

کاربرد نشانگرهای ریزماهواره و برخی از صفات مورفولوژیک در شناسایی کلکسیون‌های هسته *Prunus dulcis* Mill.

محمدعلی ابراهیمی^{۱*}، مطهره میر^۲، مهرشاد زین‌العابدینی^۳، علی ایمانی^۴

۱، دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ۲، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ۳، استادیار بخش ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ۴، دانشیار بخش باغبانی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج (تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۱۹ - تاریخ تصویب: ۹۳/۱۲/۲۰)

Application of microsatellite markers and some morphological traits in core collection identification of *Prunus dulcis* Mill.

Mohammad Ali Ebrahimi¹, Motahareh Mir², Mehrshad Zinalabedini^{3*}, Ali Imani⁴

1, Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran, 2, M.Sc. Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran 3, Assistant Professor, Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran, 4, Associate Professor, Department of Horticulture, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran
(Received: Nov. 10, 2014 -Accepted: Mar. 11, 2015)

Abstract

A core collection consists of a set of accessions selected to represent the genetic diversity of a base collection. This strategy was introduced with the intention of minimizing the cost of genetic resource conservation, while ensuring maximum genetic variation. It also allows a rapid evaluation of germplasm, and a better access to the base collection. In this study, One hundred and thirty-nine accessions of almond with diverse origins were used for evaluation of genetic diversity and core collection establishment using 32 simple sequence repeat loci and some quantitative and qualitative traits. A total of 252 alleles were detected, which average allelic richness was 7.75 alleles per locus. The model-based structure analysis here revealed the presence of five subpopulations in the base set, which was approximately consistent with clustering based on the genetic distance. Using a heuristic approach, a core set of 112 and 20 accessions was successfully developed using molecular and morphological traits respectively which showed 100% coverage of alleles with minimum redundancy. The results from molecular analyses did not correspond to morphological traits, hence to establish of core collection we have to study both morphological and molecular markers, simultaneously. These results will provide an effective aid for future allele mining, association genetics, mapping and cloning gene(s), germplasm conservation, and promotion in breeding programs at future.

Keywords: Almond, Labeled-SSR marker, Morphology, Core collection.

چکیده

کلکسیون هسته مجموعه‌ای از نمونه‌های گزینش شده است که معرف تنوع ژنتیکی موجود در کلکسیون پایه می باشد. این استراتژی به منظور به حداقل رساندن هزینه حفاظت از ذخائر ژنتیکی با حفظ حداکثری تنوع ژنتیکی معرفی شده است. در این روش امکان ارزیابی سریع ژرم پلاسما و دسترسی آسانتر به کلکسیون پایه فراهم می شود. در این تحقیق، به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و تشکیل کلکسیون هسته، ۱۳۹ نمونه *Prunus dulcis* Mill. با منشأ متفاوت به کمک ۳۲ نشانگر ریزماهواره و برخی از صفات کمی و کیفی، مورد بررسی قرار گرفتند. در ارزیابی های مولکولی تعداد ۲۵۲ آلل مشاهده شد که میانگین تعداد آلل در هر مکان ژنی ۷/۷۵ بود. در آنالیز ساختار مبتنی بر مدل، پنج زیر جمعیت در کلکسیون پایه شناسایی شد که تا حدودی با نتایج تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر فاصله ژنتیکی منطبق بود. با استفاده از روش اکتشافی، به ترتیب کلکسیون هسته‌ای متشکل از ۲۰ و ۱۱۲ نمونه با استفاده از نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیک شناسایی شد که پوشش ۱۰۰٪ داشته و کمترین نمونه تکراری را دربرداشت. نتایج به دست آمده برای صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی با یکدیگر تطابق نداشت، از این رو برای تأسیس کلکسیون هسته باید هر دو نشانگر مطالعه شوند. نتایج این تحقیق می تواند کمک شایانی به کشف آلل ها، ژنتیک ارتباطی، نقشه یابی و همسانه سازی ژن‌ها، حفاظت از ژرم پلاسما و پیشرفت در برنامه‌های اصلاحی آینده بنماید.

واژه‌های کلیدی: *Prunus dulcis* Mill. نشانگر SSR نشان‌دار، مورفولوژی، کلکسیون هسته.

مقدمه

گیاه *Prunus dulcis* Mill. متعلق به خانواده Rosaceae و زیرخانواده Prunoideae می‌باشد. تعداد کروموزوم‌های شناسایی شده در این گونه مترادف با *P. amygdalus* Batsch ۱۶ عدد بوده و از نظر سطح پلوئیدی دیپلوئید است (Imani, 2000). بادام قدیمی‌ترین محصول خشکباری است که امروزه بالاترین میزان تولید را در میان این نوع محصولات به خود اختصاص می‌دهد. اجداد وحشی این گیاه در آسیای مرکزی یافت شده و بیشتر بومی مناطق کوهستانی خشک آسیای مرکزی و غربی می‌باشند. قرار گرفتن خویشاوند *Prunus dulcis* Mill. در این نوع شرایط آب و هوایی، بیانگر وجود ژن‌های مطلوب مقاومت به شرایط نامساعد محیطی در این گونه‌ها بوده و در نتیجه امکان پیدایش ارقام مقاوم بومی مورد انتظار خواهد بود و تنوع حاصل می‌تواند به‌عنوان منبع ژنتیکی مفید و متنوع در اصلاح بادام مورد استفاده قرار گیرد (Kester and Gradzeil, 1996). با توجه به این‌که کشور ما یکی از کشورهای دارای آب و هوای خشک بوده و کمبود آب در کشاورزی و باغبانی به‌عنوان یکی از ویژگی‌های طبیعی آن مطرح است، توسعه کشت و کار بادام در مناطق مناسب و شناخت ژرم‌پلاسم‌های آن امری ضروری است. علیرغم جایگاه شایسته ایران در تولید جهانی، ایران در بین بیست کشور اول صادرکننده بادام دنیا قرار ندارد که این مطلب می‌تواند دلایل متعددی داشته باشد. از جمله این دلایل می‌توان به نامناسب بودن ارقام برای بازارهای جهانی از نظر شکل و یا انبارداری و فقدان استانداردهای صادراتی، مسائل مرتبط با بسته‌بندی و نوسانات تولید سالانه و یا مشکلاتی نظیر گلدهی زود هنگام و آسیب‌پذیری در برابر سرمای دیررس بهاره، عملکرد

پائین و نیز خودناسازگاری اشاره کرد (Imani, 2000). بنابراین لازم است در تدوین برنامه‌های اصلاحی بادام به این موارد توجه شود. یکی از نخستین مراحل در برنامه‌های اصلاحی، بررسی ژرم‌پلاسم موجود از نظر صفات مختلف مورفو-پومولوژیک و مولکولی، ساماندهی و مدیریت ذخایر ژنتیکی موجود، تاسیس بانک‌های ژنی مختلف و نهایتاً انتخاب بهترین ارقام و ژنوتیپ‌ها برای به‌کارگیری در برنامه‌های اصلاحی و دستیابی به اهداف مورد نظر می‌باشد.

در سراسر جهان، بانک‌های ژن مجموعه‌ای از منابع ژنتیکی را برای مدت‌های طولانی حفظ می‌کنند تا در موقع لزوم به آسانی در اختیار متخصصان اصلاح، محققان و یا سایر کاربران قرار داده شوند. در طی ۲۵ سال گذشته، پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه ایجاد و حفاظت از این ذخایر ژنتیکی باارزش مشاهده شده است، اما در شرایط کنونی، بسیاری از مجموعه ژرم‌پلاسم‌های موجود با معضلاتی مانند اندازه و سازمان‌دهی روبرو شده‌اند. در برخی از این مجموعه‌ها، افزایش بیش‌ازحد تعداد نمونه، منجر به از دست رفتن هدف اصلی آنها، یعنی حفاظت و بهره‌برداری از تنوع ژنتیکی شده است. با توجه به این مطلب فرانکل در سال ۱۹۸۴ تاسیس کلکسیون‌های هسته را بر اساس کلکسیون‌های پایه موجود پیشنهاد کرد (Frankel and Soule, 1981; Frankel and Brown, 1984; Frankel, 1984). در کلکسیون‌های هسته ضمن حفظ بخش عمده‌ای تنوع ژنتیکی موجود در کلکسیون پایه، از تعداد نمونه‌ها کاسته می‌شود. لازم به ذکر است علی‌رغم شناسایی و تشکیل کلکسیون‌های هسته، باید کلکسیون پایه موجود نیز کماکان حفظ شود.

با مطرح‌شدن این مطلب، فعالیت‌های متعددی با استفاده از روش‌های مختلف برای تشکیل کلکسیون‌های هسته انجام شد و این کلکسیون‌ها به

این نشانگرها وجود دارد. با استفاده از ۱۸ صفت مورفولوژیک گروه های اکولوژیک زردآلوهای اروپایی ارزیابی شد. تنوع مشاهده شده کمتر از تنوع قابل انتظار بود. بیشترین تنوع در صفات مربوط به میوه مشاهده شد (Badenes *et al.*, 1998). با استفاده از ۲۰ صفت مورفولوژیک ۸۸ رقم *Prunus dulcis* Mill. در ایتالیا ارزیابی شد (De Giorgio and Polignano, 2001). در این تحقیق نیز صفات مربوط به میوه بیشترین تأثیر را در تفکیک ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف داشت. همچنین با استفاده از ۱۵ صفت مورفولوژیک بخشی از ژرم‌پلاسم زردآلو ترکیه مورد مطالعه قرار گرفت (Asma and Ozturk, 2005). بیشترین تنوع در صفات مربوط به زمان رسیدن، عملکرد، TSS، TA و وزن میوه، هسته و مغز مشاهده شد.

