شفاهی

شناسایی نشانگر (های) ریز ماهواره پیوسته به ژن (های) کنترل کننده زمان گلدهی و برخی صفات مهم در جمعیت F_1 بادام حاصل از تلاقی کنترل شده (♂) تونو ×(♀) شاهرود ۱۲

موسی رسولی (۱)، محمدرضا فتاحی مقدم (۲)، ذبیح اله زمانی (۲)، علی ایمانی (۳)، علی عبادی (٤)، پدرو مارتینز گومز (٥)

۱- دانشجوی دکتری ۲- دانشیاران و ٤- استاد گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران ۳- استادیار مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج ٥- استاد موسسه تحقیقات CEBAS کشور اسپانیا

در این تحقیق زمان گلدهی و برخی صفات رویشی، خشک میوه و مغز بادام در جمعیت F۱ شامل ۷۲ نتاج حاصل از تلاقی رقم‌های 'تونو' (میان گل) و 'شاهرود ۱۲' دیرگل مورد ارزیابی قرار گرفت. از روش تجزیه تفرق توده ای تغییر یافته با استفاده از ۸۷ نشانگر ریز ماهواره هسته ای و ٥ نشانگر ریزماهواره کلروپلاستی برای شناسایی نشانگرهای همبسته با زمان گلدهی در دانهال‌های مختلف انتخاب شده و نهایتا کل جمعیت، استفاده شد. نتایج نشان داد که توارث زمان گلدهی در نتاج ارزیابی شده به صورت کمی می باشد. نتایج نشان داد که دو مکان ریز ماهواره CPPCT-008 و EPPCU-2584 با زمان دیر گلدهی همبسته بودند. پس از تهیه نقشه ژنتیکی جمعیت مورد بررسی، تجزیه QTL برای زمان گلدهی و برخی صفات مهم رویشی، خشک میوه و مغز انجام شد. نتایج تجزیه QTL نشان داد که مکان UDP-97403 به میزان ٤ 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 فاصله دارد. همچنین تجزیه QTL نشان داد که مکان BPPCT-007 به فاصله ۲ سانتی مورگان با یکی از مکان‌های ژنی کنترل کننده صفت عرض مغز فاصله دارد.

کلمات کلیدی: بادام، زمان گلدهی، خشک میوه، مغز، تجزیه تفرق توده ای، QTL، انتخاب به کمک نشانگر همراه.

مقدمه:

توسعه ارقام جدید یک فرایند طولانی و خسته کننده در بادام می باشد، که شامل ایجاد جمعیت های بزرگی از دانهال ها و انتخاب بهترین ژنوتیپ ها از بین آنها می باشد. در حالیکه توانایی و وسع اصلاحگران برای تولید جمعیت بزرگ حاصل از تلاقی محدود می باشد. مدیریت، مطالعه، بررسی و انتخاب این دانهال های باقی مانده یک فاکتور اصلی محدود کننده در جهت تولید و معرفی ارقام جدید می باشد (Alburquerque et al., 2008). انتخاب به کمک نشانگر (MAS) یک راه و روش بسیار قابل قبول و مهم برای افزایش و کارآیی اهداف انتخابی می باشد (Ballester et al., 2001). تجزیه تفرق توده (BSA)، جایی که دو نمونه DNA مخلوط شده از منابع گیاهی با پیش زمینه ژنتیکی مشابه اما متفاوت در یک صفات خاص می باشد، یک رهیافت قوی برای بررسی مولکولی پیوستگی نشانگر- صفات می باشد. استراتژی ترکیب نشانگرهای مختلف با تجزیه توده در حال تفرق برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با مکانهای ویژگی های خاص میوه در تلاقی های هلو × بادام استفاده شده است (Campoy et al., 2010). از آنجاییکه زمان گلدهی در بادام یک صفت کمی می باشد لذا شناسایی نشانگر های همبسته با مکان های ژنی کنترل کننده صفت کمی زمان گلدهی در بادام می تواند در توسعه و انتخاب ارقام جدید به کمک نشانگر (MSA) کمک نماید.

