بهینه سازی نشانگر مولکولیRAMP جهت مطالعه روابط خویشاوندی و تهیه نقشه ژنتیکی بادام

موسی رسولی*1
1- استادیار گروه مهندسی فضای سبز دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر
*نویسنده مسئول

چکیده

بادام با نام علمی (P. dulcis (Mill.) D.A.Webb; syn. P. amygdalus Batsch) یکی از گونه های جنس پرونوس و زیر جنس آمیگدالوس (خانواده رزاسه و زیر خانواده پرونوئیده) می باشد که به طور تجاری در مناطق وسیعی از جهان کشت می شود. از آنجایی که ارقام ایرانی بادام تاکنون کمتر شناخته شده و یا مورد بررسی قرار گرفته اند، لذا مطالعه، شناسایی و تعیین روابط ژنتیکی بین ارقام ایرانی با استفاده از روشهای مولکولی می تواند مناسب و مفید باشد. استفاده از نشانگرهای مولکولی بویژه ریزماهواره ها بدلیل دقت بالای آنها در مطالعه ژنوم درختان میوه از اهمیت زیادی برخوردار است. همچنین استفاده از نشانگرهای مولکولی با قدرت تولید بالای باند های چند شکل به منظور تعیین دقیق تفاوت های ژنتیکی بین ارقام مختلف ضروری به نظر می رسد. هدف از این تحقیق بهینه سازی استفاده از نشانگر مولکولی RAMP که ترکیبی از نشانگر ریزماهواره (SSR) و راپید (RAPD) می باشد جهت بررسی روابط ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ های بادام داخلی و خارجی بود. DNA ژنومی از بافت های برگی جوان استخراج و واکنش های PCR با استفاده از ترکیب پرایمری انتخاب شده از بین100 مکان ریزماهواره و 120 آغازگر RAPD انجام شد. نتایج بدست آمده نشان داد که برخی از مکان های ریزماهواره در ترکیب با آغازگرهای RAPD باند چند شکل مناسبی تولید کردند و همچنین تفاوت بین ارقام و ژنوتیپ های مختلف بادام را نشان دادند که از آن جمله می توان به مکان UDP96003 اشاره کرد. همچنین آغازگر OPA8 در بین سایر آغازگرهای RAPD بیشترین تعداد باند چند شکل را تولید کرد. بهترین ترکیب آغازگری بدست آمده در این تحقیق برای نشانگر RAMP، ترکیب UDP96003R-OPA8 بود. همچنین از بین برنامه های مختلف PCR مناسب ترین دمای اتصال برای ترکیب آغازگری نشانگر RAMP، 40 درجه سانتیگراد بود. با استفاده از ترکیب های آغازگری بدست آمده برای نشانگر RAMP و همچنین نتایج حاصل از برنامه های مختلف PCR می توان از این نشانگر جهت بررسی روابط ژنتیکی ارقام مختلف درختان میوه جنس پرونوس بدلیل دقت بالا و تعداد باند چند شکل مناسب و همچنین به منظور ایجاد نقشه های ژنتیکی، اشباع نقشه های موجود و یافتن نشانگرهای پیوسته با یک صفت خاص برای انتخاب به کمک نشانگر (MAS) استفاده نمود.

کلمات کلیدی: بادام، ریزماهواره،RAPD، نشانگر RAMP، دمای اتصال.

مقدمه

بادام با نام علمی Prunus dulcis یکی از مهمترین محصولات خشکبار در جهان است که دارای ارزش اقتصادی بالایی می باشد (Kester et al., 1991). بادام از مرکز و جنوب آسیا منشاء گرفته و به تدریج تحت شرایط اقلیمی سرد و خشک تکامل یافته است. گونه های مرتبط به جنس پرونوس به طور وحشی در شرق چین در مناطق کوهستانی و مناطق بیابانی غرب چین، ترکمنستان، افغانستان و ایران یافت می شوند (Kester & Gradzi et al., 1996). بر اساس آنالیز DNA کلروپلاستی هلو و بادام، نزدیکی و ارتباط زیادی بین گونه های کشت شده جنس پرونوس و موارد تقسیم بندی شده در زیر جنس آمیگدالوس آشکار گردید (Parfitt & Badenes, 1995). بادام

[1] - آدرس نویسنده مسئول : m.rasouli@malayeru.ac.ir

دگر گشن بوده و دارای سیستم خود ناسازگاری اجباری می باشد. در نتیجه میزان بالایی از هتروزایگوتی ژنتیکی بین افراد داخل یک جمعیت وجود دارد. گونه های مرتبط که دارای پتانسیل بالا برای اصلاح بادام در جهت بهبود کیفیت مغز و خود سازگاری هستند نیز گزارش شده است (Kester & Gradziel, 1996).