با استفاده از ۲۰ صفت مورفولوژیک ۱۲۰۰۰ دانهال زردآلو در ترکیه باهدف انتخاب والدین برای برنامه‌های اصلاحی بر مبنای خصوصیات رویشی و میوه انجام گردید (Asma and Ozturk, 2005). در گزارشی دیگر Rodrigues و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از ۲۶ ویژگی مورفولوژیک ۱۷ رقم آلبالو و گیلاس را ارزیابی نمودند و شباهت‌های زیادی را در بین ارقام آلبالو و گیلاس گزارش کردند (Rodrigues *et al.*, 2007).

تکنیک نشانگرهای ملکولی از نظر نوع داده‌های حاصل در هر روش، سطوح تاکسونومیکی که در آن بیشترین کاربرد و کارائی را دارند و نیز نیازهای تکنیکی و هزینه مورد نیاز، دارای تفاوت‌هایی هستند (Karp *et al.*, 1997). بنابراین، با توجه به کارایی متفاوت هر یک از نشانگرهای ملکولی، انتخاب هر یک از آنها به هدف مطالعه بستگی دارد که این امر به‌نوبه خود تابعی از سطوح تاکسونومیکی مواد مورد مطالعه (گونه‌ها، زیرگونه‌ها، جمعیت‌ها، ارقام و افراد مختلف) می‌باشد. گزینش نشانگر ملکولی مناسب به

عنوان ابزاری کارآمد در بهبود برنامه‌های حفاظتی و استفاده از تنوع ژنتیکی موجود در کلکسیون‌ها مورد قبول قرار گرفت. در این راستا، برنامه جهانی حفاظت و استفاده پایدار از ذخایر ژنتیکی گیاهان سازمان FAO، توسعه کلکسیون‌های هسته را به عنوان یکی از فعالیت‌های ضروری در بهبود استفاده از ذخایر ژنتیکی توصیه کرد. تا کنون کلکسیون‌های هسته برای تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی شامل گندم (Dong *et al.*, 2003; Spagonletti and Perry *et al.*, 1991; Quaslet, 1991; Wang *et al.*, 2004)، یونجه (Diwan *et al.*, 1995)، بادام‌زمینی (Holbrook and Anderson, 1995; Upadhyaya *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003)، برنج (Upadhyaya *et al.*, 2002)، سیب (Hokanson *et al.*, 1998)، هلو (Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008) و زردآلو ژاپنی (Gao *et al.*, 2005) احداث شده است. در ایجاد کلکسیون‌های هسته‌ای باید اطلاعات تاکسونومیک، مبدأ جغرافیایی و سازگاری‌های اکولوژیک هر ژنوتیپ در کلکسیون گردآوری شود. بررسی صفات مورفولوژیک، نشانگرهای ژنتیکی و داده‌های تکاملی (اگر در دسترس باشد) نیز برای توسعه و بهبود یک کلکسیون هسته مطلوب ضروری است (Van Hintum *et al.*, 2000).

روش‌های متعددی به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی کلکسیون هسته در گونه‌های گیاهی نزدیک و یا دور وجود دارد. نشانگرهای مورفولوژیک یکی از گزینه‌های مناسب در مطالعات تنوع ژنتیکی، تاکسونومی، طبقه‌بندی و اصلاح بشمار می‌آید، زیرا توارث این صفات می‌تواند بدون نیاز به روش‌ها و تکنیک‌های پیشرفته (مانند تکنیک‌های بیوشیمیایی و مولکولی) ارزیابی شود. گزارش‌هایی از ارزیابی ژرم‌پلاسم و جمعیت زردآلو و سایر هسته‌داران توسط

است که با تعداد کمتری نمونه می‌توان نتیجه بهتری را در مقایسه با سایر نشانگرها مانند RFLP گرفت. مشاهدات نشان داده است که ریز مایه‌ها به علت قابلیت تغییر در تعداد واحدهای تکراری، بسیار چند شکل هستند و به همین دلیل به عنوان نشانگر مهمی در نقشه‌یابی ژنتیکی و مطالعات جمعیتی برای بسیاری از موجودات مورد استفاده قرار می‌گیرد (Mango *et al.*, 2001).

۲۵ ژنوتیپ از گونه‌های مختلف جنس *Prunus* با استفاده از ۱۸ آغازگر ریزمایه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت و الگوی تکثیری مناسبی جهت بررسی تنوع و روابط ژنتیکی آنها مشاهده گردید (Serrano *et al.*, 2002). در راستای مطالعاتی که بر روی جنس *Prunus* در جهان صورت گرفته است، با استفاده از ۱۸ آغازگر SSR تنوع ژنتیکی بین ۳۰ رقم *Prunus dulcis* Mill. رقم ۲۰ هلو هسته‌جدا، ۱۵ رقم هلو هسته چسبان، ۱۰ پایه و ۱ گونه وحشی *Prunus dulcis* Mill. و هلو بررسی شد (Martinez-Gomez *et al.*, 2003). تنوع ژنتیکی ۷۶ ژنوتیپ گیلاس نیز، با کمک ۲۴ آغازگر SSR مورد مطالعه قرار گرفت (Hormoza *et al.*, 2002). همچنین در بررسی ۱۵ گونه از جنس *Prunus* با کمک نشانگرهای RAPD و SSR، تعداد نوارهای مشاهده شده در مورد نشانگر RAPD بیشتر از SSR بود، اما در مورد گروه‌های نزدیک به هم چندشکلی بیشتری در SSR مشاهده شد (Baranek *et al.*, 2006). تنوع ژنتیکی چهار گونه از بادام‌های وحشی ایرانی با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک، پروتئینی و DNA مورد بررسی قرار گرفت. در نشانگرهای مورفولوژیک، عرض برگ تفاوت معناداری را در بین این چهار گونه نشان داد، اما خصوصیات میوه تفاوت معنی‌داری نداشتند. نشانگر SSR هسته‌ای در مقایسه با سایر نشانگرها بیشترین چندشکلی را نشان داد. در

قابلیت دسترسی و هزینه هر یک از تکنیک‌ها نیز بستگی دارد. بخش اعظمی از ژنوم یوکاریوت‌ها شامل انواع متنوعی از DNA تکرار شونده است. زیرمجموعه‌ای از این توالی‌های تکرار شونده، حاوی تکرارهایی با موتیف‌های^۱ بسیار کوتاه (۶-۱ جفت باز) را معمولاً ریزمایه‌ها یا توالی‌های تکراری ساده (SSRs) می‌نامند. ریزمایه‌ها بسیار متنوع بوده و تقریباً از پراکنش یکسانی در طول ژنوم برخوردارند. توالی‌های ریزمایه‌ها در هر سه ژنوم یوکاریوت‌ها (هسته، کلروپلاست و میتوکندری) شناسایی شده است. ریزمایه‌های هسته‌ای از تنوع آلی و چندشکلی بسیار بالایی برخوردار هستند. این نشانگرها همباز بوده و دارای توارث مندلی می‌باشند. از آنجایی که مکان ژنی یک ریزمایه خاص، ژنوم بوده و توالی‌های مجاور آن در گونه‌های خویشاوند حفظ شده است، می‌توان از آغازگرهای ایجاد شده برای یک گونه به منظور تکثیر ریزمایه‌ها در سایر گونه‌های خویشاوند استفاده کرد. با توجه به این خصوصیات، این نشانگرها اهمیت بالایی در مطالعه ژنتیک جمعیت دارند (Naghavi *et al.*, 2005).

مهم‌ترین کاربرد نشانگرهای ریزمایه‌ها، مطالعه تنوع ژنتیکی، مطالعه فیلوژنی و تکاملی، تهیه نقشه ژنتیکی، همسانه‌سازی ژن‌ها، پژوهش‌های اکولوژیک و تکامل جمعیت‌ها، انتخاب به کمک نشانگرها، خالص‌سازی مواد ژنتیکی و انجام مطالعات سیتوژنتیکی است. استفاده از ریزمایه‌ها در مطالعات روابط خویشاوندی، تمایز ژنوتیپ‌ها و نقشه‌یابی ژنتیکی توسط محققان مختلف گزارش شده است (Foolad *et al.*, 1995; Lambert *et al.*, 2004; Zinalabedini *et al.*, 2007, 2010). یکی دیگر از مزایای ریزمایه‌ها در نقشه‌یابی ژنتیکی، این

کمی وزن هسته، طول و عرض هسته، وزن مغز، طول و عرض مغز، ضخامت مغز، درصد مغز درصد دوقلوئی و صفات کیفی شکل میوه، تاریخ گلدهی، تاریخ رسیدن، عادت باردهی و عادت رشد بود. این صفات بر اساس دستورالعمل^۱ IPGRI انتخاب گردید (Gülcan, 1985). در نهایت صفات مورفولوژیک در ارقام مختلف برآورد و از میانگین دو سال برای انجام آنالیزهای چند متغیره استفاده شد. اندازه‌گیری صفات کمی و کیفی برای دسته‌بندی ارقام مختلف به روش‌های متفاوت و مناسب هر یک انجام شد.

تجزیه‌های مولکولی

الف) استخراج DNA

در انجام مطالعات ملکولی از برگ‌های جوان برای استخراج DNA استفاده شد. بدین منظور برگ‌های جوان و عاری از هر نوع آلودگی از هر نمونه مورد مطالعه جدا و برای جلوگیری از تخریب احتمالی DNA ژنومی توسط نوکلئازهای درون سلولی، نمونه‌ها پس از انجماد در ازلت مایع تا زمان استخراج DNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس به وسیله کیت Core Bio، DNA ژنومی از برگ‌ها استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش‌های استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و اسپکتروفتومتری تعیین گردید.