هدف از این تحقیق ارزیابی افراد جمعیت بدست آمده از تلاقی دو رقم بادام 'شاهرود۱۲' (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 نشانگر

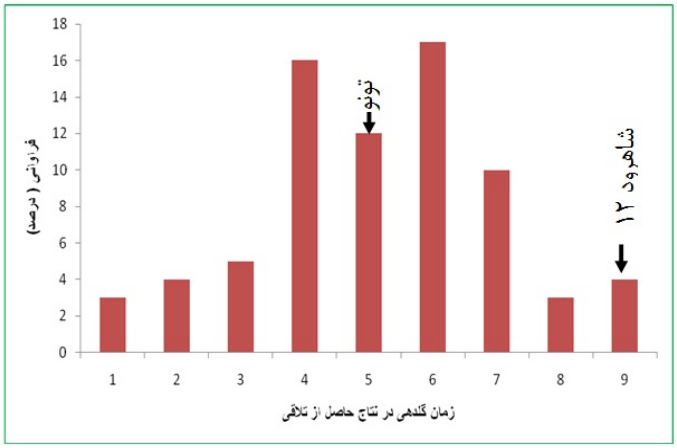
های کاندید پیوسته با زمان گلدهی و برخی صفات مهم با استفاده از روش تجزیه تفرق توده بوسیله نشانگر مولکولی SSR در این جمعیت حاصل از تلاقی کنترل شده می باشد.

مواد و روشها

۷۲ دانهال حاصل از تلاقی رقم ’ شاهرود۱۲‘ به عنوان والد مادری و رقم ’تونو‘ به عنوان والد پدری در سن شش، هفت و هشت سالگی بررسی شدند. ثبت صفات مهم مرفولوژیکی برای ۷۲ نتاج حاصل از تلاقی برای دو سال متوالی (۱۳۸۹-۱۳۸۸) انجام شد. انتخاب توده های فنوتیپی شامل دو گروه خیلی زودگل و گروه خیلی دیر گل که هر گروه شامل ٤ دانهال بودند همراه با والد مادری(شاهرود۱۲) و والد پدری (تونو) انتخاب شدند. DNA از برگهای جوان و نمو یافته در اردیبهشت ماه از تمام دانهال های جمعیت استخراج و بررسی کمیت و کیفیت آن به دو روش استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱ درصد و DNA λ و دستگاه نانودراپ و ژل آگاروز ۱/۲درصد انجام شد. روش تلفیق DNA (۲۰۰٤) ,Canli تغییر یافته جهت پیدا کردن نشانگر های کاندید پیوسته با زمان گلدهی مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق از ۹۲ نشانگر ریز ماهواره هسته ای (شامل۸۷ مکان) و کلروپلاستی (۵ مکان) برای شناسایی ژن (های) کنترل کننده صفات مهم مورفولوژیکی استفاده شد. از نرم افزارهای Mapmaker، JoinMap3.0 و QTL Cartographer جهت تجزیه داده ها استفاده گردید.

نتایج و بحث

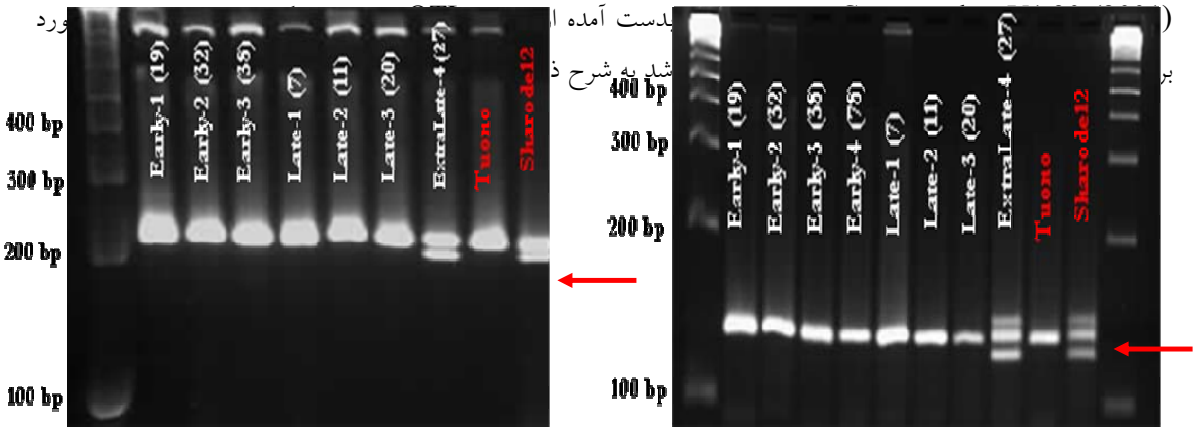
زمان گلدهی برای جمعیت حاصل از تلاقی به طور پیوسته و دارای تغییر نسبی در هر دو سال بوده که نشان دهنده توارث کمی این صفت می باشد (شکل ۱). توزیع زمان گلدهی در نتاج حاصل از تلاقی در هر دو سال نرمال بود (شکل های ۱).