بطور سنتی، شناسایی و تشریح خصوصیات ارقام بادام براساس صفات مرفولوژیکی استوار بوده است. با این حال این صفات معمولاً همیشه برای بررسی و مطالعه در دسترس نمی باشند و تحت تاثیر محیط می باشند. برخی از این صفات تنها در مرحله بلوغ قابل مشاهده بوده و زمان طولانی برای مطالعه و بررسی آنها مورد نیاز است.

در سالهای اخیر زیست شناسی مولکولی، ابزارهای مناسبی را برای تجزیه و تحلیل های جامع تر در مورد شناسایی موجودات زنده فراهم کرده است. در این میان نشانگرهای ملکولی و اختصاصاً نشانگرهای DNA یکی از بنیادی ترین نشانگرها بوده اند که برای مطالعات ملکولی و ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته اند (نقوی و همکاران، 1386). استفاده از روشهای مبتنی بر DNA از جمله استفاده از تکنیک RAPD جهت بررسی و افزایش کارآیی مدیریت ژرم پلاسم، بدلیل هزینه نسبتا بالای کشت و مدیریت و نیاز به فضای زیاد جهت تکثیر رویشی درختان میوه مفید باشد. ارزش و اهمیت آنالیز تنوع با استفاده از RAPD در مدیریت ژرم پلاسم گیاهان توسط محققین مختلف نیز گزارش شده است (Welsh & McClelland, 1990, Mir Ali &Nabulsi,2003). Martinez-Gomez et . (2003) al، تعدادی از ارقام هلو، بادام و 10 گونه دیگر از زیر جنس Amygdalus را با استفاده از نشانگر SSR مورد بررسی قرار دادند. یک گونه از زیر جنس Cerasus (در جنس Prunus) نیز به عنوان گروه بیرونی در مطالعه به کار برده شد. تعداد آلل های آشکار شده در ارقام هلو و بادام از 1 تا 3 متغیر بود. در حالی که سایر گونه ها 1 تا 10 آلل آشکار نمودند. پس از تجزیه کلاستر ، ژنوتیپ های مورد مطالعه در 4 گروه جای گرفتند به طوری که در گروه اول، ارقام هلو به همراه گونه های وحشی آن، گروه دوم شامل ارقام اهلی بادام، گروه سوم گونه های وحشی بادام و گروه چهارم یکی از گونه های وحشی متعلق به جنس Cerasus را شامل شد. نتایج، تنوع ژنتیکی زیادی را در ژرم پلاسم مورد بررسی آشکار کرد و بعلاوه ارزش نشانگرهای SSR معرفی شده در یک گونه جنس Prunus را برای شناسایی گونه های دیگر آن جنس نشان داد. Xie et al. (2006) برای بررسی تنوع ژنتیکی 23 رقم بادام از چین و 15 رقم بادام از کشور های آمریکا، فرانسه، ایتالیا و اسپانیا، دو هیبرید هلو-بادام و سه رقم هلو، تعداد 16 مارکر SSR شامل 8 مارکر EST-SSR و 8 مارکر SSR ژنومی هلو را مورد استفاده قرار دادند. سه مارکر EST-SSR و 7 مارکر SSR ژنومی چند شکلی بالایی نشان دادند. ارقام مورد بررسی در 3 گروه قرار گرفتند به طوری که تمام ارقام بادام چینی در گروه اول و تمام ارقام آمریکایی و اروپایی در گروه دوم جای گرفتند و گروه سوم شامل ارقام هلو و هیبرید های هلو-بادام بود. این بررسی مشخص کرد که ارقام بادام چینی تاریخچه تکاملی مستقل از بادام های اروپایی- امریکایی دارند. Cheng و همکاران (2001) از نشانگر مولکولی RAMP برای بررسی روابط ژنتیکی بین 26 رقم تجاری هلو استفاده کردند. نتایج بدست آمده آنها 82 باند چند شکل را از ترکیب 10 آغازگر RAMP نشان داد. تجزیه کلاستر بر اساس داده های نشانگر RAMP نشان داد که گروهها بیشتر بر اساس منطقه رویش و طبقه بندی ارقام بر اساس صفت خاص از یکدیگر تفکیک شدند. ارقام رایج بومی چین با ارقام ژاپن در یک گروه قرار گرفتند که شاید نشان دهند منشاء گرفتن ارقام ژاپن از رقم های چینی باشد. بررسی واریانس مولکولی (AMOVA) مشخص کرد که اجزائ واریانس بین و درون گروههای هلو تحت تاثیر تنوع کل به ترتیب 30,3% و 69,7% می باشد. از آنجایی که ارقام ایرانی بادام تاکنون کمتر شناخته شده و یا مورد بررسی قرار گرفته اند، لذا مطالعه، شناسایی وتعیین روابط ژنتیکی بین ارقام ایرانی با استفاده از روشهای مولکولی می تواند مناسب و مفید باشد. ارقام بادام بومی و وارد شده از نظر خصوصیات مورفولوژیکی و زراعی مورد مطالعه قرار گرفته اند. با این حال این مطالعات قادر به شناسایی روابط ژنتیکی و

