

## شناسایی نشانگر(های) RAPD پیوسته به ژن(های) کنترل کننده زمان گلدهی در جمعیت F<sub>1</sub> بادام حاصل از تلاقی کنترل شده (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲

### Identification of RAPD Marker(s) Linked to the Gene (s) Controlling Flowering Time in F<sub>1</sub> Almond Population from Controlled Crosses of 'Tuono' (♂) × 'Shahrood-12' (♀)

موسی رسولی<sup>۱\*</sup>، محمدرضا فتاحی مقدم<sup>۲</sup>، ذبیح‌الله زمانی<sup>۳</sup>، علی ایمانی<sup>۴</sup> و علی عبادی<sup>۵</sup>

تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۹/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۹

#### چکیده

در این تحقیق زمان گلدهی و برخی صفات مورفولوژیکی به مدت دو سال در جمعیت F<sub>1</sub> شامل ۷۲ نتاج حاصل از تلاقی رقم‌های 'تونو' (میان گل) و 'شاهرود ۱۲' دیرگل مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق برای شناسایی نشانگرهای همبسته با ژن زمان گلدهی، از روش تجزیه تفرق توده‌ای با استفاده از ۱۵۰ آغازگر RAPD در توده انتخاب شده و نهایتاً کل جمعیت مورد بررسی، استفاده شد. نتایج تأیید کرد که توارث زمان گلدهی در نتاج ارزیابی شده به صورت کمی می‌باشد. زمان گلدهی در نتایج محدوده وسیعی را نسبت به والدین نشان دادند، هرچند که برخی از نتاج زودتر از والد میان گل 'تونو' به گل رفتند. نتایج نشان داد که نشانگرهای BA-17<sub>600</sub>، BC-05<sub>320</sub>، BC-06<sub>800</sub>، BC-14<sub>1750</sub>، BC-17<sub>600</sub>، BC-20<sub>250</sub>، OPC-05<sub>850</sub> و OPC-09<sub>700,1100</sub> با دیرگلدهی و BA-04<sub>720</sub>، BB-10<sub>630</sub>، BC-09<sub>2000</sub>، BD-12<sub>510</sub> و OPC-12<sub>350</sub> با زودگلدهی در ارتباط بودند. پس از تهیه نقشه ژنتیکی جمعیت مورد بررسی، تجزیه QTL برای زمان گلدهی انجام شد. نتایج نشان داد که آغازگر BA-17 به میزان ۴ سانتی‌مورگان با یکی از مکان‌های ژنی کنترل کننده دیرگلدهی فاصله دارد. همچنین آغازگرهای OPC-09 و BA-04 به ترتیب در فاصله ۲ و ۳ سانتی‌مورگان از یکی از ژن‌های کنترل کننده دیرگلدهی و زودگلدهی قرار گرفتند. نشانگرهای ژنتیکی پیوسته با زمان گلدهی در بادام بسیار مهم می‌باشد چرا که استفاده از این نشانگرها در جهت انتخاب مستقیم برای شناسایی واریته‌های مناسب از نظر زمان گلدهی از بین ژنوتیپ‌های زودگل موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه می‌گردد.

**واژه‌های کلیدی:** بادام، زمان گلدهی، تجزیه تفرق توده‌ای، نقشه ژنتیکی، QTL، انتخاب به کمک نشانگر همراه

۱. استادیار گروه علوم باغبانی و فضای سبز دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر، ملایر  
۲. دانشیار گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج  
۳. استادان گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج  
۴. دانشیار بخش باغبانی، موسسه اصلاح، تهیه نهال و بذر کرج  
\*: نویسنده مسوول  
Email: m.rasouli@malayeru.ac.ir

زمان گلدهی یک صفت مهم در درختان میوه است که جهت گرده‌افشانی موفق نیازمند به همزمانی گلدهی هستند و شرایط محیطی در طول فصل گلدهی روی این موضع تأثیرگذار می‌باشد. بارندگی در زمان گلدهی و گرده‌افشانی و همچنین سرمازدگی بهاره به میزان قابل توجه‌ای محصول را کاهش داده و حتی برخی از مواقع کل محصول را از بین می‌برند. به همین دلیل، دیرگلدهی می‌تواند یکی از اهداف اصلی برنامه‌های اصلاحی در بادام باشد تا گلدهی زمانی اتفاق بیفتد که خطر سرمازدگی بهاره بسیار کم و یا اصلاً وجود نداشته باشد، کستر و گرادزیل (Kester and Gradziel, 1996). زمان گلدهی به-دمای زمستان، میزان سرمای لازم برای شکستن خواب جوانه‌ها و نیاز گرمایی وابسته است، تابونکا و همکاران، لندر و بوتیستین (Tabuenca et al., 1972; Lander and Botstein, 1989). زمان گلدهی در اکثر گونه‌های گیاهی، به خصوص در گونه‌های جنس پرونوس یک صفت کمی می‌باشد، آندرسون و سیلی (Anderson and Seeley, 1993). اکثر نتایج در مورد نحوه‌ی توارث زمان گلدهی در بادام نشان‌دهنده‌ی توارث کمی این صفت در بادام می‌باشد، کستر (Kester, 1965) که با دامنه‌ی وراثت‌پذیری بین ۰/۶۷ تا ۰/۸، دیسنتا و گارسیا (Dicenta and Garcia, 1993) متفاوت است. توسعه ارقام دیرگل جدید با استفاده از روش‌های اصلاحی کلاسیک و مولکولی می‌تواند از سرمازدگی بهاره و کاهش محصول جلوگیری کند. از جمله روش‌های مولکولی به اصلاحی می‌توان استفاده از نشانگرهای مولکولی به منظور یافتن نشانگرهای پیوسته با زمان گلدهی اشاره کرد.

نشانگرهای مبتنی بر DNA ابزاری ضروری در بررسی ژنتیکی گیاهان با ارزش خاص در ایجاد نقشه ژنتیکی و انتخاب به کمک نشانگر می‌باشند. نشانگرهای ژنتیکی پیوسته با QTLs (Quantitative Traits Loci) شاید قادر به انتخاب غیرمستقیم صفات پیچیده باشند. نشانگرهای مولکولی به‌طور موفق‌آمیزی در مکان‌یابی صفات خاص ژنتیکی و یا صفات پیچیده که توسط تعداد زیادی مکان ژنی کنترل می‌شوند استفاده شده است، کامپوی و همکاران (Campoy et al., 2010). ره‌یافت معمول برای بررسی و مطالعه همبستگی نشانگر صفت استفاده از بررسی مورفولوژیکی و مولکولی جمعیت در حال تفرق برای یک صفت خاص موردنظر می‌باشد. آنالیز تفرق بین نشانگر و صفات اجازه مطالعه مکان ژن‌های اصلی و QTLs مسئول بروز صفات خاص را فراهم می‌کند (کامپوی و همکاران، 2010).