ب) تجزیه SSR

در این تحقیق ۳۲ جفت آغازگر که در هلو و *Prunus dulcis* Mill. طراحی شده بود، استفاده گردید (Aranzana *et al.*, 2002; Cantini *et al.*, 2001; Cipriani *et al.*, 1999; Dirlewanger *et al.*, 2000; Testolin *et al.*, 2002) که مشخصات آنها

این تحقیق آنالیز پروتئین در کل دقت بالایی را برای توضیح روابط تاکسونومیک در این ۴ گونه نشان داد (Zeinalabedini *et al.*, 2008). در ارتباط با ژنوم اندامک‌ها، اطلاعات و مطالعات اندکی بر روی ریزماهوره‌های میتوکندری موجود است، اما امروزه از ریزماهوره‌های کلروپلاستی به طور روزافزونی در مطالعه ژنتیک جمعیت استفاده می‌شود. استفاده از آغازگرهای محافظت شده برای تکثیر cpSSRs و مطالعه ژنتیک جمعیت در Conifers، گندمیان و دولپه‌ای‌ها گزارش شده است (Navascues and Emerson, 2005).

هدف از این تحقیق، مطالعه ارقام و ژنوتیپ‌های امیدبخش *Prunus dulcis* Mill. ایرانی به کمک نشانگرهای ملکولی ریزماهوره و برخی از صفات مورفولوژیک است که با شناسایی پتانسیل ژنتیکی و مورفو-پومولوژیک آنها، برنامه‌های معرفی رقم و اصلاح ارقام و نیز تشکیل کلکسیون هسته تسریع و تسهیل می‌گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی این مطالعه شامل ۱۳۹ ژنوتیپ و رقم *Prunus dulcis* Mill. بود که از مزرعه کمال‌آباد کرج جمع‌آوری گردید. اسامی ژنوتیپ‌ها و منشأ هر کدام در جدول ۱ آمده است. کلیه مراحل مولکولی در بخش تحقیقات ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج و بخش ارزیابی مورفولوژیک در بخش باغبانی مؤسسه اصلاح بذر و نهال کرج انجام شد.

مطالعات مورفولوژیک

این آزمایش در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی با پنج تکرار برای هر صفت در دو سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ انجام شد. ارزیابی‌های مورفولوژیک شامل صفات

واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل ۱۰ چرخه حرارتی تاج داوون و متعاقباً ۲۵ چرخه با دمای اتصال مشخص برای هر آغازگر انجام شد. محصولات حاصل از واکنش زنجیره پلیمرز در الکتروفورز عمودی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۶ درصد و توسط دستگاه DNA (Analyser 4300) تفکیک و ارزیابی شدند.

در جدول ۲ آورده شده است. تکثیر قطعات با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biorad در حجم کلی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش حاوی ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (۲۰ نانوگرم)، ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱۰X، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (2mM) ۰/۷۵، ۰/۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای F و R، ۱/۲ میکرولیتر Taq DNA پلیمرز، ۱/۲ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار و ۸/۷ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. چرخه‌های حرارتی شامل یک مرحله

جدول ۱- نام و محل نمونه برداری ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در آزمایش کاربرد نشانگرهای ریزوماهواره و برخی از صفات مورفولوژیک در شناسایی کلکسیون‌های هسته بادام

ردیف	Cultivar Name	Accession Code	Origin	ردیف	Cultivar Name	Accession Code	Origin	ردیف	Cultivar Name	Accession Code	Origin
۱	H5-6	A1	کرج	۳۶	Nonpariel	H14	امریکا	۷۱	D-11	H54	قزوین
۲	D-99	A10	کرج	۳۷	Perlis	H15	امریکا	۷۲	H11-8	H55	قزوین
۳	Sahand	A11	تبریز	۳۸	116	H16	کرج	۷۳	H2-7	H57	شیراز
۴	H6-8	A12	کرج	۳۹	1624	H17	کرج	۷۴	H-21	H59	کرج
۵	Supemova	A14	ایتالیا	۴۰	44	H18	کرج	۷۵	H121	H6	کرج
۶	D-11	A15	کرج	۴۱	839	H19	کرج	۷۶	H12-24	H62	کرج
۷	H10-11	A16	کرج	۴۲	Tuono	H2	ایتالیا	۷۷	Sahand	H64	تبریز
۸	A18	A18	کرج	۴۳	1630	H20	کرج	۷۸	H2-34	H66	کرج
۹	A19P	A19P	کرج	۴۴	108	H21	کرج	۷۹	H4-14	H67	کرج
۱۰	Sh-12	A2	کرج	۴۵	15	H22	شاهرود	۸۰	H1-32	H69	کرج
۱۱	A21	A21	کرج	۴۶	416	H23	کرج	۸۱	H56	H7	کرج
۱۲	A22	A22	کرج	۴۷	Fragilo	H24	ایتالیا	۸۲	H9-24	H70	کرج
۱۳	A23	A23	کرج	۴۸	Marcona	H25	اسپانیا	۸۳	Falsabares	H71	ایتالیا
۱۴	A24	A24	کرج	۴۹	Supemova	H26	ایتالیا	۸۴	H4-13	H72	کرج
۱۵	A25	A25	کرج	۵۰	D101	H27	کرج	۸۵	H5-27	H73	کرج
۱۶	A26	A26	کرج	۵۱	Rabie	H28	شهرکرد	۸۶	H8-24	H74	کرج
۱۷	A27	A27	کرج	۵۲	1312	H29	کرج	۸۷	Padri	H75	آمریکا
۱۸	A29	A29	کرج	۵۳	H932	H3	کرج	۸۸	Neplus	H76	آمریکا
۱۹	A30	A30	کرج	۵۴	Sh6	H30	کرج	۸۹	H2-27	H78	کرج
۲۰	A31	A31	کرج	۵۵	1340	H31	کرج	۹۰	H2-9	H79	کرج
۲۱	A32	A32	کرج	۵۶	1910	H33	کرج	۹۱	Mission	H8	آمریکا
۲۲	A33	A33	کرج	۵۷	8bala	H34	کرج	۹۲	D-99	H80	کرج
۲۳	A34	A34	کرج	۵۸	517	H35	کرج	۹۳	D-88	H81	کرج
۲۴	A35	A35	کرج	۵۹	Caramel	H37	آمریکا	۹۴	Mission	H82	آمریکا
۲۵	A36	A36	کرج	۶۰	H317	H38	کرج	۹۵	Roby	H83	آمریکا
۲۶	H9-7	A4	کرج	۶۱	H118	H4	کرج	۹۶	D-124	H85	کرج
۲۷	H5-7	A5	کرج	۶۲	H38	H42	کرج	۹۷	H3-16	H86	کرج
۲۸	A230	A6	اسپانیا	۶۳	Azar	H43	تبریز	۹۸	Shokofeh	H87	تبریز
۲۹	Sefid	A7	شهرکرد	۶۴	H125	H46	کرج	۹۹	H3-19	H89	کرج
۳۰	Shahrood21	A8	ناشناخته	۶۵	H3-11	H49	کرج	۱۰۰	H49	H9	کرج
۳۱	Rabie	A9	شهرکرد	۶۶	H64	H5	کرج	۱۰۱	A200	H91	اسپانیا
۳۲	A230	H1	اسپانیا	۶۷	H9-7	H50	کرج	۱۰۲	Boty	H92	آمریکا

۳۳	10	H10	۶۸	شاهرود	Flipseo	H51	ایتالیا	۱۰۳	Rabie	S1	کرج
۳۴	1625	H11	۶۹	کرج	H6-5	H52	قزوین	۱۰۴	Z-3	S10	شیراز
۳۵	1424	H12	۷۰	کرج	H7-11	H53	قزوین	۱۰۵	Shokofeh	S11	تبریز
۱۰۶	H3-12	S12	۱۱۸	کرج	Mamaii	S36	کرج	۱۳۰	H16-3	S48	کرج
۱۰۷	Shahrood15	S16	۱۱۹	ناشناخته	H8-24	S37	کرج	۱۳۱	B-21	S49	کرج
۱۰۸	Shahrood21	S2	۱۲۰	ناشناخته	H3-8	S38	کرج	۱۳۲	H13-18	S50	کرج
۱۰۹	H2-40	S21	۱۲۱	کرج	Shahrood21	S39	ناشناخته	۱۳۳	H14-8	S51	کرج
۱۱۰	H10-13	S23	۱۲۲	کرج	Z-8	S4	شیراز	۱۳۴	H12-22	S52	کرج
۱۱۱	D-5	S24	۱۲۳	کرج	Saba	S41	کرج	۱۳۵	H14-4	S53	کرج
۱۱۲	H4-4	S25	۱۲۴	کرج	Marcona	S42	اسپانیا	۱۳۶	Falsa	S54	ایتالیا
۱۱۳	H8-3	S26	۱۲۵	کرج	H4-14	S43	کرج	۱۳۷	H14-5	S56	کرج
۱۱۴	H7-6	S28	۱۲۶	کرج	H1-16	S44	کرج	۱۳۸	Z-26	S7	شیراز
۱۱۵	H10-2	S29	۱۲۷	کرج	H13-40	S45	کرج	۱۳۹	Sefid	S8	شهرکرد
۱۱۶	Ferajilo	S30	۱۲۸	ایتالیا	Flipseo	S46	ایتالیا				
۱۱۷	Z-36	S31	۱۲۹	شیراز	B-9	S47	کرج				