تعیین خصوصیات و ارتباط آنها، نبودند. برای مثال برخی از ارقام خارجی که وارد ایران شده اند به دلیل اشتباه صورت گرفته در نامگذاری و گم شدن بر چسب آنها به صورت شماره های مختلف شاهرودی معرفی شده و هنوز ناشناخته باقی مانده اند.
هدف از این تحقیق بهینه سازی استفاده از نشانگر مولکولی RAMP که ترکیبی از نشانگر ریزماهواره (SSR) و راپید (RAPD) به منظور بررسی روابط ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ های بادام داخلی و خارجی بود.

مواد روشها

مواد گیاهی

39 رقم و ژنوتیپ متفاوت و متنوع از ارقام و ژنوتیپ های ایرانی بادام که در کلکسیون تحقیقاتی کمال آباد کرج وابسته به موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر وزارت جهاد کشاورزی جمع آوری شده اند در این تحقیق بررسی شدند. اسامی ارقام و ژنوتیپ های مورد بررسی و نحوه اندازه گیری برخی از ویژگی های مهم مورفولوژیکی آنها در جدول شماره 1 ذکر گردیده است.

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگی جوان توسعه یافته با استفاده از روش Murray & Thompson,(1980) صورت گرفت. تعیین کمیت و کیفیت DNA بدست آمده با استفاده از روش الکتروفورز DNA در ژل آگاروز تهیه شده به غلظت 0/8 درصد در بافر TBE[1] و نیز روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های 260 و 280 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومترPerkin-Elmer، مدل EZ-201 صورت گرفت و غلظت یکسان از آنها (5 نانوگرم در میکرولیتر) تهیه شد.

انجام آزمایش RAMP

در این تحقیق از بین 120 آغازگر RAPD و 100 مکان ریزماهواره مربوط به گونه های مختلف جنس پرونوس شامل بادام، هلو، گیلاس و زردآلو که دارای چند شکلی بالایی بودند، انتخاب شدند. کلیه نشانگرهای ریزماهواره هسته ای استفاده شده دارای واحد های تکراری دو نوکلئو تیدی بودند. مشخصات مربوط به تمام مکان های های ریزماهواره در جدول 3 ذکر شده است. اجزاء واکنش PCR با حجم 25 میکرولیتر بر اساس روش چینگ و همکاران (2001) بهینه شدند. پس از انجام آزمایش های مقدماتی، شرایط PCR شامل غلظت های مورد استفاده (خصوصا آنزیم تک پلیمراز و DNA) و نیز چرخه های حرارتی (شامل تعداد، دما و نیز مدت هر یک از چرخه ها) بهینه سازی گردید. به منظور تفکیک فرآورده‌های تکثیر شده به وسیله آغازگرهای ریزماهواره به محتویات واکنش هر لوله مقدار 3 میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه و مخلوط حاصل به کمک سیستم الکتروفورز افقی در چاهک های ژل آگاروز متافور 3 درصد (شرکت بیوویتاکر[2] امریکا) حاوی اتیدیوم بروماید (0/5 میکرو گرم در میلی لیتر) در بافر 1X TBE ریخته شد. الکتروفورز نمونه ها به مدت 2 ساعت با جریان 100 ولت صورت گرفت. پس از این مرحله قطعات تکثیر یافته DNA تحت نور UV توسط دستگاه ژل داک (SYNGENE) مشاهده شده و عکس‌برداری از ژل صورت گرفت. برای تخمین طول قطعات تکثیر شده از سایز مارکر SM0313 Fermentas که دارای قطعات bp 100 بود استفاده شد.

[1]. Tris Boric Acid EDTA
[2]. BioWhittaker

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از اندازه گیری برخی از صفات مهم مورفولوژیکی ارقام و ژنوتیپ های مورد بررسی در جدول شماره 2 ذکر شده است. بر اساس نتایج بدست آمده از بین 39 نمونه بادام بررسی شده ارقام و ژنوتیپ های 'دیررس ساوجبلاغ'، 'D-124'، 'پاکوتاه شماره 2 طالقان'، 'شماره 8-16'، 'شماره 10-11'، 'ارومیه 68' و 'برگ درشت همدان' از نظر برخی صفات مهم مورفولوژیکی مثل عادت دیرگلدهی، خشک میوه و مغز بهتر از سایر ارقام و ژنوتیپ ها بودند.