تجزیه تفرق توده (B.S.A) (Bulk segregant analysis)، میشل‌مور و همکاران (Michelmore et al., 1991) و یا انتخاب براساس ژنوتیپ (لندر و بوتیستین، 1989)، جهت شناسایی نشانگرهای وابسته به جایگاه ژنی صفات کمی (QTL) هدف مورد استفاده قرار می‌گیرد. از دیدگاه اصلاحی، موجود بودن نشانگرهای پیوسته شاخص و مؤثر با زمان گلدهی دارای ارزش بسیار زیادی می‌باشد، چرا که خسارات ناشی از دمای پایین به جوانه‌های گل و گل‌ها در بادام به‌عنوان یک عامل متداول در کاهش محصول در این گیاه می‌باشد. لذا انتخاب ژنوتیپ‌های دیرگل می‌تواند خسارت ناشی از دماهای پایین و سرمازدگی دیررس بهاره را کاهش دهد. نشانگرهای ژنتیکی به‌دست آمده در این مطالعه دارای اهمیت زیادی هستند چرا که استفاده از این نشانگرها در انتخاب غیرمستقیم زود هنگام ژنوتیپ‌های مطلوب از نظر زمان گلدهی موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه‌ها می‌گردد. این نشانگرهای کاندید همچنین می‌توانند به نقشه مرجع موجود *Prunus* الحاق شده و منجر به جداسازی ژن‌های مربوط به زمان گلدهی شوند.

بلاستر و همکاران (Ballester et al., 2001) اساس ژنتیکی دیرگلدهی را در بادام مورد مطالعه قرار دادند. تجزیه تفرق توده در جمعیت F1 با استفاده از نشانگرهای RAPD مرتبط با ژن دیرگلدهی که در گروه شماره ۴ لینکاژی قرار گرفته بود مورد استفاده قرار گرفت. آنها موفق به شناسایی سه نشانگر RPAD همبسته با ژن دیرگلدهی شدند. یکی از آنها (OKP101350) در فاصله ۵/۴ سانتی‌مورگان از ژن دیرگلدهی قرار داشت. گیاهانی که دارای آلل دیرگلدهی بودند حدود دو هفته دیرتر گل دادند و این آلل به‌صورت غالب عمل می‌نمود (بلاستر و همکاران، 2001).

کانلی (Canli, 2004) با استفاده از یک روش تجزیه تفرق توده تغییر یافته (MBSA) (Modified Bulk Segregant Analysis) همراه با روش قطعات برشی تکثیر یافته چند شکل (AFLP) جهت شناسایی نشانگرهای پیوسته با زمان گلدهی در جمعیت آلبالو (*Prunus cerasus* L., 2n=4x=32) حاصل از تلاقی بین دو رقم 'بالاتون' و 'سورفایر' استفاده کرد. غربال گروه‌های خیلی زودگل و خیلی دیرگل با ۹۴ جفت آغازگر AFLP، دو باند کاندید در دو آغازگر مختلف را شناسایی کرد (یک قطعه ۷۸ جفت‌باز در آغازگر ترکیب ETT/MCCG و یک قطعه ۹۲ جفت‌باز در ترکیب جفت آغازگر EAA/MCCG). نتایج کانلی (2004) نشان داد که باندهای کاندید در گروه دیرگل وجود داشتند اما در گروه زودگل وجود نداشتند.

شد. کددهی زمان گلدهی براساس توصیف نامه بادام، گلکان (Gulcan, 1985) انجام شد.

#### انتخاب توده‌های فنوتیپی

دو گروه شامل گروه خیلی زودگل و گروه خیلی دیرگل که هر گروه شامل ۴ دانهال بودند همراه با والد مادری (شاهرود ۱۲) و والد پدری (تونو) انتخاب شدند. چهار نتاج ۱۹، ۳۰، ۳۱ و ۷۸ به‌عنوان زودگل‌ترین و چهار نتایج شامل ۷، ۱۱، ۱۷ و ۲۷ به‌عنوان دیرگل‌ترین گروه‌های فنوتیپی انتخاب شدند.

#### استخراج DNA

برگ‌های جوان و نمو یافته در اردیبهشت ماه از تمام دانهال-های جمعیت تهیه و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. روش موری و تامسون (Murray and Thompson, 1980) تغییر یافته و دویلی و دویلی (Doyle and Doyle, 1987) تغییر یافته توسط اسنولد و همکاران (Sonnevld et al., 2001) برای استخراج DNA ژنومی به‌کار گرفته شد. تغییرات صورت گرفته در روش موری و تامسون شامل: اضافه نمودن ۲ گرم پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP40) در ۱۰۰ سی‌سی بافر استخراج، استفاده از محلول سدیم‌دودسیل‌سولفات ۱۰ درصد (SDS) به‌میزان ۱۰ سی‌سی پس از اضافه نمودن بافر استخراج به هر نمونه، اضافه نمودن استات‌پتاسیم نیم مولار به‌میزان ۱۰ سی‌سی و قراردادن نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قبل از استفاده از کلروفرم-ایزوامیل‌الکل و در نهایت قراردادن نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه پس از اضافه نمودن ایزوپروپانول خالص سرد بود. همچنین در این آزمایش استخراج DNA به روش دویلی و دویلی (1987) و بهینه‌شده توسط اسنولد و همکاران (2001) به‌صورت استخراج DNA در مقیاس کوچک (DNA Miniprep Exterction) جهت صرفه‌جویی در مواد مصرفی مورد استفاده قرار گرفت. در این روش از ساچمه‌های فلزی کوچک و شیکر برقی با سرعت زیاد جهت پودر نمودن نمونه‌ها استفاده گردید.

#### بررسی کمیت و کیفیت DNA

کمیت و کیفیت DNA به دو روش با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد و مقایسه با غلظت‌های مختلف ۸ DNA و با استفاده از دستگاه نانودراپ و ژل آگاروز ۱/۲ درصد، انجام شد.

کامپوی و همکاران (2010) زمان گلدهی را به‌مدت سه سال در نتاج حاصل از تلاقی برگشتی شامل ۷۳ دانهال زردآلوی به-دست آمده از تلاقی انتخابی F1، Z506-07 (اورنج رد × کورت) و رقم اسپانیایی کورت مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که بیان و توارث کمی زمان گلدهی در زردآلو تحت تأثیر نونهالی و شرایط محیطی (نیاز سرمایی و تجمع ساعات گرمایی) قرار می‌گیرد.

کامپوی و همکاران (2010) پس از تهیه نقشه ژنتیکی زردآلو با استفاده از ۴۶ نشانگر SSR زردآلو و 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 نمود. در نهایت این محققین دو مکان ریزماهواره UDAP-423r و AMPA-105 را شناسایی کردند که پیوستگی نزدیکی با صفت زمان گلدهی در زردآلو داشتند.

از آنجایی که زمان گلدهی در بادام یک صفت کمی می-باشد 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 نماید. هدف از این تحقیق ارزیابی افراد جمعیت به‌دست آمده از تلاقی دو رقم بادام 'شاهرود ۱۲' (به‌عنوان والد مادری) و 'تونو' (به‌عنوان والد پدری) از نظر صفت گلدهی و جستجو برای برخی از نشانگرهای کاندید پیوسته با زمان گلدهی با استفاده از روش تجزیه تفرق توده به‌وسیله نشانگر مولکولی RAPD در این جمعیت حاصل از تلاقی کنترل شده می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد گیاهی

۷۲ دانهال حاصل از تلاقی رقم 'شاهرود ۱۲' به‌عنوان والد مادری و رقم 'تونو' به‌عنوان والد پدری که در کلکسیون تحقیقاتی کمال‌آباد کرج وابسته به مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر وزارت جهاد کشاورزی کشت شده‌اند، در سنین شش، هفت و هشت سالگی بررسی شدند.

