A., Arús, P., and Laigret, L. 2002.** Development of microsatellite markers in peach and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 127-138.
- Dirlewanger, E., Graziano, E., Joobeur, T., Garriga-Caldre, F., Cosson, P., Howad, W., and Arús, P. 2004.** Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101: 9891-9896.
- Dong, N. V., Subudhi, P. K., Luong, P. N., Quang, V. D., Quy, T. D., Zheng, H. G., Wang, B., and Nguyen, H. T. 2000.** Molecular mapping of a rice gene conditioning thermosensitive genetic male sterility using AFLP, RFLP and SSR techniques. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 727-734.
- Downey, L. D., and Iezzoni, A. F. 2000.** Polymorphic DNA markers in cherry, peach, sour cherry and black cherry are identified using sequences from sweet *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125: 76-80.



- Doyle, J. J., and Doyle, J. P. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissues. *Phytochemical Bulletin* 9: 11-15.
- Gulcan, R. 1985.** Descriptor List for Almond (*Prunus amygdalus*), Revised. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Rome, Italy.
- Kester, D. E. 1965.** Inheritance of time of bloom in certain progenies of almond. *The American Society for Horticultural Science* 87: 214–221.
- Kester, D. E., and Gradziel, T. M. 1996.** Almonds. pp. 1-97. In: Janick, J., and Moore, J. N. (eds.) *Fruit Breeding. Vol. 3, Nuts.* John Wiley and Sons, New York, USA.
- Lander, E. S., and Botstein, D. 1989.** Mapping Mendelian factor underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M. J., Lincoln, S. E., and Newburg, L. 1987.** MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174–181.
- Luby, J. J., and Shaw, D. V. 2001.** Does marker-assisted selection make dollars and sense in a fruit breeding program? *HortScience* 36: 872–879.
- Michelmore, R., Paran, W. I., and Kesseli, R. V. 1991.** Identification of markers linked to disease-resistance gene by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 88: 9828-9832.
- Mnejia, M., Garcia-Mas, J., Howard, W., and Arus, P. 2005.** Development and transportability across *Prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. *Molecular Ecology Notes* 5: 531-535.
- Murray, M., and Thompson, W. F. 1980.** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
- Ohta, S., Katsuki, T., Tanaka, T., Hayashi, T., Sato, Y. L., and Yamamoto, T. 2005.** Genetic variation in flowering cherries (*Prunus* subgenus *Cerasus*) characterized by SSR markers. *Breeding Science* 55: 415-424.
- Sanchez-Perez, R., Dicenta, F., Gradziel, T. M., Arús, P., and Martinez-Gomez, P. 2004.** Application of molecular markers in almond breeding programmes. *Nucis-Newsletter* 12: 9-12.

- Sánchez-Pérez, R., Howad, W., Dicenta, F., Arús, P., and Martínez-Gómez, P. 2007.** Mapping major genes and quantitative trait loci control-ing agronomic traits in almond. *Plant Breeding* 126: 310-318.
- Sonneveld, T., Robbins, T. P., Boskovic, R., and Tobutt, K. R. 2001.** Cloning of sex cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 1049-1055.
- Sosinski, B., Gannavarapu, M., Hager, L. E., Beck, L. E., King, G. J., Ryder C. D., Rajapakse, S., Baird, W. V., Ballard, R. E., and Abbott, A. G. 2000.** Characterization of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* L. Basch). *Theoretical and Applied Genetics* 101: 421-428.
- Testolin, R., Marrazzo, T., Cipriani, G., Quarta, R., Verde, I., Dettori, M. T., Pancaldi, M., and Sansavini, S. 2000.** Microsatellite DNA in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* 43: 512-520.
- Testolin, R., Messina, R., Lain, O., Marrazzo, T., Huang, G., and Cipriani, G. 2004.** Microsatellites isolated in almond from an AC-repeat enriched library. *Molecular Ecology Notes* 4: 459-461.
- van Ooijen, J. W., and Voorrips, R. E. 2001.** JoinMap 3.0, software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Research International B\_V*, Wageningen, The Netherlands.
- Warburton, M. L., Becerra-Velásquez, V. L., Goffreda, J. C., and Bliss, F. A. 1996.** Utility of RAPD markers in identifying genetic linkages to genes of economic interest in peach. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 920-925.
- Yamamoto, T., Mochida, K., Imai, T., Shi, Y. Z., Ogiwara, I., and Hayashi, T. 2002.** Microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] derived from an enriched genomic and cDNA libraries. *Molecular Ecology Notes* 2: 298-301.