شماره رقم	رقم	منشاء	شماره رقم	نام رقم	منشاء	شماره رقم	نام رقم	منشاء
1	فریتز	امریکا	14	9-2	ایران	27	زرقان 26	ایران
2	11-10	ایران	15	9-32	ایران	28	پاکوتاه طالقان شماره 2	ایران
3	ژینکو	ایتالیا	16	2-29	ایران	29	زرقان 36	ایران
4	5-6	ایران	17	d-99	ایران	30	4-10	ایران
5	D-124	ایران	18	2-7	ایران	31	16-8	ایران
6	4-6	ایران	19	16-3	ایران	32	دیر رس ساوجبلاغ	ایران
7	3-17	ایران	20	میرپنج تهران	ایران	33	برگ درشت همدان	ایران
8	کارمل	امریکا	21	پاکوتاه طالقان1	ایران	34	شال قزوین	ایران
9	9-7	ایران	22	مشهد 10	ایران	35	پاکوتاه رزن	ایران
10	بوتی	امریکا	23	مشهد 6	ایران	36	برگ سیاه قزوین	ایران
11	نان پاریل	آمریکا	24	ارومیه 98	ایران	37	هیبرید هلو و بادام	ایران
12	16-25	ایران	25	یزد 444	ایران	38	کرمان 16	ایران
13	2-27	ا یران	26	یزد 60	ایران	39	کرمان 5	ایران

ردیف	صفت	واحد	روش اندازه گیری
1	زمان گلدهی	کد	1= بیش از حد زود، 2= خیلی زود، 3= زود، 4=زود تا متوسط، 5= متوسط، 6= متوسط تادیر، 7= دیر، 8= خیلی دیر، 9= بیش از حد دیر
2	قدرت رشدی درخت	کد	3= ضعیف، 5= متوسط، 7= قوی،
3	تراکم شاخه و برگ	کد	3= تنک 5= متوسط 7= متراکم

4	سطح برگ	میلیمتر	دستگاه اندازه گیری سطح برگ	
5	نسبت طول به عرض پهنک برگ	نسبت	محاسبه نسبت طول پهنک برگ به عرض پهنک برگ	
6	وزن خشک میوه	گرم	ترازوی دیجیتال	
7	طول خشک میوه	میلی متر	کولیس	
8	عرض خشک میوه	میلی متر	کولیس	
9	وزن مغز	گرم	ترازوی دیجیتال	
10	رنگ مغز	کد	1= خیلی روشن، 3= روشن، 5= متوسط، 7= تیره، 9= خیلی تیره	
11	درصد دوقلویی مغز	درصد	تعداد مغز های دوقلو در نمونه صدتایی	
12	درصد مغز	درصد	وزن صد عدد مغز به صد عدد خشک میوه	
13	سختی یا نرمی پوست چوبی	کد	1= خیلی سخت، 3= سخت، 5= نیمه سخت، 7= نازک، 9= کاغذی	
14	زمان رسیدن میوه	کد	1= بیش از حدزود، 3= زود، 5= متوسط، 7= دیر، 9= بیش ازحددیر	

جدول1- اسامی ارقام و ژنوتیپ های بادام مورد بررسی و لیست صفات مورد ارزیابی و نحوه اندازه گیری آنها بر اساس توصیف نامه بادام(Gulcan, 1985).

با توجه به نتایج بدست آمده از این ارقام و ژنوتیپ ها می توان برای بدست آوردن نتاج برتر از نظر صفات مورفولوژیکی و بژه صفات مربوط به میوه استفاده نمود. شایان ذکر است که علم به پایه ژنتیکی این ارقام و ژنوتیپ ها اصلاحگران گیاهی را در داشتن برنامه اصلاحی مناسب و تلاقی های هدفمند کمک شایانی می کند.