##### ثبت زمان گلدهی

زمان گلدهی برای ۷۲ نتاج حاصل از تلاقی برای دو سال متوالی (۱۳۸۸-۱۳۸۹) انجام شد. زمان گلدهی وقتی که تقریباً ۵۰ درصد گل‌ها باز شدند به‌صورت روز گلدهی یادداشت‌برداری

## استفاده از تجزیه تفرق توده تغییر یافته برای غربالگری

### نشانگر RAPD

روش تلفیق DNA پیشنهاد شده توسط میشل‌مور و همکاران (1991) و کانلی و همکاران (2004) تغییر یافته جهت پیداکردن نشانگرهای کاندید پیوسته با زمان گلدهی مورد استفاده قرار گرفت. تغییرات صورت گرفته 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 جهت اطمینان بیشتر از نتایج به دست آمده به چهار عدد افزایش یافت و در کنار آنها DNA والدین نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین پس از پیداکردن نشانگرهای کاندید، روی تمام نتایج حاصل از تلاقی همراه با والدین مورد آزمایش قرار گرفت.

### آغازگرهای مورد استفاده

در این تحقیق ۱۵۵ آغازگر ده نوکلئوتیدی سری تیب مول‌بیول (Tibmolbiol) و اپرون (Operon Technology) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). غلظت نهایی آغازگر در هر واکنش ۱۵ میکرولیتری PCR معادل  $0.2 \mu\text{M}$  در نظر گرفته شد و بدین ترتیب به هر واکنش، مقدار ۱ میکرولیتر از محلول آغازگر اضافه گردید.

### تنظیم شرایط PCR

محلول پایه شامل همه مواد مورد نیاز برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز همراه با نمونه DNA الگو تهیه گردید. برای انجام آزمایش از کیت PCR محصول شرکت Ampliqon (دانمارک) و شرکت سیناژن ایران استفاده شد. کلیه وسایل و لوله‌های PCR به کار برده شده قبل از استفاده استریل شدند. برای هر مخلوط واکنش، مقدار ۲ میکرولیتر از DNA تهیه شده با غلظت  $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  به  $13 \mu\text{l}$  میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل  $5 \mu\text{l}$  کیت (dNTPs, PCR buffer, Taq DNA Polymerase,  $\text{MgCl}_2$ )،  $1 \mu\text{l}$  آغازگر با غلظت  $10 \mu\text{M}$  و آب مقطر  $4.5 \mu\text{l}$  دوبار تقطیر استریل اضافه گردید که در نهایت حجم محلول واکنش PCR به  $15 \mu\text{l}$  رسید. سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad مدل i-Cycler انجام شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز سیکل‌های حرارتی به شرح جدول‌های ۲ و ۳ استفاده شد.

## الکتروفورز محصول PCR

پس از انجام واکنش PCR به محتویات واکنش هر لوله مقدار ۵ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه و مخلوط حاصل در چاهک‌های ژل آگاروز  $1/1$  درصد تا  $1/6$  درصد (بسته به تعداد مکان‌های مورد هدف هر آغازگر) در بافر (TBE) Tris Boric Acid (EDTA) ریخته شد. الکتروفورز نمونه‌ها به مدت  $2/5$  ساعت با جریان  $75$  ولت صورت گرفت. پس از این مرحله ژل به مدت  $30$  دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید  $0.5$  میکروگرم در لیتر رنگ‌آمیزی شد و پس از  $7$  تا  $10$  دقیقه شستشو در آب مقطر، قطعات تکثیر یافته DNA تحت نور UV توسط دستگاه ژل داگ مشاهده شده و عکس برداری از ژل صورت گرفت. برای تخمین طول قطعات تکثیر شده از سایز مارکر SM0313 Fermentas که دارای قطعات  $100 \text{ bp}$  بود استفاده 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 تست گردید. سپس آغازگرها و مکان‌هایی که بین دو والد و دو توده چندشکلی نشان دادند انتخاب شده و سپس کل جمعیت با استفاده از آنها مورد ارزیابی ژنتیکی قرار گرفت. تعداد آغازگرهای انتخاب شده شامل ۱۱ آغازگر RAPD و ۳۳ مکان ریزماهوره بود که در مجموع ۱۴۴ باند حاصل از ۴۴ نشانگر جهت تهیه نقشه ژنتیکی رتبه‌بندی گردید.

### روش‌های آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از ثبت زمان گلدهی فراوانی زمان گلدهی در نتایج مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار اکسل 2010 محاسبه گردید. همچنین پس از انجام آزمایش RAPD نشانگرهایی که در بین والدین و دو گروه زودگل و دیرگل چند شکلی نشان دادند، انتخاب شدند. مواردی که در گروه زودگل دارای باند بودند اما در گروه دیرگل فاقد باند بودند و یا حالت برعکس انتخاب شدند. نقشه ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزارهای Mapmaker و JoinMap3.0 با استفاده از تابع کوزامبی تهیه شد، ون/ویجن و وریپس (Van Ooijen and Voorrips, 2001). همچنین برای مکان‌یابی صفت زمان گلدهی در جمعیت مورد مطالعه از نرم‌افزار QTL Cartographer V1.30 (2001) استفاده گردید.

جدول ۱: اسامی سری آغازگرهای مورد استفاده در آنالیز RAPD

Table 1: Primers used in RAPD analysis

ردیف	سری آغازگر	تعداد آغازگر بررسی شده
Row	Primers	Primers used
1	BA-(01-20)	20
2	BB-(01-20)	20
3	BC-(01-20)	20
4	BD-(01-20)	20
5	BE-(01-20)	20
6	BF-(01-20)	7
7	OPA-(01-20)	5
8	OPAB-(01-20)	1
9	OPB-(01-20)	8
10	OPC-(01-20)	5
11	OPD-(01-20)	2
12	OPE-(01-20)	2
13	OPG-(01-20)	6
14	OPI-(01-20)	2
15	OPK-(01-20)	3
16	OPN-(01-20)	2
17	OPR-(01-20)	4
18	OPW-(01-20)	3
19	OPX-(01-20)	2
20	OPY-(01-20)	2
21	OPZ-(01-20)	1

جدول ۲: زمان و دمای لازم برای سه مرحله (بازشدن، اتصال و بسط) در هر یک از مراحل نشانگر RAPD

Table 2: PCR condition used for RAPD marker

مرحله	مرحله انجام شده	تعداد سیکل (تکرار)	زمان (دقیقه یا ثانیه)	درجه حرارت
Stage	Stages	Cycle	Time	Temperature
1	شروع بازشدن رشته DNA	1	3'	94°C
2	تکرشته‌ای شدن DNA	-	1'	92°C
	اتصال آغازگر به DNA	5	1'	39°C
3	بسط آغازگر	-	1'	72°C
	تکرشته‌ای شدن DNA	-	30"	92°C
	اتصال آغازگر به DNA	30	45"	37°C
4	بسط آغازگر	-	1'	72°C
	تکمیل بسط	1	7	72°C