شکل ۱- نمودار فراوانی زمان گلدهی در نتاج حاصل از تلاقی (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲ در سال دوم آزمایش (۱= بیش از حد زود گل، ۲= خیلی زود گل، ۳= زود گل، ٤=زود تامتوسط گل، ۵= متوسط گل، ٦= متوسط تادیرگل، ۷=دیرگل، ۸= خیلی دیر گل، ۹= بیش از حد دیر گل)

بر اساس نتایج بدست آمده، از بین ۹۲ مکان ریز ماهواره مورد بررسی دو مکان ریز ماهواره کاندید پیوسته با زمان گلدهی شامل CPPCT008 و EPPCU2584 بودند. مکان EPPCU2584 دو باند پیوسته با زمان دیرگلدهی به اندازه تقریبی ۱۲۵ bpو ۱۵۰ bp را تکثیر نمود که تنها در نتاج خیلی دیرگل شماره۲۷ و والد دیرگل ’ شاهرود۱۲‘ مشاهده شدند. این باند ها در توده زودگل و والد میان گل ’تونو‘ مشاهده نشدند (شکل ۱ الف). مکان CPPCT008 یک باند پیوسته با زمان دیرگلدهی به اندازه ۲۰۰ bp را تکثیر نمود که تنها در نتاج خیلی دیرگل شماره۲۷ و والد دیرگل ’شاهرود۱۲‘ مشاهده شد. این باند در توده زودگل و والد میان گل ’تونو‘ مشاهده نگردید (شکل ۱ب).

مکان یابی ژن (های) کنترل کننده برخی صفات مهم در بادام در جمعیت مورد بررسی با استفاده از نرم افزار QTL
ورد بدست آمده ا
شد به شرح ذ



(ب) (الف)

شکل ١- (الف) دو باند کاندید پیوسته با زمان دیر گلدهی در بادام تکثیر یافته به اندازه تقریبی ١٢٥bp و ١٥٠ bpحاصل از مکان ریزماهواره EPPCU2584 و (ب) باند کاندید پیوسته با زمان دیر گلدهی در بادام تکثیر یافته به اندازه تقریبی ٢٠٠bp حاصل از مکان ریزماهواره **CPPCT008**