قطعات تکثیر شده و میزان چند شکلی

برای بررسی میزان چند شکلی DNA در بین ارقام و ژنوتیپ های مختلف بادام مورد بررسی در این تحقیق، باند های مربوط به آغازگر هایی که دارای چند شکلی مناسب بودند در محاسبات منظور شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که برخی از مکان های ریزماهواره در ترکیب با آغازگرهای RAPD باند چند شکل مناسبی تولید کردند و همچنین تفاوت بین ارقام و ژنوتیپ های مختلف بادام را نشان دادند که از آن جمله می توان به مکان UDP96003 اشاره کرد. آغازگرUDP96003F در ترکیب با آغازگرهای مختلف RAPD هر چند برخی باند چند شکل را تولید نمود ولی تعداد باند های چند شکل و همچنین وضوح آنها در دماهای 35، 40 و 45 درجه سانتیگراد مناسب نبود (شکل1). از طرفی آغازگرUDP96003R در ترکیب با آغازگرهای مختلف RAPD باندهای چند شکل با وضوح مناسب را در دماهای 35 و 40 درجه سانتیگراد تولید نمود (شکل2). همچنین آغازگر OPA8 در بین سایر آغازگرهای RAPD بیشترین تعداد باند چند شکل را تولید کرد. بهترین ترکیب آغازگری بدست آمده در این تحقیق برای نشانگر RAMP، ترکیب UDP96003R-OPA8

بود (شکل 2 و 3). همچنین از بین برنامه های مختلف PCR مناسب ترین دمای اتصال برای ترکیب آغازگری نشانگر RAMP، 40 درجه سانتیگراد بود. هر چند دمای 35 درجه سانتیگراد نیز دمای مناسبی برای برنامه PCR جهت ایجاد باند های چند شکل و مناسب به منظور تشخیص تفاوت و تمایز بین ارقام و ژنوتیپ های بادام بودند (جدول 3). با استفاده از ترکیب های آغازگری بدست آمده برای نشانگر RAMP و همچنین نتایج حاصل از برنامه های مختلف PCR می توان از این نشانگر جهت بررسی روابط ژنتیکی ارقام مختلف درختان میوه جنس پرونوس بدلیل دقت بالا و تعداد باند چند شکل مناسب و همچنین به منظور ایجاد نقشه های ژنتیکی، اشباع نقشه های موجود و یافتن نشانگرهای پیوسته با یک صفت خاص برای انتخاب به کمک نشانگر (MAS) استفاده نمود.

ردیف	رقم	منشا	زمان گلدهی	قدرت رشد	تراکم شاخه و برگ	سطح برگ	نسبت طول به عرض پهنک	وزن خشک میوه	طول خشک میوه	عرض خشک میوه	پوستر وزن مغز	پوستر رنگ مغز	پوستر درصد دوقلویی	پوستر درصد مغز	سختی پوست چوبی	زمان رسیدن
1	فریتز	امریکا	5	2	3	762/24	2/64	3/53	3/41	2/22	1/23	3	0	44/27	5	5
2	11-10	ایران	5	3	3	1097/18	3/39	1/61	3/43	1/93	1/04	3	00/10	65	7	3
3	ژینکو	ایتالیا	6	3	5	1029/25	3/20	2/14	2/70	2/10	1/03	3	35/00	48/13	3	5
4	5-6	ایران	6	5	3	1047/07	3/58	1/7	3/01	2/17	0/80	2	0/00	48	3	5
5	D-124	ایران	6	5	3	1063/23	3/42	4/33	4/90	2/70	1/40	3	0	25	3	3
6	4-6	ایران	7	5	3	691/53	3/47	2/72	3/47	2/08	1/16	2	25	40	3	3
7	3-17	ایران	6	3	7	916/38	3/43	3/95	3/08	2/02	0/85	3	0	24/30	3	5
8	کارمل	امریکا	5	2	3	543/66	3/44	3/53	3/41	2/22	1/23	3	0	44/27	7	5
9	9-7	ایران	6	5	5	1171/14	3/36	2/4	3/40	2/60	1/40	3	20	58/33	7	1
10	بوتی	امریکا	5	3	3	993/83	3/02	3/53	3/41	2/32	1/43	3	0	44/17	7	3
11	نان پاریل	آمریکا	5	3	5	547/24	4/05	1/22	2/94	1/85	0/81	2	1	66/14	7	3
12	16-25	ایران	5	5	5	1057/83	1/36	5/10	2/92	2/61	1/07	3	0	20/98	3	7
13	2-27	ا یران	5	5	5	1033/97	3/76	3/51	4/00	2/60	1/11	3	2	53/00	7	5
14	9-2	ایران	6	5	7	1026/74	2/62	2/7	3/50	2/00	1/20	2	30	44/44	7	5
15	9-32	ایران	5	3	3	882/59	3/28	3/56	3/00	2/17	1/13	5	20	62/00	3	5