جدول ۳: چرخه‌ی دمایی تغییریافته برای سه مرحله (بازشدن، اتصال و بسط) در هر یک از مراحل نشانگر RAPD

Table 3: Modified PCR condition used for RAPD marker

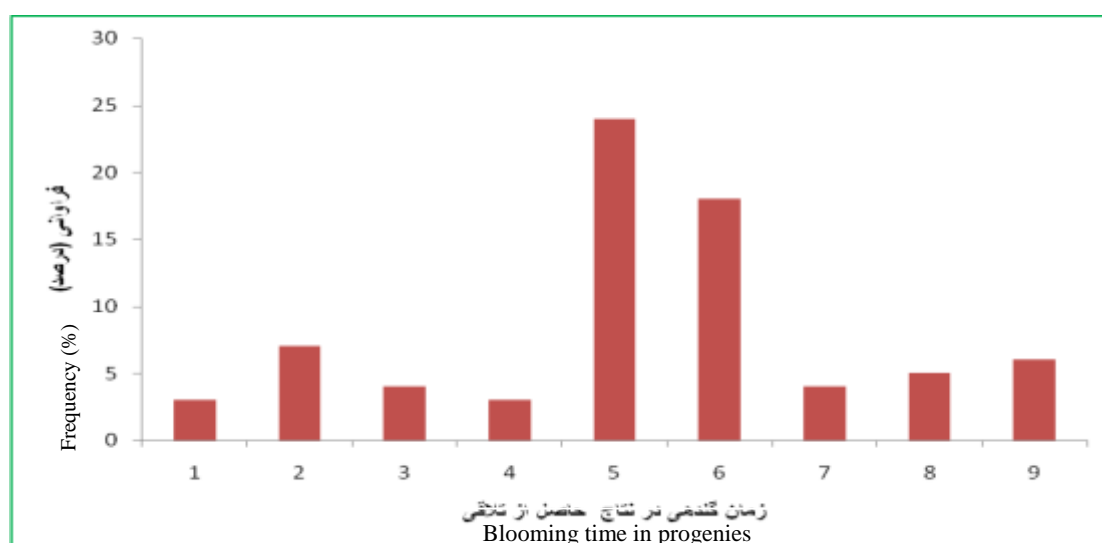
مرحله	مرحله انجام شده	تعداد سیکل (تکرار)	زمان (دقیقه یا ثانیه)	درجه حرارت
Stage	Stages	Cycle	Time	Temperature
1	شروع بازشدن رشته DNA	1	3'	92°C
	تکرشته‌ای شدن DNA	-	1'	92°C
2	اتصال آغازگر به DNA	5	1'	40°C با کاهش 0.5 درجه‌ای در هر سیکل (Touch down)
	بسط آغازگر	-	1'	72°C
	تکرشته‌ای شدن DNA	-	30"	92°C
3	اتصال آغازگر به DNA	30	45"	37.5°C
	بسط آغازگر	-	1 25"	72°C
4	تکمیل بسط	1	7'	72°C

## نتایج و بحث

### ارزیابی زمان گلدهی

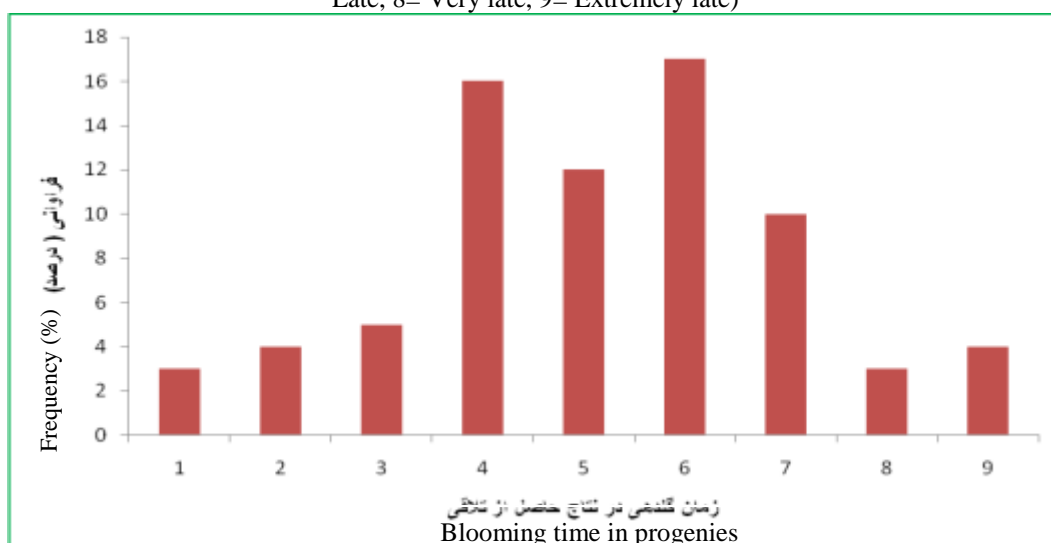
زمان گلدهی برای جمعیت حاصل از تلاقی به‌طور پیوسته و دارای تغییر نسبی در هر دو سال بوده که نشان‌دهنده توارث کمی این صفت می‌باشد (شکل‌های ۱ و ۲). توزیع زمان گلدهی در نتاج حاصل از تلاقی در هر دو سال نرمال بود (شکل‌های ۱ و ۲). نبود توزیع بیومدل پیشنهاد می‌کند که یک ژن غالب برای کنترل زمان گلدهی در جمعیت حاصل از تلاقی وجود ندارد. توزیع بیومدل به این صورت می‌باشد که دو پیک در یک توزیع دیده می‌شود و در حقیقت تکرار توزیع

نرمال می‌باشد. در مقابل توزیع زمان گلدهی در بادام رقم تاردی نان پاریل یک توزیع بیومدل را نشان داد که در نتیجه حضور یک ژن گلدهی غالب دیرگلدهی در این رقم بادام بوده و دارای عادت گلدهی متفاوت نسبت به سایر ارقام بادام می‌باشد (بلاستر و همکاران، 2001). 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 به‌صورت زود گلدهی در برخی نتاج نسبت به والد میان گل 'تونو' مشاهده گردید (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱: نمودار فراوانی زمان گلدهی در نتاج حاصل از تلاقی (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲ در سال اول آزمایش (۱ = بیش از حد زودگل، ۲ = خیلی زودگل، ۳ = زودگل، ۴ = زود تا متوسط گل، ۵ = متوسط گل، ۶ = متوسط تا دیرگل، ۷ = دیرگل، ۸ = خیلی دیرگل، ۹ = بیش از حد دیرگل)

Fig. 1: Frequency of flowering time in in progenies 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)