جدول ۲- مشخصات نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در شناسایی کلکسیون هسته نمونه‌های شماره‌دار بادام

Primer Name	Primer Sequence	Tm (°C)
CPPCT017	TGACATGCATGCACTAAACAA TGCAAATGCAATTTTCATAAAGG	60
CPPCT006	AATTAACCTCCAACAGCTCCA ATGGTTGCTTAATTCAATGG	59
UDP97-401	TAAGAGGATCATTTCCTGCTG CCCTGGAGGACTGAGGGT	58
UDP98-405	ACGTGATGAACTGACACCCA GAGTCTTTGCTCTGCCATCC	58
BPPCT010	AAAGCACAGCCCATAATGC GTACTGTTACTGCTGGGAATGC	57
BPPCT024	GAGGAATGTGCCTCTTCTGG CTCCCGTACGCGTTTACC	58
pchgms2	GTCAATGAGTTCAGTGTCTACTC AATCATAACATCATTACGCCACTGC	57
BPPCT036	AAGCAAAGTCCATAAAAACGC GGACGAAGACGCTCCATT	57
pchgms3	ACGGTATGTCCGTACTCTCCATG CAACCTGTGATTGCTCTATTAAC	57
pchgms29	CCTGAAGAAGGTGGACCAGA CCTCCAATTCAAATTCCT	50
M1a	CACGAGGCGCCATTCTACG GTACGACGGGTTTTGGCTCA	55
UDP98-021	AAGCAGCAATTGGCAGAATC GAATATGAGACGGTCCAGAAGC	58
UDP98-408	ACAGGCTTGTGAGCATGTG CCCTCGTGGGAAAATTTGA	58
UDP98-412	AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC GCTGAAGACGACGATGATGA	57
UDP98-416	TTTTCTCAGCAGCCAAACAA ATGTTTCGTGCTTCTGCTCC	58
UDP96-013	ATTCTTCACTACACGTGCACG CCCCAGACATACTGTGGCTT	58
AMPA121	TGGTGTGGTGTGTTGTTTTGAAG ACCAACTCCATCCACATTTCTC	55
UDP97-403	CTGGCTTACAACCTCGCAAGC CGTCGACCAACTGAGACTCA	58
UDP98-406	TCGGAAGTGGTAGTATGAACAGA ATGGGTCGTATGCACAGT	58
UDP98-024	CCTTGATGCATAATCAAACAGC GGACACACTGGCATGTGAAG	60
BPPCT011	TCTGAGGGCTAGAGTGGGC	58

aprigms18	TGTTTCAGGAGTCGAACAGC TCTGAGTTCAGTGGGTAGCA ACAGAATGTGCGTTGCTTTA	58
UDP96-008	TTGTACACACCCTCAGCCTG TGCTGAGGTTTCAGGTGAGTG	58
UDP96-019	TTGGTCATGAGCTAAGAAAACA TAGTGGCACAGAGCAACACC	58
UDP98-414	AAAAGGCACGACGTTGAAGA TTCAGATTGGGAATTTGCAG	58
CPPCT024	TTCTCCAAAAACAAAACC TCATTGGCTGCTAAGTGTCT	50
UDP98-410	AATTTACCTATCAGCCTCAA TTTATGCAGTTTACAGACCG	58
BPPCT016	GATTGAGAGATTGGGCTGC GAGGATTCTCATGATTGTGC	57
UDP98-025	GGGAGGTTACTATGCCATGAAG CGCAGACATGTAGTAGGACCTC	57
pchgms12	CGACACTTAGCTAGAAGTTGCCTTA TCAAGCTCAAGGTACCAGCA	60
UDP96-005	GTAACGCTCGCTACCACAAA CACCCAGCTCATAACCTCA	58
UDP98-411	AAGCCATCCACTCAGCACTC CCAAAAACAAAACCAAAGG	58

ج) تجزیه و تحلیل آماری

امتیازدهی نوارهای ریزماهوره حاصل به صورت صفر و یک و نیز بر اساس اندازه صورت گرفت تا در برخی از آنالیزها و نرم‌افزارها مورد استفاده قرار گیرد. ارزیابی شاخص‌های تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای و ساختار جمعیت به کمک نرم‌افزارهای 3.25 Structure و SplitTree 4, PowerMarker انجام گردید (Husn and Bryant, 2006; Varshney *et al.*, 2005). در روش مبتنی بر مدل بهترین K با توجه به معیارهای ΔK و $\ln P(D)$ انتخاب گردید (Evanho *et al.*, 2005). پارامترهای تنظیمی در این مدل عبارتند از: K (تعداد زیر جمعیت‌ها) که بین ۱ تا ۱۰ برای داده‌های SSR و ۳ مرتبه تکرار برای هر K تعیین گردید؛ مدل مختلط؛ یعنی در نظر گرفتن این‌که هر ژنوتیپ بخشی از ژنوم خود را از زیر جمعیت‌های دیگر دریافت کرده است؛ مرتبه اجراء و تکرار MCMC که برابر ۳۰۰۰۰ در نظر گرفته شد تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. در این مطالعه نمودار شبکه‌های فیلوژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها بر اساس ماتریس‌های فاصله ژنتیکی حاصل به روش Neighbor-net (تغییر یافته

روش Neighborjoining)، با ضریب فاصله ژنتیکی Uncorrected_P و با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap با استفاده از نرم‌افزار SplitsTree4 ترسیم شدند. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای صفات مورفولوژیک، یکی از تکنیک‌های چند متغیره است که در تجزیه تنوع ژنتیکی دارای کاربرد زیادی است. هدف عمده از این تجزیه، ترسیم روابط افراد و نمایش آنها در ساختار فضایی بر اساس محورهای اصلی می باشد. در این تحقیق PCA با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. شناسایی کلکسیون هسته با استفاده از صفات مورفولوژیک و نیز نشانگرهای ریزماهوره به کمک استراتژی M انجام شد. این روش الگوریتم تغییر یافته Heuristic است که برای تشکیل کلکسیون هسته با استفاده از صفات کمی و کیفی و نیز نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود.

نتایج و بحث

تجزیه مورفولوژیک

نتایج تجزیه واریانس ویژگی‌های مورد مطالعه برای ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد که برای تمام ویژگی‌های پارامتریک اندازه‌گیری شده، تفاوت

A21, Sh-12, D-88, H3-11, H317, 11K, H4-14H67, H1-16, Fragilo, H3-16, Padri, H12-22, H3-12, Falsa, A18, Azar, B-9, ۱۰۸, Boty, H9-7, D101, H8-24H74, Mamaii, A200, Sefid, Caramel, D-5, A31, Shokofeh و A33. در مقابل با استفاده از روش Heuristic تعداد ارقام و ژنوتیپ‌های کلکسیون هسته به ۲۰ ژنوتیپ تقلیل یافت: Mamaii, H12-22, Neplus, Mission, Shahrood15, Sefid, Marcona, H8-24H74, D-5, H3-12, Azar, ۱۰۸, Saba, Falsa, Shokofeh, B-9, Caramel, D-88, Z-26, Sh-12

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

در این مطالعه نیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر روی صفات کمی با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. سه محور نخست با یکدیگر ۷۲/۱ درصد از تغییرات کل را توجیه کرد. مؤلفه اول با توجیه ۴۰/۱ درصد از تغییرات بالاترین ضرایب و مؤلفه دوم با توجیه ۱۷/۹ درصد از واریانس، و مؤلفه سوم نیز با توجیه ۱۳/۱ درصد از تغییرات کل در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. در عامل اول عمدتاً صفات مربوط به ابعاد میوه و مغز وجود دارد. در این عامل صفات طول و عرض میوه، طول و عرض مغز مشاهده می‌شود که با وزن مغز ارتباط مستقیم و همبستگی بالایی دارد. در عامل دوم، وزن میوه مشاهده می‌شود که با درصد مغز و دوقلوئی ارتباط معکوس دارد که این امر طبیعی است. در عامل سوم نیز طول و ضخامت مغز با ارتباط معکوس یا همبستگی منفی مشاهده می‌شود. از آنجاکه صفات موجود در مؤلفه اول بیشترین میزان واریانس را توجیه می‌کنند، می‌توانند بیشترین تأثیر را در تفکیک ارقام و ژنوتیپ‌های بادام داشته باشند.

معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. مقایسه میانگین ویژگی‌ها با استفاده از آزمون دانکن، تفاوت میان ژنوتیپ‌ها و ارقام را نشان می‌دهد (جدول ۳). بیشترین وزن میوه خشک متعلق به رقم D-88 (۹/۷۲ گرم) بود. در حالی که کم‌ترین وزن میوه خشک در Carmel (۱/۲۸ گرم) مشاهده شد. به طوری که بیشترین وزن مغز متعلق به رقم فیلیپسئو (۲/۲۲ گرم) بود. در حالی که کم‌ترین وزن میوه خشک در ۴۴ (۰/۵۴ گرم) مشاهده شد. سایر ارقام مابین این دو دامنه قرار دارند. نتایج ارائه شده بیشترین طول مغز متعلق به رقم H12-22 (۳۹/۱۲ میلی‌متر) بود. در حالی که کم‌ترین طول مغز در ۱۰۸ (۱۰/۰۹ میلی‌متر) مشاهده شد. بیشترین درصد مغز متعلق به D5 (۶۶/۷۲٪) بود. در حالی که کم‌ترین درصد مغز در ۴۴ (۱۹/۰۳٪) مشاهده شد (جدول ۳).