16	2-29	ایران	5	7	3	787/14	3/24	3/2	3/90	1/70	0/95	3	30	45/00	7	5
17	d-99	ایران	6	5	3	1129/26	3/10	2/13	3/20	2/20	1/36	3	10	63/00	3	3
18	2-7	ایران	6	5	7	1347/91	3/19	1/76	3/33	1/74	0/79	2	0	41/18	3	5
19	16-3	ایران	6	3	5	846/19	2/72	4/87	3/45	2/58	1/59	1	0	32/87	3	7
20	میرپنج تهران	ایران	5	5	7	3086/06	2/30	3/65	4/20	1/90	1/30	3	55	55	7	7
21	پاکوتاه طالقان1	ایران	6	3	7	1610/34	3/62	4/23	3/60	2/40	1/40	3	40	40	5	5
ردیف	رقم	منشا	زمان	قدرت	تراکم	سطح	نسبت طول	وزن	طول	عرض	وزن	رنگ	درصد	درصد	سختی	زمان
22	مشهد 10	ایران	7	3	7	675/56	3/69	6/00	3/20	1/80	0/76	4	مغز	57	57/00	5
23	مشهد 6	ایران	7	7	7	1146/76	3/93	1/31	3/50	1/90	0/77	4	مغز	55	55	7
24	ارومیه 98	ایران	7	5	5	930/57	2/99	5/63	3/10	2/6	1/20	4	میوه	22	22/00	3
25	یزد 444	ایران	2	3	3	895/21	3/56	4/9	3/70	1/9	1/86	4	میوه	38	38/00	3
26	یزد 60	ایران	3	5	3	1279/04	3/58	3/7	3/10	2/00	1/40	4	مغز	65	65/00	3
27	زرقان 26	ایران	7	3	7	1107/01	3/72	2/06	3/50	2/00	0/94	5	مغز	45	45/00	5
28	پاکوتاه طالقان					/29					/88					
29	زرقان 36	ایران	5	5	5	/36	3/19	3/66	3/20	2/2	/43	5	دوقلویی	39	39/00	7
7	شماره 2	ایران	5	3	7	1410	3/23	5/11	4/26	3/25	1	3	چوبی	48/94	48/94	7

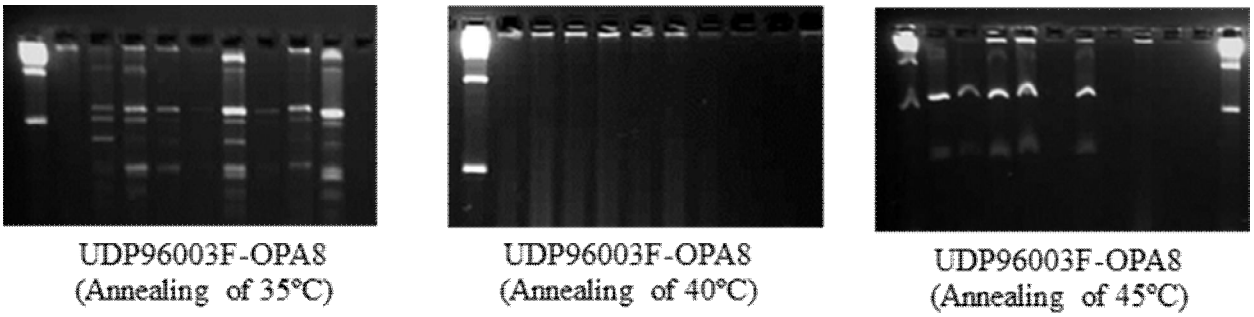
جدول 2- برخی ویژگی های مهم ارقام و ژنوتیپ های بادام مورد بررسی در این آزمایش.

											2923				1		
											/80				/32		
30	4-10	ایران	7	3	3	3/26	3/22	3/2	2/21	1880			4	1	55	10	5	5
										/05				/76				
31	16-8	ایران	7	3	3	3/15	3/45	3/33	1/74	1109			3	1	60/00	0	9	3
										/88				/96				
32	دیر رس ساوجبلاغ	ایران	7	3	3	2/93	3/16	5/00	3/8	809			3	0	46/74	46/74	3	9
33	برگ درشت همدان	ایران	5	5	5	2/87	4/70	4/60	2/5	2076			3	1	50/00	50	3	7
										/92				/80				
34	شال قزوین	ایران	3	5	7	2/93	7/1	3/50	2/3	1176			3	1	50/00	50	3	5
35	پاکوتاه رزن	ایران	6	3	7	2/69	7/1	4/20	2/5	/18 1083			3	/20 1	25/00	25	3	7
36	برگ سیاه قزوین	ایران	6	5	7	3/16	2/42	3/00	1/4	1379			3	1	60/00	60	5	5
										/02				/50				
37	هیبرید هلو و بادام	ایران	6	3	7	3/73	3/4	3/20	1/9	1654			4	0	20/00	20	1	7
										/18				/70				
38	کرمان 16	ایران	7	3	7	2/76	1/30	3/90	2/6	1093			3	0	25/00	25	3	7
										/16				/67				
39	کرمان 5	ایران	7	5	7	2/47	2/70	3/70	2/7	1251			3	1	22/00	22	3	5
										/18				/30				