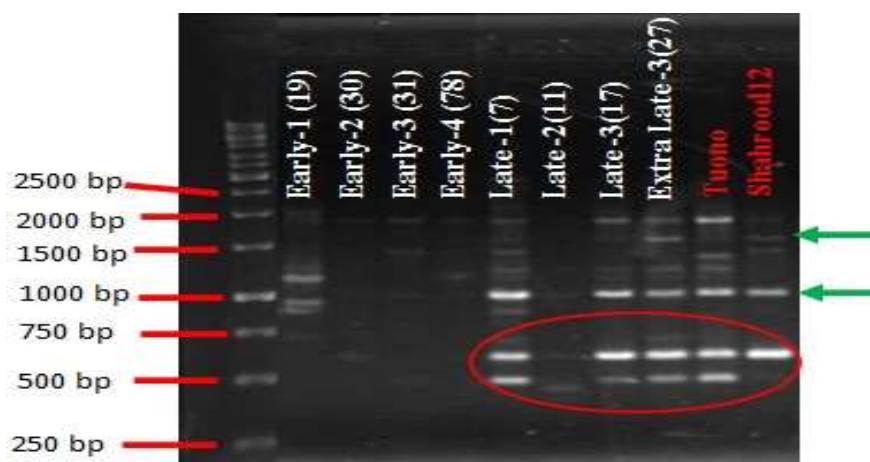
شکل ۲: نمودار فراوانی زمان گلدهی در نتاج حاصل از تلاقی (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲ در سال دوم آزمایش (۱= بیش از حد زودگل، ۲= خیلی زودگل، ۳= زودگل، ۴= زود تا متوسط گل، ۵= متوسط گل، ۶= متوسط تا دیرگل، ۷= دیرگل، ۸= خیلی دیرگل، ۹= بیش از حد دیرگل)

Fig. 2: Frequency of flowering time in in progenies 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)

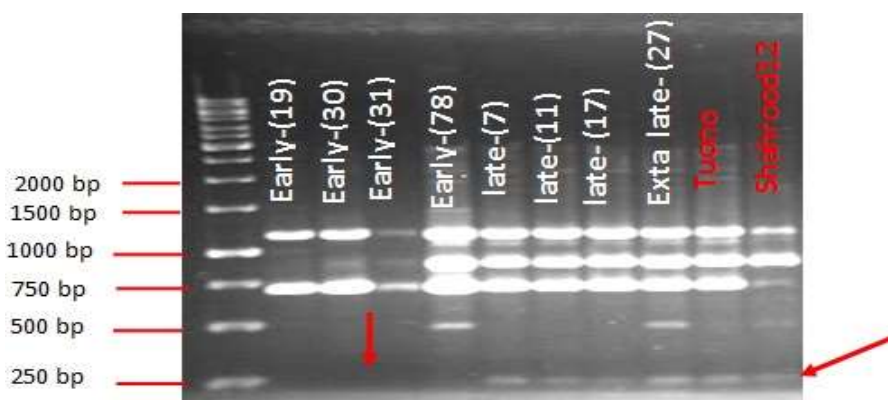
این باند را نشان ندادند (شکل ۴). آغازگر BC-05 نیز باندی با اندازه تقریبی ۳۲۰ bp را در سه نتاج توده دیرگل تکثیر نمود که توده زودگل در این محدود فاقد هرگونه باندی بودند (شکل ۵). آغازگر OPC-09 باندهای کاندید پیوسته با زمان دیرگلدهی تکثیر یافته به اندازه ۷۰۰bp و ۱۱۰۰bp را ایجاد کرد که در برخی از نتاج توده دیرگل و تود زودگل این حالت دید نشد (شکل ۶). آغازگر BB-10 باندی با اندازه تقریبی ۶۳۰ bp را در توده زودگل تکثیر نمود که توده دیرگل در این محدود فاقد هر گونه باندی بود اگرچه والد دیرگل نیز این باند را نشان داد (شکل ۷). همچنین آغازگر BC-09 باند کاندید پیوسته با زمان زودگلدهی در توده زودگل و والدین به اندازه تقریبی ۲۰۰۰bp تکثیر نمود که توده دیرگل فاقد این باند بود (شکل ۸).

#### نشانهگر(های) کاندید پیوسته به ژن(های) کنترل کننده زمان گلدهی

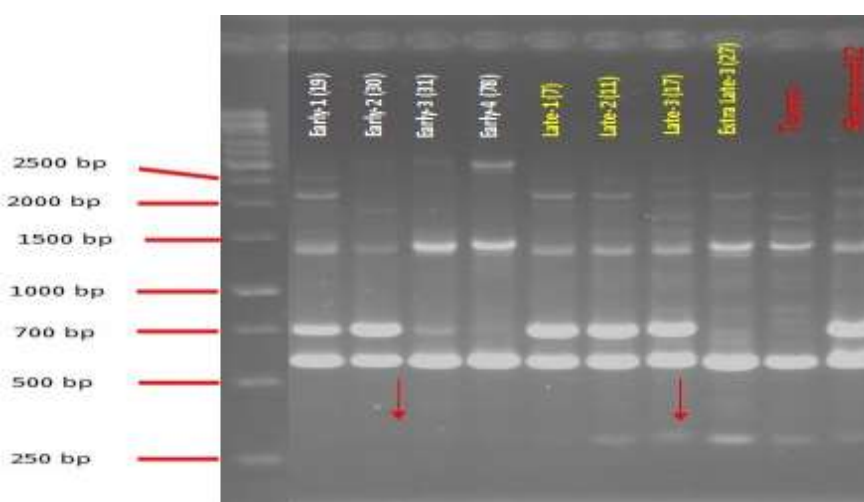
براساس نتایج به دست آمده، از بین ۱۵۵ آغازگر RAPD، هفت آغازگر پیوسته با دیرگلدهی در جمعیت حاصل از تلاقی (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲ شناسایی گردید. همچنین سه آغازگر RAPD پیوسته با زودگلدهی نیز در جمعیت مورد بررسی مشاهده شد. اسامی و توالی آغازگرهای RAPD پیوسته به ژن (های) کنترل کننده زمان گلدهی در جدول شماره ۴ ذکر شده است. برای مثال، آغازگر BA-17 یک باند تکثیر یافته به اندازه ۶۰۰ bp را در نتاج گروه دیرگل و والدین نشان داد که به جزء یکی از نتاج گروه زودگل، بقیه فاقد این باند بودند (شکل ۳). همچنین آغازگر BC-20 یک باند تکثیر یافته به اندازه ۲۵۰bp را در نتاج گروه دیرگل و والدین نشان داد که نتاج گروه زودگل



شکل ۳: باند کاندید احتمالاً پیوسته با زمان دیرگلدهی تکثیر یافته به اندازه ۶۰۰ bp با استفاده از آغازگر BA-17  
 Fig. 3: Candidate band presumably linked to late flowering time in almond using BA-17<sub>600,1000</sub>

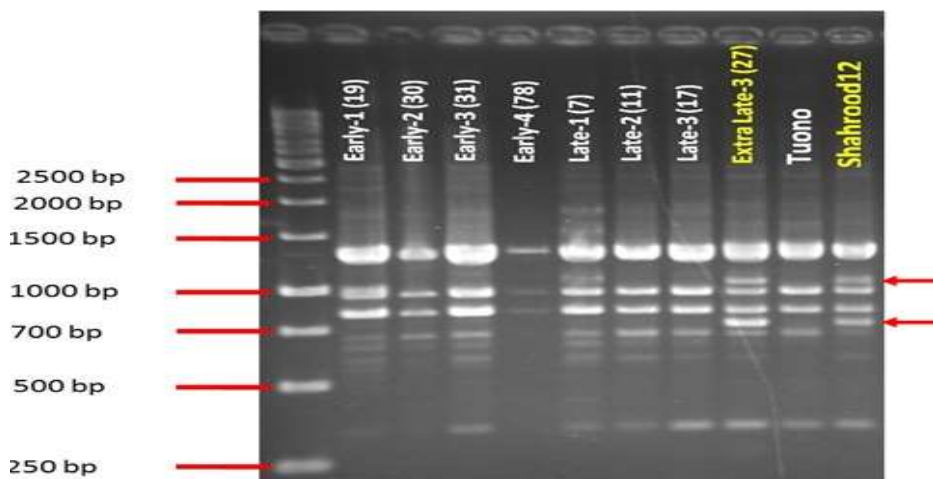


شکل ۴: باند کاندید احتمالاً پیوسته با زمان دیرگلدهی تکثیر یافته به اندازه ۲۵۰ bp با استفاده از آغازگر BC-20  
 Fig. 4: Candidate band presumably to late flowering time in almond using BC-20<sub>250</sub>