تشکیل کلکسیون هسته براساس صفات مورفولوژیک
بعد از بررسی‌های اولیه صفات مورفولوژیک، از این صفات در شناسایی کلکسیون هسته استفاده شد. بدین منظور ابتدا گروه‌های مختلف بر اساس هر یک از این صفات شناسایی گردید. هر یک از ارقام و ژنوتیپ‌ها، بر اساس میانگین صفت مورد نظر به یک کلاس خاص تخصیص داده می‌شود بعد از تشکیل گروه‌های مورد نظر، از آنالیز تصادفی برای گزینش نمونه‌ها استفاده گردید. البته در ادامه از روش ارزیابی عملکردی ابتکاری^۱ نیز استفاده شد که تا حدودی سخت‌گیرانه‌تر و دقیق‌تر است.

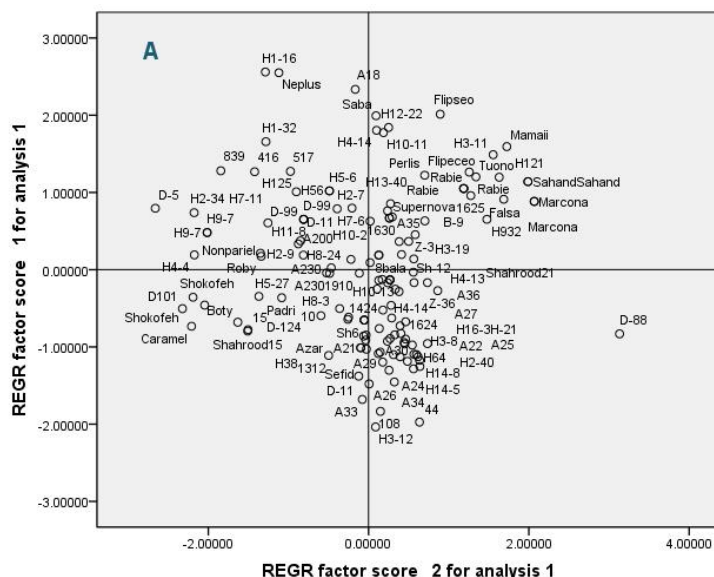
از بین نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از روش M، و با تعداد ۱۴ صفت مورفولوژیک کمی و کیفی، ۳۰ رقم و ژنوتیپ با استفاده از روش Non- heuristic (تصادفی) به عنوان کلکسیون هسته معرفی گردید. این ارقام و ژنوتیپ‌ها عبارتند از: D-

جدول ۳- تجزیه واریانس ویژگی‌های مورفولوژیک در ژنوتیپ‌ها و ارقام بادام

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		وزن هسته	طول هسته	ضخامت هسته	وزن مغز	طول مغز	عرض مغز	ضخامت مغز	
ژنوتیپ/ رقم	۱۳۸	۵/۱۱۰۹**	۲۲/۱۰۱**	۷۲/۲۶**	۰/۴۹۱**	۸۴/۷۹۷**	۱۸/۷۹**	۲۴/۵۰**	۴۸۶/۹۹**
تکرار	۴	۰/۰۷۴	۲/۳۳	۰/۴۸	۰/۰۳	۲/۳۷۲	۱/۰۴	۱/۲۰	۲۸/۷۸
خطای آزمایشی	۵۵۲	۰/۱۸۵۷	۲/۶۷	۱/۵۱	۰/۰۲۲	۷/۷۸۷	۱/۸۶	۱/۳۵۰	۲۵/۶۵
ضریب تغییرات		۱۲/۵۸	۶/۲۱	۶/۹۱	۱۳/۲۴	۱۱/۸۴	۱۰/۹۹	۱۴/۲۵	۱۴/۵۷

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت در میان صفات مورفولوژیک، صفات مربوط به ابعاد میوه و مغز کارایی تشخیصی بهتری دارند. با توجه به نتایج به دست آمده ارقام و ژنوتیپ‌هایی را که از نظر خصوصیات میوه و بازارپسندی بالاتری برخوردارند را می‌توان شناسایی کرد (شکل ۱). در این نمودار ارقامی را که ابعاد میوه و مغز آنها بزرگ‌تر بوده و در عین حال درصد مغز بالاتری دارند را می‌توان از سایر ارقام تفکیک نمود (A). روابط به دست آمده در این تحقیق در سایر تحقیقات نیز مشاهده شده است. در یک تحقیق مشاهده شد که ارقامی با پوست ضخیم‌تر درصد مغز کمتری دارند (Mousavi Ghahfarokhi et al., 2010). در آزمایش دیگری همبستگی بین ابعاد میوه در ارقام مختلف اندازه‌گیری شد و گزارش گردید که طول هسته، عرض هسته، ضخامت هسته، وزن هسته، طول مغز، عرض مغز، ضخامت مغز و وزن مغز به صورت دو طرفه با یکدیگر در سطوح ۱ و ۵ درصد دارای همبستگی معنی‌دار مثبتی هستند (Bahmani et al., 2002). با آگاهی از همبستگی بین صفات مورفولوژیک می‌توان به وضعیت صفاتی که برای پی بردن به آنها نیاز به زمان طولانی‌تری بوده و برای بررسی این صفات گیاه باید وارد مرحله باروری شود، در همان سال اول و از روی صفات رویشی به آنها پی برد. در تحقیقی به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های برتر بادام در منطقه بروجرد، برخی از صفات میوه را مورد بررسی قرار گرفت و همبستگی بین صفات مورد نظر را مشخص کردند. بر اساس نتایج، وزن مغز با طول، عرض و ضخامت میوه و همچنین با طول، عرض و ضخامت مغز همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد داشت (Ali et al., 2008). وزن، اندازه و شکل مغز *Prunus dulcis* Mill. تابع شرایط ژنتیکی و باغبانی بوده و در عملکرد نقش زیادی دارند. اندازه مغز تحت تأثیر مقدار محصول، قدرت درخت، رطوبت خاک و محیط می باشد (Imani, 2000).

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت در میان صفات مورفولوژیک، صفات مربوط به ابعاد میوه و مغز کارایی تشخیصی بهتری دارند. با توجه به نتایج به دست آمده ارقام و ژنوتیپ‌هایی را که از نظر خصوصیات میوه و بازارپسندی بالاتری برخوردارند را می‌توان شناسایی کرد (شکل ۱). در این نمودار ارقامی را که ابعاد میوه و مغز آنها بزرگ‌تر بوده و در عین حال درصد مغز بالاتری دارند را می‌توان از سایر ارقام تفکیک نمود (A). روابط به دست آمده در این تحقیق در سایر تحقیقات نیز مشاهده شده است. در یک تحقیق مشاهده شد که ارقامی با پوست ضخیم‌تر درصد مغز کمتری دارند (Mousavi Ghahfarokhi et al., 2010). در آزمایش دیگری همبستگی بین ابعاد میوه در ارقام مختلف اندازه‌گیری شد و گزارش گردید که طول هسته، عرض هسته، ضخامت هسته، وزن هسته، طول مغز، عرض مغز، ضخامت مغز و وزن مغز به صورت دو طرفه با یکدیگر در سطوح ۱ و ۵ درصد دارای همبستگی معنی‌دار مثبتی هستند (Bahmani et al., 2002).



شکل ۱- نمودار تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ارقام و ژنوتیپ‌های *Prunus dulcis* Mill. بر اساس صفات مورفولوژیک.

تجزیه‌های مولکولی

پس از تکثیر DNA هدف توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، محصولات PCR در ژل اکرلامید ۶ درصد در دستگاه لایکور بارگذاری شدند. پس از امتیازدهی و تجزیه داده‌های حاصل از ۳۲ نشانگر SSR در مجموع ۲۵۲ آلل با الگوی نواری واضح مشاهده شد، بطوریکه نشانگر pchgms12 با ۱۶ آلل و نشانگرهای UDP97-401 و UDP98-406 با ۱۵ آلل بیشترین تعداد آلل و نشانگر UDP97-403 با ۲ آلل و نشانگرهای UDP98-416، aprigms18، BPPCT016 و UDP96-013 با ۳ آلل کم‌ترین تعداد آلل را داشتند. بالاترین فراوانی آلل غالب در نشانگر UDP97-403 برابر با ۰/۸۸ و کم‌ترین فراوانی آلل غالب ۰/۱۹ در نشانگر pchgms29 مشاهده شد. تعداد آلل مشاهده شده در هر جایگاه بر میزان فراوانی آلل غالب تأثیرگذار بوده به‌طوری‌که با کم بودن تعداد آلل‌های یک جایگاه فراوانی بین تعداد آلل کمتری توزیع می‌شود و فراوانی آلل غالب بیشتر می‌گردد.

در برنامه‌های اصلاحی نحوه انتخاب والدین و آگاهی از نحوه توارث صفات مورد نظر از اهمیت بالایی برخوردار است و توجه به این عوامل در بالا بردن کارایی برنامه‌های اصلاحی و حصول نتایج مطلوب در اصلاح درختان میوه از جمله *Prunus dulcis* Mill. دارای اهمیت زیادی است. صفات مهمی چون مشخصات درخت، دیر گل دهی، تراکم گلدهی، عملکرد، زمان رسیدن، خصوصیات خشک میوه [شامل وزن، شکل، ابعاد (طول، عرض و قطر)، سختی پوست چوبی]، خصوصیات مغز (شامل درصد مغز یا نسبت وزن خشک میوه به مغز، ضخامت مغز، شکل، اندازه، وزن، چروکیدگی، رنگ و طعم مغز) و خودسازگاری همواره از اهمیت بالایی در برنامه‌های اصلاحی *Prunus dulcis* Mill. برخوردار بوده و همبستگی و نحوه توارث این صفات توسط اصلاح‌گران این گیاه مورد توجه قرار گرفته است (Kester and Gradzeil, 1996).