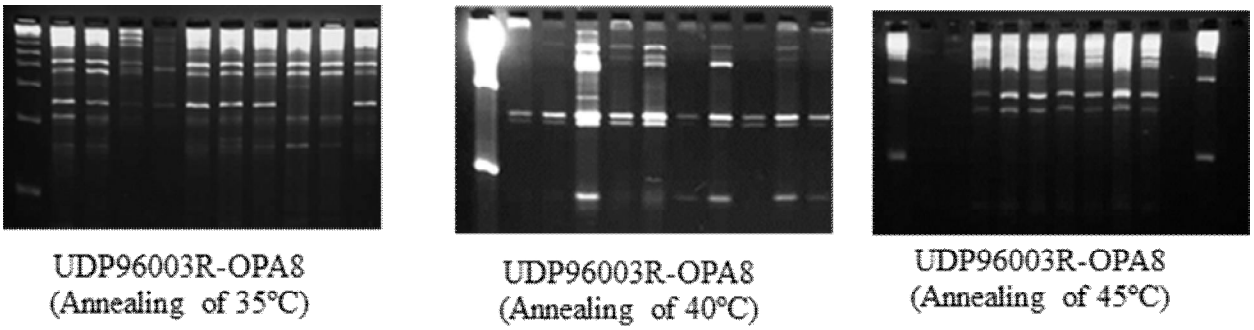
ادامه جدول 2- برخی ویژگی های مهم ارقام و ژنوتیپ های بادام مورد بررسی در این آزمایش.

جدول 3- زمان و دمای مناسب بدست آمده برای مراحل انجام واکنش PCR با استفاده از ترکیب آغازگرهای RAMP
*بسته به نوع آغازگر متفاوت می باشد.

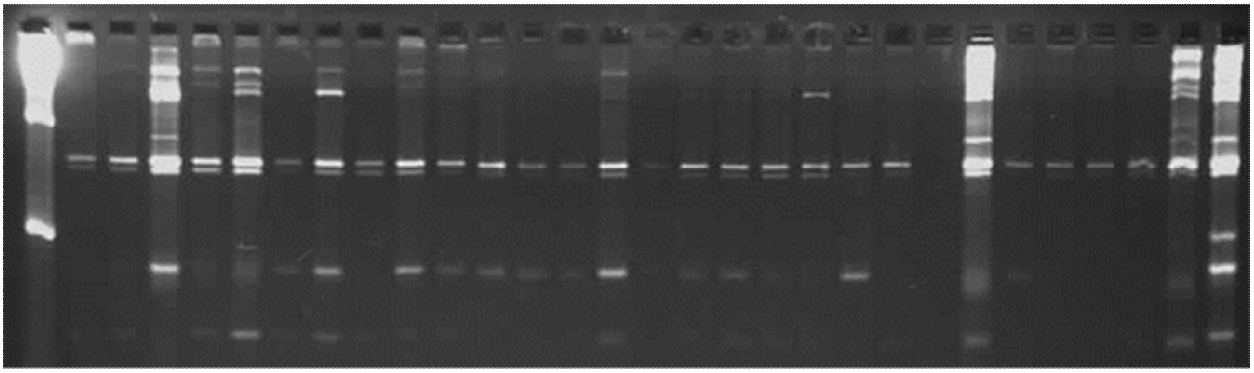
مرحله	مرحله انجام شده	تعداد چرخه (تکرار)	زمان (دقیقه)	درجه حرارت C °
1	شروع باز شدن DNA	1	۵´	94
	تک رشته ای شدنDNA	-	۱´	94
2	اتصال آغازگر	35	۱´	35-40*
	بسط آغازگر	-	۲´	72
3	بسط نهایی	1	۱۰´	72
4	نگهداری	1	نامحدود محمحدودیت	4



شکل 1- الگوی باندی حاصل از ترکیب آغازگری UDP96003F-OPA8 در برخی از ارقام و ژنوتیپ های بادام مورد بررسی با نشانگر RAMP در دماهای اتصال 35، 40 و 45 درجه سانتیگراد.



شکل 1- الگوی باندی حاصل از ترکیب آغازگری UDP96003R-OPA8 در برخی از ارقام و ژنوتیپ های بادام مورد بررسی با نشانگر RAMP در دماهای اتصال 35، 40 و 45 درجه سانتیگراد.