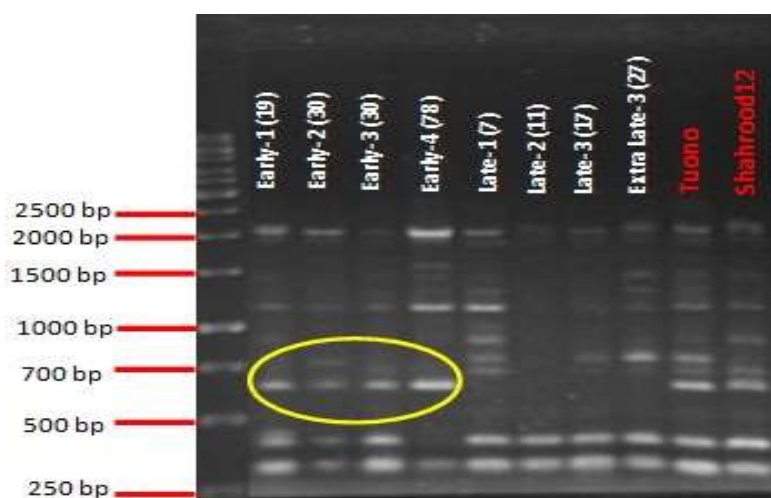


شکل ۵: باند کاندید احتمالاً پیوسته با زمان دیرگلدهی تکثیر یافته به اندازه ۳۲۰ bp با استفاده از آغازگر BC-05  
 Fig. 5: Candidate band presumably to late flowering time in almond using BC-05<sub>320</sub>

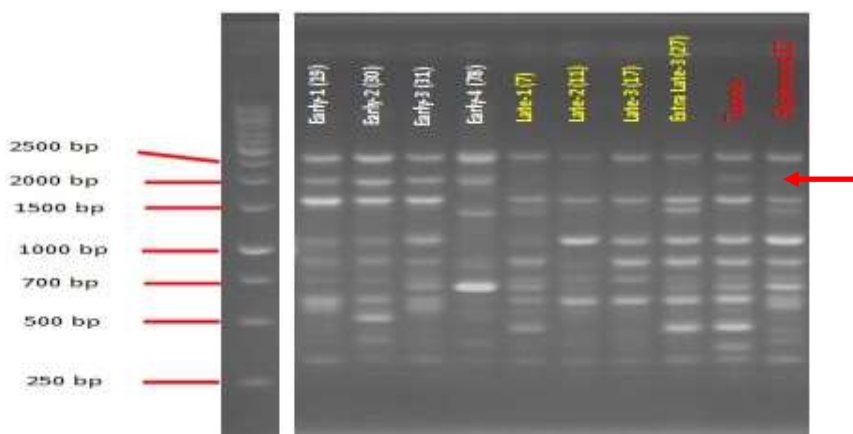




شکل ۶: باندهای کاندید احتمالاً پیوسته با زمان دیرگلدهی به اندازه ۷۰۰ bp و ۱۱۰۰ bp با استفاده از آغازگر OPC-09  
 Fig. 6: Candidate bandpresumably to late flowering time in almond using OPC-09<sub>700,1100</sub>



شکل ۷: باند کاندید احتمالاً پیوسته با زمان زودگلدهی تکثیر یافته به اندازه تقریبی ۶۳۰ bp با استفاده از آغازگر BB-10  
 Fig. 7: Candidate bandpresumably to early flowering time in almond using BB-10<sub>630</sub>



شکل ۸: باند کاندید احتمالاً پیوسته با زمان زودگلدهی تکثیر یافته به اندازه تقریبی ۲۰۰۰ bp با استفاده از آغازگر BC-09  
 Fig. 8: Candidate bandpresumably to early flowering time in almond using BC-09<sub>2000</sub>

جدول ۴: اسامی آغازگرهای پیوسته با زمان گلدهی در آنالیز RAPD و توالی آنها

Table 4: Name of primers linked with flowering time in RAPD analysis with their sequences

ردیف Row	نشانگر کاندید Candidate band	توالی آغازگر Primer sequences	پیوستگی با زمان گلدهی Linked with flowering time	فاصله نشانگر از محل مکان کنترل‌کننده گلدهی Marker distance of QTL
1	BA-04 <sub>720</sub>	5'-TCCTAGGCTC-3'	زودگلدهی	3cM
2	BA-17 <sub>600</sub>	5'-TGTACCCCTG-3'	دیرگلدهی	4cM
3	BB-10 <sub>630</sub>	5'-ACTTGCCTGG-3'	زودگلدهی	-
4	BC-05 <sub>320</sub>	5'-GAGGCGATTG-3'	دیرگلدهی	-
5	BC-06 <sub>800</sub>	5'-GAAGGCGAGA-3'	دیرگلدهی	-
6	BC-09 <sub>2000</sub>	5'-GTCATGCGAC-3'	زودگلدهی	-
7	BC-14 <sub>1750</sub>	5'-GGTCCGACGA-3'	دیرگلدهی	11cM
8	BC-17 <sub>600</sub>	5'-CCGTTAGTCC-3'	دیرگلدهی	-
9	BC-20 <sub>250</sub>	5'-AGCACTGGGG-3'	دیرگلدهی	-
10	BD-12 <sub>510</sub>	5'-GGGAACCGTC-3'	زودگلدهی	-
11	OPC-05 <sub>850</sub>	5'-GATGACCGCC-3'	دیرگلدهی	-
12	OPC-09 <sub>700</sub>	5'-CTCACCGTCC-3'	دیرگلدهی	2cM
13	OPC-12 <sub>350</sub>	5'-TGTCATCCCC-3'	زودگلدهی	-

## تهیه نقشه ژنتیکی

جهت تهیه نقشه ژنتیکی از نرم‌افزار JoinMap3.0 با استفاده از ۱۴۴ باند حاصل از ۴۴ نشانگر منتخب (آغازگرهای RAPD و SSR که ذکر نشده‌اند) نیز استفاده گردید. نقشه به‌دست آمده جهت تجزیه و مکان‌یابی ژن(های) کنترل‌کننده صفات کمی مورد استفاده قرار گرفت.

## مکان‌یابی نشانگر (های) پیوسته به ژن(های) کنترل-کننده زمان گلدهی

با دو گروه لینکاژی، مکان‌یابی ژن(های) کنترل‌کننده زمان گلدهی در جمعیت مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار QTL (2001) Cartographer V1.30 انجام شد. نتایج به‌دست آمده از تجزیه QTL برای زمان گلدهی به‌مدت دو سال به شرح ذیل بود.