جدول ۴- تعداد آلل، تعداد آلل موثر، فراوانی آلل غالب، هتروزیگوسیتی، تنوع ژنی، محتوای اطلاعات پلی مورفیک (PIC) و ضریب اینبریدینگ نشانگر ریزماهواره در ارقام و ژنوتیپ‌های بادام مورد مطالعه

Marker	Na	Ae	Major Allele Frequency	Gene Diversity	Heterozygosity	PIC	f
CPPCT017	8	4.49	0.42	0.75	0.38	0.72	0.49
CPPCT006	5	2.42	0.52	0.63	0.50	0.57	0.21
UDP97-401	15	11.46	0.40	0.81	0.47	0.80	0.41
DP98-405	4	1.69	0.56	0.57	0.12	0.50	0.80
BPPCT010	8	3.99	0.33	0.78	0.33	0.75	0.58
BPPCT024	8	1.34	0.82	0.32	0.23	0.31	0.27
pchgms2	5	2.74	0.34	0.72	0.54	0.67	0.26
BPPCT036	5	3.23	0.28	0.76	0.44	0.72	0.43
pchgms3	9	4.58	0.27	0.82	0.49	0.80	0.41
pchgms29	14	7.75	0.19	0.88	0.63	0.87	0.28
M1a	11	8.35	0.20	0.89	0.88	0.88	0.02
UDP98-021	6	2.72	0.66	0.52	0.27	0.48	0.48
UDP98-408	8	5.81	0.40	0.78	0.53	0.75	0.32
UDP98-412	8	5.70	0.64	0.57	0.14	0.55	0.76
UDP98-416	3	2.09	0.42	0.66	0.08	0.60	0.88
AMPA121	10	5.21	0.21	0.84	0.69	0.82	0.18
UDP97-403	2	1.16	0.88	0.21	0.14	0.20	0.32
UDP98-406	15	6.46	0.26	0.85	0.60	0.83	0.29
UDP98-024	13	7.44	0.25	0.86	0.63	0.85	0.27
BPPCT011	13	5.78	0.28	0.83	0.44	0.81	0.48
aprigms18	3	2.02	0.56	0.62	0.59	0.57	0.05
UDP96-008	4	1.78	0.45	0.64	0.24	0.57	0.62
UDP96-019	14	5.89	0.29	0.83	0.58	0.81	0.30
UDP98-414	7	4.83	0.24	0.83	0.32	0.80	0.61
CPPCT024	6	2.23	0.40	0.70	0.52	0.65	0.27
UDP98-410	7	5.32	0.78	0.39	0.13	0.38	0.67
BPPCT016	3	2.04	0.56	0.62	0.60	0.57	0.04
UDP98-025	7	1.71	0.50	0.63	0.32	0.56	0.49
pchgms12	16	9.00	0.20	0.89	0.68	0.88	0.23
UDP96-005	4	2.00	0.50	0.63	0.06	0.56	0.90
UDP98-411	4	2.42	0.49	0.68	0.55	0.63	0.20
UDP96-013	3	1.88	0.65	0.52	0.04	0.46	0.92
Mean	7.75	4.23	0.44	0.69	0.41	0.65	0.40

قرار داشت. با مشاهده دامنه متفاوت اندازه آلل‌های این نشانگرها، از نشانگرهایی که اندازه آللی آن‌ها با هم همپوشانی ندارند، می‌توان برای انجام PCR مرکب استفاده کرد. نشانگرهای UDP97-401 و pchgms12 به ترتیب با مقادیر ۱۱/۴۶ و ۹ بیشترین

اندازه کوچک‌ترین قطعات مربوط به جایگاه M1a با طول ۶۵ جفت باز و بزرگ‌ترین قطعه مربوط به جایگاه BPPCT036 با طول ۲۶۳ جفت باز بود. بقیه آغازگرها قطعاتی را تکثیر نمودند که اندازه آن‌ها در دامنه‌ای بین آغازگرهای M1a و BPPCT036

جمله نشانگرهای pchgms12، UDP97-401 و M1a با مقادیر تعداد آل مؤثر، PIC، و هتروزیگوسیتی بالا کارآمدترین نشانگرها در بین نشانگرهای به کار رفته هستند و این نشانگرها می‌توانند بهتر از سایر ترکیب‌های استفاده شده فاصله ژنتیکی ارقام و دورگه‌ها را مشخص کنند (جدول ۴).

تجزیه روابط فیلوژنتیکی با روش Neighbor-net
با بررسی دندروگرام حاصل از نرم‌افزار 4 SplitsTree، مشاهده می‌شود که ارقام و ژنوتیپ‌های *Prunus dulcis* Mill. مورد بررسی در گروه‌های اصلی مشخصی قرار نگرفته‌اند. دلیل این اختلاط ژنتیکی، اشتراک والدین اکثر این ژنوتیپ‌ها در برنامه‌های اصلاحی می‌باشد (شکل ۲).

تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت با روش مبتنی بر مدل
جهت اطلاع از وجود ساختار یا وجود زیر جمعیت‌های احتمالی در ژرم‌پلاسم مورد مطالعه، از روش مبتنی بر مدل Bayesian استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار Structure2.3 فرض $K=2$ تا $K=10$ اجرا گردید (K نشان دهنده تعداد گروه‌ها) و سپس بر مبنای معیارهای $\ln P(D)$ و ΔK صحیح‌ترین گروه‌بندی مشخص شد. در این مطالعه بر اساس معیارهای فوق، $K=5$ بهترین تعداد گروه بوده که این گروه‌ها بارنگ‌های مجزا مشخص شده است (شکل ۳).

اختلاط شدید موجود در بین نمونه‌ها در شکل ۳ به خوبی مشخص می‌باشد. این شکل اثبات می‌کند که تقریباً هیچ یک از نمونه‌ها کاملاً در یک دسته مجزا قرار نمی‌گیرند. ضمناً ارتباط ظاهری بین نمونه‌های خالص‌تر متعلق به یک گروه خاص نیز یافت نشد. اختلاط شدید مشاهده شده در این ژرم‌پلاسم، این فرض که تبار نمونه‌های مورد مطالعه از نوع مخلوط باشد، را به اثبات می‌رساند. یعنی فرد i

تعداد آل مؤثر و نشانگر UDP97-403 با مقدار $1/16$ کم‌ترین تعداد آل مؤثر را داشتند. بالا بودن مقدار این آماره بیانگر فراوانی یکسان آل‌های موجود در این جایگاه و پائین بودن این آماره بیانگر فراوانی زیاد یک آل و نادر بودن بقیه آل‌ها در نمونه‌هاست. با بررسی مقادیر محتوای اطلاعات چند شکل نشانگرهای M1a و pchgms12 با مقدار $0/88$ و نشانگر UDP97-403 با مقادیر PIC $0/2$ به ترتیب بیشترین و کم‌ترین مقادیر PIC را دارا بودند. بالا بودن مقدار PIC در این نشانگر بیانگر وجود تعداد آل‌های زیاد و فراوانی زیاد چندشکلی برای این جایگاه است.

در بررسی تنوع آلی نشانگر M1a بالاترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده را برابر ۱ و نشانگر UDP96-013 کم‌ترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده را برابر $0/04$ نشان دادند. همچنین نشانگر M1a بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار را در حدود $0/89$ و نشانگر UDP97-403 کم‌ترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار را در حدود $0/21$ نشان دادند. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده $(H_o=0/41)$ کمتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار $(H_e=0/69)$ بود که این مسئله موجب مثبت بودن میانگین ضریب اینبریدینگ می‌گردد $(F_{is}=0/4)$. مثبت بودن ضریب اینبریدینگ می‌تواند به دلیل هوموزیگوس بودن برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی یا وجود آل‌های نول باشد. در تحقیقی مشابه Turkoglu و همکاران (۲۰۱۰) با مطالعه روابط ژنتیکی بین ۲۳ پایه گونه‌های مختلف جنس *Prunus* با استفاده از ۱۰ جفت نشانگر SSR، ۱۰۸ آل کل شناسایی و میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار را در حدود $0/7$ و هتروزیگوسیتی مشاهده شده را در حدود $0/6$ برآورد کردند. با توجه به نتایج به دست آمده، می‌توان نتیجه گرفت که برخی از نشانگرها از

حاصل از این دو روش و عدم تفکیک ارقام و ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره مورد استفاده، توصیه می‌شود برای مطالعات بررسی روابط خویشاوندی در این گونه ژرم‌پلاسماها از نشانگرهایی استفاده شود که چندشکلی پائین‌تری دارند و یا می‌توان از نشانگرهای ریزماهوره Genic استفاده نمود.