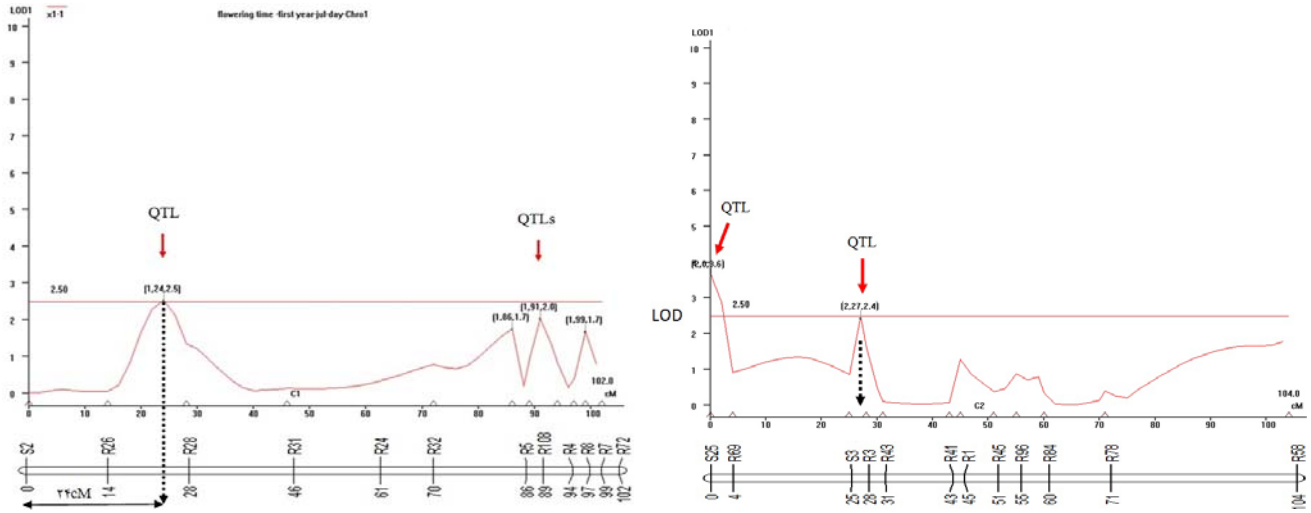
زمان گلدهی

در تجزیه QTL برای صفت زمان گلدهی در جمعیت مورد بررسی ، یک QTL با فاصله ٢٤ سانتی مورگان از مکان BPPCT002 و با LOD [1] برابر ٢/٥ روی گروه لینکاژی شماره یک، شناسایی شد. همچنین یک QTL با فاصله ٩١ سانتی مورگان از مکان BPPCT002 و با LOD برابر ٢/٠ روی گروه لینکاژی شماره یک شناسایی شد (شکل٢ الف). همچنین نتایج حاصل از تجزیه QTL برای صفت زمان گلدهی در جمعیت مورد بررسی آزمایش، نشان داد که روی گروه لینکاژی شماره ٢، QTL با LOD مساوی یا بیشتر از ٢ شناسایی نگردید. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه تفرق توده ای مبنی بر اینکه دو مکان ریزماهواره CPPCT008 و EPPCU2584 کاندید پیوسته با زمان دیرگلدهی بودند و از طرفی این دو در نقشه اولیه بدست آمده از تجزیه با استفاده از نرم افزار Mapmaker در گروه لینکاژی شماره ٢ قرار گرفتند. این دو مکان بر روی یک جمعیت دیگر به تعداد ١٦٧ نتاج که نقشه ژنتیکی آن با ٥٦ مکان ریزماهواره توسط(٢٠٠٧) Sanchez-Perez et al. تهیه شده بود و بعدا نیز با تعداد بیشتر نشانگر اشباع شده بود به کار برد شد که پس از آنالیز داده ها و تهیه نقشه ژنتیکی مکان ریزماهواره EPPCU2584 در گروه ٥ لینکاژی با فاصله ٣٧ سانتی مورگان از مبدا و مکان ریزماهواره CPPCT008 در گروه ٦ لینکاژی و با صفر سانتی مورگان از مبدا (در اول گروه لینکاژی و نقطه صفر) قرار گرفت .

عرض و ضخامت خشک میوه

نتایج حاصل از تجزیه QTL برای صفت عرض خشک میوه در جمعیت مورد بررسی یک QTL با فاصله ٠ سانتی مورگان از مکان UDP97403 (S25) و با LOD برابر ٢/٨ روی گروه لینکاژی شماره دو، مشخص کرد. همچنین مکان BPPCT007 (S3) با QTL شناسایی شده ٢٥ سانتی مورگان روی گروه لینکاژی شماره دو فاصله داشت. تجزیه QTL برای صفت ضخامت خشک میوه در جمعیت مورد بررسی یک QTL با فاصله ٠ سانتی مورگان از مکان UDP97403 (S25) و با LOD برابر ٢/٥ روی گروه لینکاژی شماره دو، شناسایی نمود .

