

## **Investigation of Pollen Source-Induced Variation in Fruit Size and Expression Pattern of Mir396a and its Target Gene During Fruit Developmental Stage in *Prunus Arabica***

**Marjan Jafari** 

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, P.O. Box 115, Shahrekord, Iran. Email: marjanjafari326@gmail.com

**Behrouz Shiran** 

\*Corresponding author. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: beshiran45@gmail.com

---

### **Abstract**

#### **Objective**

Almond (*Prunus dulcis* Mill.) represents a high-value fruit crop that is widely cultivated in temperate agro-climatic regions. Market preference and economic returns are often strongly linked to fruit size, with larger almonds generally commanding greater commercial interest. Given that the pollen parent can influence fruit characteristics, including kernel dimensions, this study applied the concept of xenia to evaluate its impact at both morphological and molecular levels, with the aim of identifying and substantiating genes involved in the regulation of fruit size.

#### **Materials and methods**

To address this objective, Arabica almond trees were pollinated using four distinct almond genotypes: Mamaee and Pooya, characterized by large kernel size, and the Sefid cultivar along with *Prunus orientalis*, both producing small kernels. Fruits were sampled at multiple developmental stages and subjected to morphological and molecular assessments. Measurements of fruit length and width were obtained using a digital caliper, while fruit weight was recorded with a digital balance.

#### **Results**

Morphological analysis revealed significant differences among the crosses. Pollination with Pooya led to an increase in maternal morphological traits such as kernel length, width, thickness, and weight compared to *P. orientalis*. At the molecular level, the expression of Pdu-miR396a and BEN1—genes involved in plant growth and development—was examined in kernels at different developmental stages using RT-qPCR. The results showed that Pdu-miR396a expression was significantly reduced in large fruits obtained from the *P. arabica* × Pooya cross compared to other

combinations. Moreover, its expression decreased progressively during fruit development, correlating with kernel enlargement. A negative correlation was observed between Pdu-miR396a and its target protein BRI1-5 ENHANCED 1 (BEN1), where PduBEN1 exhibited significantly higher expression in large fruits from the *P. arabica* × Pooya cross compared to others. These findings suggest that the Pdu-miR396a–BEN1 module potentially regulates almond kernel size through interactions between maternal and paternal parents.

### Conclusions

The findings demonstrate that the Pdu-miR396a–BEN1 regulatory module is a key factor in the control of almond kernel size, with contributions from both maternal and paternal genotypes to fruit development. Accordingly, the combined use of gene expression profiling and morphological assessment offers a robust approach for supporting and verifying the influence of xenia in almond production.

**Keywords:** Xenia, gene, Almond kernel, miRNA, RT-qPCR`.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Jafari, M., & Shiran, B. (2026). Investigation of Pollen Source-Induced Variation in Fruit Size and Expression Pattern of Mir396a and its Target Gene During Fruit Developmental Stage in *Prunus Arabica*. *Agricultural Biotechnology Journal*, 18(2), 1-20.

---

*Agricultural Biotechnology Journal*, 18(2), 1-20.

DOI: 10.22103/jab.2026.24163.1621

Received: November 12, 2025.

Received in revised form: January 01, 2026.

Accepted: January 02, 2026.

Published online: February 28, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian

Biotechnology Society.



© the authors

---

### Introduction

Almond (*Prunus dulcis* Mill.) is a high-value nut crop that is extensively cultivated in temperate regions worldwide. Among the traits influencing its commercial success, fruit size, and more specifically kernel size, plays a decisive role, as larger kernels are generally favored by consumers and offer greater economic returns to producers. Consequently, the genetic and physiological factors governing fruit and seed size have attracted considerable scientific attention. One biological phenomenon known to affect seed development is xenia, which refers to the influence of pollen genotype on seed and fruit characteristics. Beyond its role in fertilization, xenia represents a paternal effect that can modify traits such as fruit size and shape, chemical composition, and developmental progression. Elucidating the mechanisms underlying xenia is therefore important for optimizing pollen donor selection in orchards and for advancing breeding

programs aimed at improving fruit quality. MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNA molecules that modulate gene expression at the post-transcriptional level through sequence-specific interactions with target mRNAs, resulting in transcript degradation or translational repression. In plants, miRNAs function as key regulators of growth, developmental processes, and stress responses. Among these regulatory molecules, miR396a has been identified as a conserved controller of growth-regulating transcription factors (GRFs) and other genes involved in development. Research in species such as tomato and *Arabidopsis thaliana* has demonstrated its role in regulating cell expansion, organ growth, and seed development. Despite these findings, the molecular mechanisms associated with xenia in almonds, particularly the involvement of miR396a, remain insufficiently characterized. The present study was therefore undertaken to explore both the morphological and molecular dimensions of xenia during almond kernel development. Specifically, the objectives were to (i) assess the effects of different pollen donors on kernel size and morphological traits in *Prunus arabica*, and (ii) examine the expression dynamics of Pdu-miR396a and its target gene *BEN1* throughout kernel development across distinct pollination combinations.