تشکیل کلکسیون هسته با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

آگاهی از تنوع ژنتیکی موجود در مواد اصلاحی در دسترس پیش‌نیازی برای برنامه‌های اصلاحی هر محصول می‌باشد. ارزیابی میزان و توزیع تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی و ارتباط آنها در فهم الگوی تنوع و ارتباطات تکامل میان ژنوتیپ‌ها ضروری است و این مساله به هر چه بهتر شدن منابع ژنتیکی، حفظ و توسعه آنها کمک خواهد نمود (Zeinalabedini et al., 2010). تخمین تشابه یا تفاوت ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها در گزینش ترکیبات والدینی برای ایجاد جمعیت‌های در حال تفرق جهت تشریح و بهره‌گیری از QTL که از طریق انتخاب به کمک نشانگر انجام می‌شود و همچنین گروه‌بندی ژرم‌پلاسماها به گروه‌های هتروتنیک برای برنامه‌های اصلاحی هیبریداسیون بسیار مفید و قابل استفاده است (Ali et al., 2008). دستیابی به تنوع ژنتیکی برای اصلاح گیاهان ضروری است. مراکز حفظ ذخایر ژنتیکی، باهدف حفظ تنوع ژنتیکی و ممانعت از اضمحلال ذخایر ژنتیکی به واسطه استفاده گسترده از ارقام مدرن، توسعه یافته ایجاد می‌شوند (Brown, 1995). در سال ۱۹۸۰، هیئت مدیره بین‌المللی منابع ژنتیکی گیاهی (IBPGR) حمایت‌های مالی قابل توجهی برای حفظ ژرم‌پلاسماها فراهم کردند که نتیجه آن افزایش تعداد کلکسیون‌ها

یکدیگر تفکیک نمی‌شوند. از آنجایی که منشأ دقیق هر یک از این نمونه‌ها شناخته شده نیست، این احتمال وجود دارد که *Prunus dulcis* Mill. هایی که در یک منطقه جغرافیایی وجود دارند در اصل از مکان دیگری منشأ گرفته و تحت نام جدیدی در مقصد کشت شده باشند. چنین نتایجی بدین علت رخ می‌دهد که جابجایی ژنوتیپ‌ها از منطقه اصلی به سایر بخش‌های کشور بیشتر بر پایه خصوصیات مورفولوژیک و جمع‌آوری و کدگذاری ژنوتیپ‌ها در کلکسیون می‌باشد که این امر لزوم دقت در هنگام نام‌گذاری نمونه‌ها و همچنین لزوم استفاده همزمان از اطلاعات مولکولی و مورفولوژیک را برای ایجاد کلکسیون آشکار می‌سازد. برخی از جهش‌ها و تغییرات ژنتیکی در خصوصیات نظیر رنگ میوه، شکل، اندازه درخت و رخ می‌دهند که از نظر فنوتیپی به راحتی قابل شناسایی هستند، اما با استفاده از برخی نشانگرهای مولکولی قابل تشخیص نیستند.

علاوه بر این باید توجه شود که تاثیرات بعد از نسخه‌برداری و توارث غیرهسته‌ای نیز می‌تواند دلیل عدم تناسب نشانگرهای مولکولی و خصوصیات مورفولوژیک باشد. بنابراین انجام مطالعات مورفولوژیک بیشتر و یا مطالعه صفات فنولوژیک بر روی برگ، گل و میوه برای گرفتن نتایج قابل‌اعتمادتر در ژنوتیپ‌های *Prunus dulcis* Mill. می‌تواند مثمر ثمر باشد. یکی دیگر از دلایل اختلاط ژنتیکی مشاهده شده، این است که بسیاری از این ژنوتیپ‌ها از نتایج برنامه‌های اصلاحی *Prunus dulcis* Mill. هستند و با توجه به اهداف مشترکی که در اکثر برنامه‌ها مورد توجه محقق قرار دارد، احتمال اشتراک والدین آنها زیاد است. البته عدم گروه‌بندی مشخص در هر دو روش مبتنی بر کلاستر و مدل می‌تواند نکته مثبتی برای ادامه تحقیقات باشد، زیرا این امر نشان می‌دهد ژرم‌پلاسما مورد مطالعه با توجه به عدم وجود ساختار، می‌تواند برای مطالعات نقشه‌های ارتباطی نیز مفید باشد. با توجه به نتایج

کلکسیون هسته با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک، راندمان انتخاب نمونه‌ها در این بخش ۸۰/۱ درصد بود. این مطلب نشان دهنده آن است که علیرغم گروه‌بندی مشخص به دست آمده در صفات مورفولوژیک، تنوع آلی و ژنتیکی موجود در ارقام و نمونه‌های مورد بررسی، بسیار بیشتر است. از این‌رو اگر برای انتخاب و نگهداری ارقام و نمونه‌ها تنها به صفات مورفولوژیک اکتفا شود، دامنه وسیعی از تنوع ژنتیکی مفید که می‌تواند در سایر برنامه‌های اصلاحی *Prunus dulcis* Mill. مورد استفاده قرار گیرد، را به راحتی از دست خواهیم داد. در جدول ۵ شاخص شانون فاصله ژنتیکی نی و تعداد آل در کلکسیون اولیه و کلکسیون هسته مورد مقایسه قرار می‌گیرد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تفاوت معنی‌داری از نظر شاخص‌های مورد بررسی در بین دو کلکسیون پایه و هسته وجود ندارد.

بود. تاکید زیاد آنها برای حفظ ذخایر ژنتیکی منجر به احداث و حفظ کلکسیون‌های بزرگ شده که هنوز به خوبی مورد ارزیابی و بررسی قرار نگرفتند. اگر چه کلکسیون‌های بزرگ از لحاظ حفظ تنوع ژنتیکی مطلوب به نظر می‌رسند اما قابلیت استفاده و دسترسی آنها با اندازه کلکسیون رابطه معکوس دارد (Frankel, 1984; Frankel and Brown, 1984). افزایش تعداد ژنوتیپ‌ها که به طور کافی مورد بررسی و ارزیابی قرار نگرفته‌اند، می‌تواند از کارایی کلکسیون‌ها بکاهد. در این تحقیق استراتژی پیشرفته M با استفاده از الگوریتم تغییر یافته Heuristic برای شناسایی و تشکیل کلکسیون هسته انتخاب شد (Kim et al., 2007). با استفاده از ۲۵۲ آل ریزماهوره و با به‌کارگیری الگوریتم فوق، از ۱۳۹ رقم و ژنوتیپ *Prunus dulcis* Mill. تعداد ۱۱۲ نمونه به عنوان کلکسیون هسته انتخاب گردید. بر خلاف نتایج مشاهده شده در ارزیابی

جدول ۵- مقایسه شاخص شانون، فاصله ژنتیکی نی و تعداد آل در کلکسیون هسته و پایه

Character	C-Sh.W.	C-Nei	C-Allele	E-Sh.W.	E-Nei	E-Allele
CPPCT017	1.73	0.75	8	1.81	0.79	8
CPPCT006	1.08	0.63	5	1.05	0.59	5
UDP97-401	2.55	0.81	15	2.52	0.92	15
DP98-405	0.83	0.57	4	0.79	0.42	4
BPPCT010	1.66	0.78	8	1.60	0.75	8
BPPCT024	0.63	0.32	8	0.57	0.29	8
pchgms2	1.11	0.72	5	1.10	0.64	5
BPPCT036	1.31	0.76	5	1.27	0.69	5
pchgms3	1.70	0.82	9	1.61	0.78	9
pchgms29	2.24	0.88	14	2.19	0.88	14
M1a	2.25	0.89	11	2.20	0.88	11
UDP98-021	1.21	0.52	6	1.12	0.64	6
UDP98-408	1.87	0.78	8	1.87	0.83	8
UDP98-412	1.86	0.57	8	1.93	0.83	8
UDP98-416	0.88	0.66	3	0.79	0.55	3
AMPA121	1.87	0.84	10	1.90	0.81	10
UDP97-403	0.27	0.21	2	0.25	0.13	2
UDP98-406	2.17	0.85	15	2.20	0.85	15
UDP98-024	2.22	0.86	13	2.22	0.87	13
BPPCT011	2.08	0.83	13	1.97	0.84	13
aprigms18	0.87	0.62	3	0.88	0.51	3
UDP96-008	0.82	0.64	4	0.86	0.46	4
UDP96-019	2.21	0.83	14	2.11	0.83	14
UDP98-414	1.69	0.83	7	1.63	0.79	7
CPPCT024	1.13	0.70	6	1.16	0.58	6
UDP98-410	1.79	0.39	7	1.81	0.83	7
BPPCT016	0.87	0.62	3	0.88	0.51	3
UDP98-025	0.77	0.63	7	0.81	0.45	7

pchgms12	2.37	0.89	16	2.41	0.89	16
UDP96-005	0.92	0.63	4	0.99	0.54	4
UDP98-411	1.05	0.68	4	1.07	0.59	4
UDP96-013	0.83	0.52	3	0.80	0.48	3
Mean	1.46	0.69	7.75	1.45	0.67	7.75

کلکسیون پایه افزایش یابد و در نتیجه‌گیری کلی از تلفیق نتایج مورفولوژیک و مولکولی و سایر الگوریتم‌ها به منظور شناسایی کلکسیون هسته استفاده شود. در صورتی که با استفاده از نتایج مولکولی و مورفولوژیک امکان تشکیل کلکسیون هسته وجود داشته باشد، در نهایت می‌توان شاخص‌های مختلف مولکولی و مورفولوژیک را در کلکسیون هسته و پایه مقایسه نمود تا از درستی کار اطمینان حاصل شود.