[1]. Logarithm of odds



شکل ۲- (الف) موقعیت، فاصله و LOD مکان های ژنی کنترل کننده صفت زمان گلدهی و (ب) صفت عرض مغز در بادام شناسایی شده روی گروه لینکاژی شماره یک نقشه تهیه شده از جمعیت حاصل از تلاقی (♂) تونو × (♀) شاهرود ۱۲ در سال اول آزمایش

عرض مغز

تجزیه QTL برای صفت عرض مغز در جمعیت مورد بررسی یک QTL با فاصله ۰ سانتی مورگان از مکان UDP97403 (S25) و با LOD برابر ۳/٦ روی گروه لینکاژی شماره دو، شناسایی کرد (شکل ۲ب). همچنین یک QTL دیگر نیز با فاصله ۲ سانتی مورگان از مکان BPPCT007 (S3) و با LOD برابر ۲/٤ روی گروه لینکاژی شماره دو شناسایی شد (شکل۲ب). این QTL بین دو مکان UDP97403 (S25) و BPPCT007 (S3) قرار گرفت. با مقایسه نتایج حاصل از تجزیه QTL می توان چنین نتیجه گیری کرد که این دو مکان ریزماهواره به ترتیب در فاصله ۰ و ۲ سانتی مورگان از یکی از ژن های کنترل کننده عرض مغز قرار دارند.

نتیجه گیری کلی

از دیدگاه اصلاحی، موجود بودن نشانگر های پیوسته شاخص و موثر با زمان گلدهی مانند CPPCT008 و EPPCU2584 دارای ارزش بسیار زیادی می باشد، چرا که خسارات ناشی از دمای پایین به جوانه های گل و گل ها در بادام به عنوان یک عامل متداول در کاهش محصول در این گیاه می باشد. لذا انتخاب ژنوتیپ های دیر گل با استفاده از نشانگر های پیوسته با زمان گلدهی می تواند خسارت ناشی از دماهای پایین و سرمازدگی دیر رس بهاره را کاهش دهد. مکان های ریزماهواره شناسایی شده در این مطالعه دارای اهمیت زیادی هستند چرا که استفاده از این نشانگر ها در انتخاب غیر مستقیم زود هنگام ژنوتیپ های مطلوب از نظر زمان گلدهی موجب صرفه جویی در زمان و هزینه ها می گردد.

فهرست منابع

1. Alburquerque, N., García-Montiel, F., Carrillo, A. & 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.
2. Ballester, J. R., Company, S.I., Arus, P. & Vicente, M.C. (2001). Genetic mapping of a major gene delaying blooming time in almond. *Plant Breeding*, 120: 268-270.
3. Campoy, J.A., Martínez-Gómez, P., Ruiz, D., Rees, J. & Celton, J.M. (2010). 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,* 10: 24-29.
4. Canli, F.A. (2004). A modified Segregant analysis for late blooming in sour cherry. *Pakstan Journal of Biology Sciences*, 7: 1684-1688.
5. Sánchez-Pérez, R., Howad, W. Dicenta, F., Arús, P. & Martínez-Gómez P. (2007). Mapping major genes and quantitative trait loci control-ling agronomic traits in almond. *Plant Breeding*, 126: 310–318.

Identification of microsatellite marker(s) linked to the gene (s) controlling flowering time and some important traits in F1 almond population resulting from controlled crosses 'Tuono' (♂) × 'Shahrood-12' (♀)

Abstract

In this study flowering time and some morphological traits such as vegetative, Nut and kernel characteristics were evaluated in a F1 almond progeny of seventy two seedlings from the cross between 'Tuono' (intermediate flowering) and 'Shahrood-12'(late flowering) cultivars.

Modified-bulk segregant analysis in combination with the application of the eighty seven nuclear SSR markers spanning the whole almond genome and five chloroplastic SSR markers were used to identify molecular markers linked to flowering time in several descendants selected from the studied almond progeny. Results showed a quantitative inheritance of this trait in the progeny. The results showed that two microsatellite loci (CPPCT008 and EPPCU2584) were found to be tightly linked to this important late flowering agronomic trait. After construction of the genetic map of population, QTL analysis was performed for flowering time and some important morphological traits such as vegetative, Nut and kernel characteristics. QTL analysis results showed that the UDP-97403 locus has 4 and 0cM distance from one gene loci controlling tree growth habit, Nut width, Nut thickness and kernel width respectively. Also QTL analysis results showed that the BPPCT007 locus has 2cM distance from one gene loci controlling kernel width. According to the obtained results, with the development of these markers, marker assisted selection strategies can be used of them in breeding programs of almond and other *Prunus* species.

Key words: *Prunus dulcis*, flowering time, Nut, kernel, BSA, QTL, marker-assisted selection.