UDP96003R-OPA8
(Annealing of 40°C)

شکل 3- الگوی باندی حاصل از ترکیب آغازگری UDP96003R-OPA8 در 39 رقم و ژنوتیپ بادام مورد بررسی با نشانگر RAMP.

منابع

Badenes, M.L. & Parfitt, D.E. (1995). Phylogentic relationships of cultivated Prunus species from an analysis of chloroplast DNAvariation. Theoretical and Applied Genetics, 90: 1035–1041.

Bartolozzi, F., Warburton, M.L., Arulsekar, S. & Gradziel, T.M. (1998). Genetic characterization and relatedness among California almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Journal of the American Society for Horticultural Science, 123: 381–387.

FAO. (2007). FAOSTAT database results. http://faostat.Fao.org.faostat. servlet.

Gulcan, R. 1985. Descriptor List for Almond (Prunus amygdalus)(Revised). International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Rome, pp: 32.

Kester, D.E., Gradziel, T.M. & Grasselly, C. (1991). Almonds (Prunus). In: Moore, J.N., Ballington, H.J. (Eds.). Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops. International Society for Horticultural Science, the Netherlands, pp: 701–758.

Kester, D. E., & Gradiziel, T. M. (1996). Almonds, in: Janick J., Moore J. N. (Eds.), Fruit Breeding. Vol. 3. Nuts, John Wiley and Sons, New York, pp: 1-97.

Martinez-Gomez, P., Arulesekar, S., Potter, D. & Gradziel, T. M. (2003b). Relationships among peach,almond,and ralated spaecies as detected by simple sequence repeat Markers. American Society for Horticultural Science, 128: 667-671.

Martins, M., Farinha, A., Ferreira, E., Cordeiro, V., Monteiro, A., Tenreiro, R. and Oliveira, M.(2001). Molecular analysis of the genetic variability of Portuguese almond collection. Acta Horticulturae, 546: 449–456.

Martins, M., Tenreiro, R. & Oliveira, M. (2003). Genetic relatedness of Portuguese almond collection assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Reports, 22: 71–78.

Mir Ali, M. & Nabulsi, I. (2003). Genetic diversity of almond (Prunus dulcis) using RAPD technique, Scientia Horticulturae, 98: 461–471.

Murray, M. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8: 4321- 4325.

Sanchez-Perez, R., Dicenta, F., Gradziel, T. M., Arus, P. &Martinez-Gomez, P. (2004). Application of molecular markers in almond breeding programmes. Nucis-Newsletter, 12: 9-12.

Shiran, B., Amirbakhtiar N., Kiani, S., Mohammadi, Sh., Sayed Tabatabei , E. & Moradi ,T. (2007). Molecular charactrization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. Scientia Horticulturae, 111: 280-292.

Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 18: 7213–7218.

Optimization of Random Amplified Microsatellite Polymorphism (RAMP) marker for study of genetic diversity and map instruction of almond

Mousa Rasouli1
Assistant professor of landscape engineering department, Faculty of Agriculture, Malayer University

Abstract
Almond (P. dulcis (Mill.) D.A.Webb; syn. P. amygdalus Batsch) is one of the most important species of Prunus genus and Amygdalus sub species that is grown commercially in large areas of the world. Since Iranian varieties have been poorly characterized so far, molecular studies are suitable means in order to identify and characterize the relationship between Iranian cultivars. Using microsatellite molecular markers is important particularly due to their high accuracy in studying the genome of the fruit trees. Also, using molecular markers with high-polymorphisms bands production is necessary in order to determine of distinguish between different cultivars. The objective of this study was optimization of Random Amplified Microsatellite Polymorphism (RAMP) marker, which is combination of SSR and RAPD markers, for study of genetic diversity and relationship among different native and foreign almond cultivars. Genomic DNA was extracted from young leaf tissues and PCR reactions were done using 100 primers of microsatellites and 120 RAPD selected primers. Results showed that some of microsatellites loci similar UDP96003 locus in combination with RAPD primers produced polymorphisms bands that could show the diversity between different almond cultivars. Also, OPA8 primer produced the maximum polymorphism bands among all RAPD primers. The best primer combination for RAMP marker in this research was UDP96003R-OPA8. Also, between different PCR programs 40 ˚C was optimum annealing temperature. Primer combination of RAMP marker and optimized PCR programs that was obtained in this work, can used for study the genetic diversity of Prunus genus, construction of linkage map, saturation of available linkage map and finding the markers linked to special trait.
Keywords: Almond; Prunus dulcis; Genetic relationship; RAMP; Genetic diversity

m.rasouli@malayeru.ac.ir