با توجه به نتایج مشاهده شده می‌توان دریافت که جمعیت متشکل از ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی برای انجام مطالعاتی مانند تهیه نقشه‌های ارتباطی و یا به‌کارگیری در برنامه‌های اصلاحی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. البته توصیه می‌شود در تکمیل نتایج این تحقیق تعداد نشانگرهای مورفولوژیک بر اساس دیسکریپتور *Prunus dulcis* Mill. تعداد نشانگرهای ریزماهواری و نیز سایر نشانگرها در ارزیابی‌های مولکولی

REFERENCES

- Ali ML, Rajewski JF, Baenziger PS, Gill KS, Eskirdge KM, Dweikat M. (2008) Assessment of genetic diversity and relationship among a collection of US sweet sotghum germplasm by SSR markers. *Mol. Breed.* 21: 497- 509.
- Aranzana MJ, Garcia-Mas J, Carbo J, Arus P (2002) Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding* 121: 87-92.
- Asma BM, Kan T, Birhanli O (2007) Characterization of promising apricot (*Prunus armeniaca* L.) genetic resources in Malatya, Turkey. *Genet. Resour. Crop. Ev.* 54: 205-212.
- Asma BM, Ozturk K (2005) Analysis of morphological, pomological and yield characteristics of some apricot germplasm in Turkey. *Genet. Resour. Crop Ev.* 52: 305-313.
- Badenes ML, Martínez-Calvo J, Llàcer G (1998) Analysis of apricot germplasm from the European ecogeographical group. *Euphytica.* 102: 93-99.
- Bahmani A, Grigorian M, Valizadeh M, Vezvaei A. (2002) Effects of pollen type and nature on fruit size and certain tasting characteristics of almond kernel (*Prunus amygdalus* Btsch). *Iranian J. Agric. Sci.* 33 (2): 289-296.
- Baránek M, Raddová J, Pidra M (2006) Comparative analysis of genetic diversity in *Prunus* L. as revealed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 108: 253-259.
- Brown AHD (1995) The core collection at the crossroads. In: Hodkin T, Brown AHD, Van Hintum TJJ, Morales EAV (Eds.), *Core collections of plant genetic resources*. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Jhon Wiley and Sons, New York, pp. 3-20.
- Cantini C, Iezzoni AF, Lamboy WF, Boritzki M, Struss D (2001) DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeat. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126(2): 205-209.
- Cipriani G, Lot G, Huang HG, Marrazzo MT, Peterlunger E, Testolin R (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.* 99: 65-72.

- De Giorgio D, Polignano GB (2001) Evaluating the biodiversity of almond cultivars from germplasm collection field in Southern Italy. *Sustaining the Global Farm*, 56: 305-311.
- Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana MJ, Poizat C, Zanetto A, Arús P, Laigret F (2002) Development of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor. Appl. Genet.* 105: 127-138.
- Diwan N, McIntosh MS, Bauchan GR (1995) Methods of developing a core collection of annual Medicago species. *Theor. Appl. Genet.* 91 : 755-761.
- Dong YS, Cao YS, Zhang XY, Liu SC, Wang LF, You GX, Pang BS, Li LH, Jia JZ (2003) Establishment of candidate core collections in Chinese common wheat germplasm. *J. Plant Genet. Res.* 4: 1-8.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Foolad M, Arulsekhar S, Becerra V, Bliss F (1995) A genetic map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 262-269.
- Frankel O (1984) Genetic perspectives of germplasm conservation. *Genetic manipulation: impact on man and society*. Cambridge University Press, Cambridge 161-170.
- Frankel OH, Brown AHD (1984) Genetic resources in plants: Their exploration and conservation. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Frankel OH, Brown AHD (1984) Plant genetic resources today: A critical appraisal. In *Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation* (JHW Holden and JT Williams, eds.). Allen and Unwin, Winchester, Massachusetts, USA.
- Frankel OH, Soule ME (1981) Conservation and evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gao ZH, Zhang Z, Han ZH, Fang JG (2005) Development and evaluation of core collection of Japanese apricot germplasms in China. *Sci. Agr. Sinica.* 38 : 363-368.
- Gülcan R (1983) Descriptor list for almond. IBPGR.
- Hokanson SC, Szewc-Mcfadden AK, Lamboy WF, Mcferson JR (1998) Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in *Malus domestica* Borkh. Core subset collection. *Theor. Appl. Genet.* 97 : 671-683.
- Holbrook CC, Anderson WF (1995) Evaluation of a core collection to identify resistance to late leafspot in peanut. *Crop Sci.* 35 : 1700-1702.
- Hormaza JL (2002) Molecular characterization and similarity relationships among apricot genotypes using simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 104: 321-328.
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254-267.
- Imani A. (2000) Almond improvement (translated). Publication of Agricultural Education, Agricultural Research, Education and Extension Organization pp 128.
- Karp A, Edwards KJ, Bruford M, Funk S, Vosman B, Morgante M, Seberg O, Kremer A, Boursot P, Arctander P, Tautz D, Hewitt GM (1997) Molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. *Nature Biotechnol.* 15: 625-628.
- Kester DE, Gradziel TM (1996)

- Almonds. In: Janick J, Moore JN (Eds), Fruit Breeding, Vol. 1. Almond, Wiley, New York, pp. 1-97.
- Kim KW, HK Chung GT, Cho KHM, Chandrabalan D, Gwag JG, Kim TS, Cho EG, Park YJ (2007) PowerCore: a program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing allele mining sets. *Bioinformatics* 23 : 2155-2162.
- Lambert P, Hagen L, Arus P, Audergon J (2004) Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.) compared with the almond Texas× peach Earlygold reference map for *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics* 108 : 1120-1130.
- Li TH, Li YX, Li ZC, Zhang HL, Qi YW, Wang T (2008) Simple sequence repeat analysis of genetic diversity in primary core collection of peach (*Prunus persica*). *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 102-110.
- Li Y, Gao QJ, Li T (2006) Sampling strategy based on fruit characteristics for a primary core collection of peach cultivars. *Journal of Fruit Science* 3: 359-364.
- Li ZC, Zhang HL, Zeng YW, Yang ZY, Shen SQ, Sun CQ, Wang XK (2002) Studies on sampling schemes for establishment of core collection of rice landraces in Yunnan, China. *Genet. Resour. Crop Evol.* 49: 67-74.
- Mango T, Carriero F, Cifarelli RA, Gallitelli M, Cellini F (2001) Development of microsatellite markers in Durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp durum). *Plant & Animal Genome IX conference*.
- Martínez-Gomez P, Arulsekhar S, Potter D, Gradziel TM (2003) Relationships among peach and almond and related species as detected by SSR markers. *J. Am. Soc. Hort. Scie.* 128: 667-671.
- Mousavi Ghahfarokhi SA, Fattahi Moghadam MR, Zamani Z, Imani A (2010) Evaluation of Quantitative and Qualitative Characteristics of some Almond Cultivars and Genotypes. *Iranian Journal of Horticultural Science* 41(2) : 119-131.
- Naghavi MR, Ghareyazie B, Hosseini Salekdeh G (2005) Molecular Markers. University of Tehran press. pp 315.
- Navascues M, Emerson BC (2005) Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasy. *Molecular Ecology* 14: 1333-1341.
- Perry MC, McIntosh MS, Stoner AK (1991) Geographical patterns of variation in the USDA soybean germplasm collection: Allozyme frequencies. *Crop Sci.* 31: 1356-1360.
- Rodrigues LC, Morales MR, Fernandes AJB, Ortiz MJ (2007) Morphological characterization of sweet and sour cherry cultivars in a germplasm bank at Portugal. *Genet. Resour. Crop Evol.* 55: 593-601.
- Serrano B, Gomez-Aparisi J, Hormaza JI (2002) Molecular fingerprinting of *Prunus* rootstock using SSRs. *J. Hort. Sci. & Biotech.* 77: 368-372.
- Spagonletti, ZPL, Quaslet CO (1991) Evaluation of five strategies for obtaining a core subset from a large genetic resources collection of durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 87: 731-736.
- Testolin R, Marazzo T, Cipriani G, Quarta R, Verde I, Dettori T, Pancaldi M, 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.
- Turkoglu Z, Bilgener S, Ercisli S, Bakir M, Koc A, Akbulut M, Gerçekcioglu R, Gunes M, Esitken A (2010) Simple sequence repeat-based assessment of genetic relationships among *Prunus*

- rootstocks. Genet. Mol. Res 9: 2156-2165.
- Upadhyaya HD, Ortiztiz R, Bramel PJ, Singh S (2003) Development of a groundnut core collection using taxonomical, geographical and morphological descriptors. Genet. Resour. Crop Evol. 50 : 139-148.
- Upadhyaya HD, PJ Bramel, Ortiz R, Singh S (2002) Developing a mini core of peanut for utilization of genetic resources. Crop Sci. 42, 2150–2156.
- Van Hintum TJL, Brown AHD, Spillane C, Hodgkin T (2000) Core collection of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome.
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends in Biotechnology 23(1): 48-55.
- Wang LX, Li YH, Li W, Zhu L, Guan Y, Ning XC, Guan RX, Liu ZX, Chang RZ, Qiu LJ (2004) Establishment of a core collection of Changjiang spring sowing soybean. Chinese Biodiversity 12: 578–585.
- Wu YX, Daud MK, Chen L, Zhu SJ (2007) Phylogenetic diversity and relationship among *Gossypium* germplasm using SSRs markers. Pl. Syst. Evol. 268: 199-208.
- Zeinalabedini M, Khayam-Nekoui M, Grigorian V, Gradziel T, Martinez-Gomez P, 2010. The origin and dissemination of the cultivated almond as determined by nuclear and chloroplast SSR marker analysis. Scientia Horticulturae 125: 593-601.
- Zeinalabedini M, Majourhat K, Khayam-Nekoui M, Grigorian V, Toorchi M, Dicenta F, Martínez-Gómez P, 2007. Molecular characterization of almond cultivars and related wild species using nuclear and chloroplast DNA markers. International journal of food, agriculture and environment 5: 242-247.
- Zeinalabedini M, Majourhat K, Khayam-Nekoui M, Grigorian V, Torchi M, Dicenta F, Martínez-Gómez P (2008) Comparison of the use of morphological, protein and DNA markers in the genetic characterization of Iranian wild *Prunus* species. Scientia Horticulturae 116: 80-88.