## سال اول ارزیابی زمان گلدهی

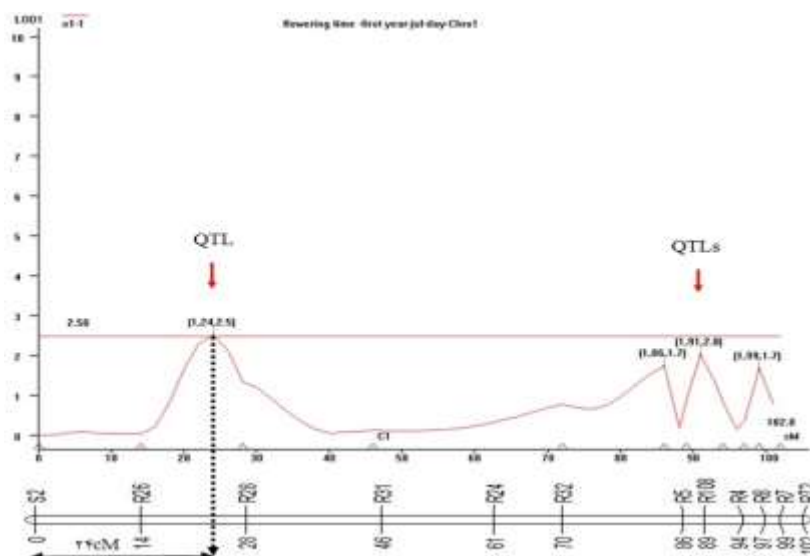
در تجزیه QTL برای صفت زمان گلدهی در جمعیت مورد بررسی در سال اول آزمایش، یک QTL با فاصله ۲۴ سانتی-مورگان از مبدأ و با LOD (Logarithm of odds) برابر ۲/۵ روی گروه لینکاژی شماره یک شناسایی شد. این QTL بین دو باند شماره R26 و R28 حاصل از آغازگر BA17 قرار گرفت که فاصله آن با باند شماره R28 تنها ۴ سانتی-مورگان بود. از

طرفی با توجه به نتایج به‌دست آمده از تجزیه تفرق توده تغییریافته که نشان داد نشانگر BA17 پیوسته با زمان دیرگلدهی می‌باشد لذا می‌توان این نتیجه را گرفت که این نشانگر در فاصله ۴ سانتی-مورگان از ژن کنترل‌کننده دیرگلدهی بادام قرار دارد (شکل ۳). اشباع هر چه بیشتر این ناحیه از نقشه در تحقیقات بعدی امکان شناسایی دقیق یکی از ژن‌های کنترل‌کننده زمان گلدهی را فراهم می‌آورد. همچنین یک QTL با فاصله ۹۱ سانتی-مورگان از مبدأ و با LOD برابر ۲/۰ روی گروه لینکاژی شماره یک شناسایی شد. این QTL بین دو باند شماره R108 و R4 حاصل از آغازگرهای OPC-09 و BA-04 قرار گرفت. فاصله این QTL با باند شماره R108 حاصل از آغازگر OPC-09 به‌میزان ۲ سانتی-مورگان و با باند R4 حاصل از آغازگر BA-04 به‌میزان ۳ سانتی-مورگان بود (شکل ۹). با مقایسه نتایج حاصل از تجزیه QTL و نتایج به‌دست آمده از تجزیه تفرق توده تغییریافته مبنی بر اینکه دو آغازگر OPC-09 و BA-04 به ترتیب کاندید پیوسته با زمان دیرگلدهی و زودگلدهی بودند لذا می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که این دو آغازگر به ترتیب در فاصله ۲ و ۳ سانتی-مورگان از یکی از ژن‌های کنترل‌کننده زمان گلدهی قرار دارند. همچنین 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 LOD مساوی یا بیشتر از ۲ شناسایی نگردید.

### سال دوم ارزیابی زمان گلدهی

R28 تنها ۴ سانتی مورگان بود. برخلاف نتایج به دست آمده از سال اول آزمایش، QTL دیگری برای زمان گلدهی بر روی گروه لینکاژی شماره یک شناسایی نشد هر چند که ۳ QTL کاندید با مقدار LOD کمتر از ۲ شناسایی گردید. این نتایج با نتایج به دست آمده از تجزیه تفرق توده تغییر و همچنین نتایج سال اول آزمایش مطابقت داشت. همچنین مشابه نتایج سال اول آزمایش، روی گروه لینکاژی شماره ۲ مکان ژنی با LOD مساوی یا بیشتر از ۲ شناسایی نگردید.

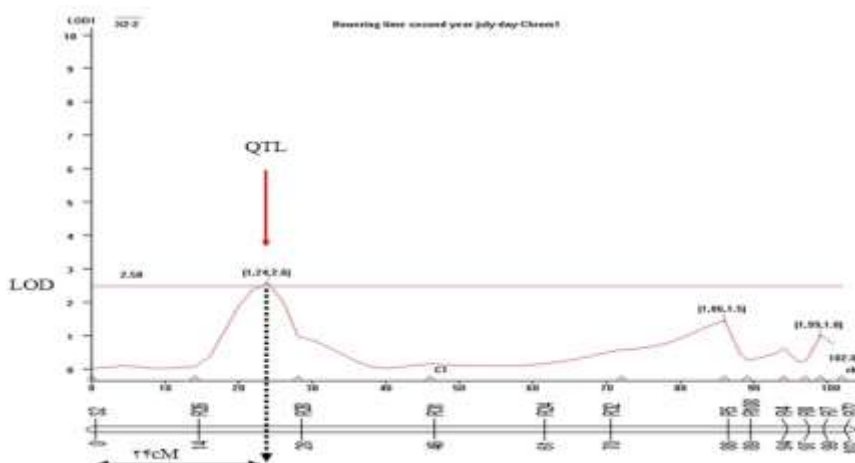
نتایج به دست آمده از سال دوم ارزیابی زمان گلدهی با اندکی تفاوت نتایج حاصل از سال اول آزمایش را تأیید کرد. تجزیه QTL برای صفت کمی زمان گلدهی در جمعیت مورد بررسی در سال دوم آزمایش مشابه سال اول آزمایش یک QTL با فاصله ۲۴ سانتی مورگان از مبدأ و با LOD برابر ۲/۶ (سال اول این مقدار ۲/۵ بود) روی گروه لینکاژی شماره یک، شناسایی کرد (شکل ۱۰). این QTL بین دو باند شماره R26 و R28 حاصل از آغازگر BA17 قرار گرفت که فاصله آن با باند شماره



شکل ۹: موقعیت، فاصله و LOD مکان‌های 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 اول آزمایش

Fig. 9: Position, distance and LOD of flowering time QTL have been identified in Linkage groups on a map prepared of population from the cross between 'Tuono'(♂) × 'Shahrood-12' in the first year



شکل ۱۰: موقعیت، فاصله و LOD مکان‌های 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. 10: Position, distance and LOD of flowering time QTL have been identified in Linkage groups on a map prepared of population from the cross between 'Tuono'(♂) × 'Shahrood-12' in the second year.

نتایج به‌دست آمده از شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با مکان‌های کنترل‌کننده زمان گلدهی با استفاده از روش تجزیه تفرق توده و تجزیه QTL با نتایج جوهر و همکاران (Joobeur *et al.*, 1998)، (بلاستر و همکاران، 2001)، (کانلی، 2004)، سیلوا و همکاران (Silva *et al.*, 2005) و (کامپوی و همکاران، 2010) در بادام و برخی گونه‌های جنس پرونوس (آلبالو و زردآلو) مطابقت داشت.

جوهر و همکاران (1998) گزارش کردند که QTLs مختلفی زمان گلدهی را در بادام کنترل می‌کنند که نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نیز این موضوع را تأیید کرد (شکل‌های ۹ و ۱۰). علاوه بر این جوهر و همکاران (Juber *et al.*, 1998) مکان‌های کنترل‌کننده زمان گلدهی را در چهار گروه لینکاژی (گروه‌های شماره ۲، ۴، ۶ و ۷) نقشه ژنتیکی مرجع جنس پرونوس تهیه شده از جمعیت F<sub>2</sub> حاصل از تلاقی بادام رقم تگراس × هلوی رقم ارلی‌گلد، شناسایی کردند. همچنین بلاستر و همکاران (2001) با استفاده از روش تجزیه تفرق توده در جمعیت F<sub>1</sub> بادام و با استفاده از نشانگرهای RAPD موفق به شناسایی سه نشانگر RAPD همبسته با ژن دیرگلدهی شدند که یکی از آنها (OKP10<sub>1350</sub>) در فاصله ۵/۴ سانتی‌مورگان از ژن دیرگلدهی قرار داشت. در این تحقیق نیز هشت نشانگر RAPD همبسته با دیرگلدهی شناسایی شد که از بین آنها دو نشانگر OPC-09<sub>700</sub> و BA-17<sub>600,1000</sub> به ترتیب در فاصله ۲ و ۴ سانتی‌مورگان با یکی از مکان‌های کنترل‌کننده دیرگلدهی قرار داشت. این نتایج نشان می‌دهد که نشانگر RAPD با توجه به کم‌هزینه بودن، سادگی و قدرت تولید باند زیاد می‌تواند یکی از نشانگرهای مهم و سودمند جهت تهیه و اشباع نقشه ژنتیکی، مطالعه و بررسی جمعیت‌های در حال تفرق و شناسایی مکان‌های کنترل‌کننده صفات کمی (با توجه به سختی و حجم زیاد کار و هزینه)، باشد. از طرفی با توجه به ناشناخته بودن بسیاری از مکان‌های کنترل‌کننده صفات کمی در بادام و سایر گونه‌های جنس پرونوس، تصادفی بودن نشانگر RAPD شاید یک مزیت به حساب آید. سیلوا و همکاران (2005) نیز QTLs مختلف پیوسته به زمان گلدهی را در نتایج بین‌گونه‌ای حاصل از تلاقی هلو × بادام را در گروه‌های لینکاژی G1, G4, G5, G6, و G7 شناسایی کردند که با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد. اگر چه نقشه ژنتیکی ایجاد شده از جمعیت مورد بررسی در این تحقیق کامل نبود اما دو QTL شناسایی شده مرتبط با زمان گلدهی در گروه یک لینکاژی مطابق با نتایج سیلوا و همکاران (2005) بود. همچنین این محققین با استفاده از ره یافت ژن‌های کاندید در گروه لینکاژی شماره ۵،

سه ژن کاندید کنترل‌کننده زمان گلدهی شامل PrdLFY، PrdTFL و PrpAP1 (GeneBank ID BU039475) را معرفی کردند که جهت مطالعه QTLs شناخته‌شده در این تحقیق و سایر تحقیقات مرتبط در آینده می‌توانند مفید و مؤثر واقع شوند.

همچنین کامپوی و همکاران (2010) دو مکان ریزماهواره UDAP-423r و AMPA-105 پیوسته با صفت زمان گلدهی به فاصله ۴ سانتی‌مورگان از QTL کنترل‌کننده گلدهی در گروه لینکاژی شماره ۵ نقشه ژنتیکی زردآلو گزارش کردند. در حقیقت این نتایج نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره نیز می‌توانند به‌عنوان یک نشانگر مفید جهت شناسایی مکان‌های کنترل‌کننده صفات کمی در بادام و سایر گونه‌های جنس پرونوس باشند. با توجه به تشابه ژنومی گونه‌های جنس پرونوس و اینکه ژن‌های ناحیه MADS-box که بخشی از ژنوم جنس پرونوس (و اکثر جنس‌های خانواده روزاسه و سایر گیاهان) بوده و نقش آنها در توسعه جوانه گل، زمان گلدهی و توسعه میوه شناسایی شده است (سیلوا و همکاران، 2005)، لذا مقایسه، تطابق و استفاده از نتایج حاصل از شناسایی مکان‌های کنترل‌کننده صفات کمی مثل زمان گلدهی گونه‌های مختلف جنس پرونوس می‌تواند مفید و مؤثر باشد.

نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد که پایداری متفاوتی از QTLs شناسایی شده در گروه ۱ لینکاژی در طول ۲ سال از مطالعه وجود دارد (شکل‌های ۹ و ۱۰). به‌طوری‌که در سال اول دو QTL و در سال دوم یک QTL اصلی روی گروه ۱ لینکاژی مشاهده شد (شکل‌های ۱۰ و ۱۱). این پدیده برای اولین بار توسط اسینس و همکاران (Asins *et al.*, 1994) در جنس پرونوس تشریح گردید. سه دلیل احتمالی مبنی بر فقدان پایداری در QTL شامل قدرت آزمون آماری مورد استفاده، سهم کم QTL در تفاوت ژنتیکی صفت و بیان متفاوت ژن وابسته به یک صفت در یک سال می‌باشد. علاوه بر این فقدان پایداری در QTLs در سایر گونه‌های جنس پرونوس گزارش شده است (کامپوی و همکاران، 2010). از طرفی با توجه به پایداری یک QTL در دو سال آزمایش به‌نظر می‌رسد که یکی از QTLs پایدار و اصلی کنترل‌کننده صفت زمان دیرگلدهی در بادام می‌باشد و با اطمینان بیشتری می‌توان از آن در برنامه‌گزینش به‌کمک نشانگر به‌عنوان مکمل روش‌های اصلاح کلاسیک استفاده نمود.

### نتیجه‌گیری کلی

ارتباط بین نشانگرهای RAPD پیوسته و صفت زمان گلدهی

ژنتیکی بادام و نقشه مرجع جنس پرونوس مورد استفاده قرار گرفته و بررسی شوند. تلفیق این نشانگرها در نقشه می تواند اطلاعات مفید پیوستگی بین این نشانگرهای RAPD و زمان گلدهی را ارائه دهد.

می تواند با بررسی بیشتر فنوتیپی 'شاهرود ۱۲' و 'تونو' ثابت شود. لذا، نشانگر شاخص RAPD می تواند تبدیل به STS شده و در انتخاب به کمک نشانگر (MAS) برای دیرگلدهی مورد استفاده قرار بگیرند. جهت درک بهتر اساس ژنتیکی زمان گلدهی، نشانگر های RAPD به دست آمده می توانند در نقشه

جهت مطالعه منابع به صفحه های ۱۳-۱۴ متن انگلیسی مراجعه شود.