## Materials and methods

**Plant material and pollination design:** The experiment was carried out in an experimental orchard situated in Shorab Saghir village, Chaharmahal and Bakhtiari Province, Iran. *Prunus arabica* was selected as the female parent because of its inherently small fruit size, which facilitates clearer identification of paternal influences on kernel traits. Four pollen donors with contrasting seed sizes were used: two large-kernel cultivars (Pooya and Mamaee), one medium-kernel cultivar (Sefid), and *Prunus orientalis* as a small-kernel reference. Controlled pollinations were performed manually following a randomized complete block design with three biological replications. Floral buds were emasculated at the balloon stage prior to anthesis. Pollen grains were collected from donor genotypes, stored at 4 °C until use, and subsequently applied by hand to receptive stigmas.

**Morphological analysis:** At the mature stage, kernel morphological characteristics, including length, width, thickness, and weight (both shelled and unshelled), were recorded using a digital caliper and a precision electronic balance. For each biological replicate, twenty kernels were evaluated. Statistical analyses were conducted using SAS software, and mean values were compared using Duncan's multiple range test at a significance threshold of  $P \leq 0.05$ .

**RNA extraction and molecular analysis:** Developing kernels were harvested at six time points (0, 12, 18, 24, 30, and 36 days after pollination). Total RNA was isolated using a modified CTAB-based extraction method tailored for almond tissues with high polyphenol content. RNA integrity and purity were verified by spectrophotometric analysis and agarose gel electrophoresis. Gene-specific primers targeting Pdu-miR396a and its putative target gene *BEN1* were designed, and cDNA synthesis was performed using a stem-loop RT-PCR approach. RT-quantitative PCR

was carried out using SYBR Green chemistry to determine transcript abundance. Actin and 18S rRNA were employed as internal reference genes. Relative expression levels were calculated according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

## Results

**Morphological traits:** Significant variation was observed in kernel morphology depending on the pollen donor. Crosses with Pooya pollen produced significantly larger kernels in terms of length, width, thickness, and weight compared with those pollinated with *P. orientalis*. Mamae also enhanced kernel size compared to Sefid and *P. orientalis*, though less strongly than Pooya. These results highlight a strong xenia effect, confirming that paternal genotype contributes to seed size variation.

**Gene expression:** Expression analysis demonstrated stage-specific and contrasting expression profiles for Pdu-miR396a and its corresponding target gene, *PduBEN1*, throughout kernel development. Overall, Pdu-miR396a transcript levels declined as development progressed, with the lowest abundance detected in large kernels derived from the *P. arabica* × *Pooya* cross. In contrast, *PduBEN1* expression increased over time, reaching peak levels in the same large-kernel samples. A pronounced inverse relationship between Pdu-miR396a and *PduBEN1* expression was observed, indicating a regulatory association between the two. Suppression of miR396a coincided with enhanced *BEN1* expression, supporting the existence of post-transcriptional control. The *BEN1* gene encodes a receptor-like kinase implicated in brassinosteroid signaling pathways that regulate cell elongation and seed development. Collectively, these results suggest that reduced miR396a expression permits elevated *BEN1* activity, thereby promoting kernel enlargement in response to favorable pollen sources.

## Conclusions

The present study provides strong evidence that pollen source exerts a significant influence on almond kernel morphology through coordinated morphological and molecular processes. From a phenotypic perspective, paternal genotypes such as Pooya and Mamae promoted increased kernel size, highlighting their practical relevance for orchard management and breeding programs. At the molecular level, large kernel formation under favorable pollen conditions was consistently associated with reduced expression of Pdu-miR396a and enhanced expression of its target gene, *PduBEN1*. These results contribute to a deeper understanding of the molecular basis of xenia in almond and offer valuable applied insights. The strategic use of superior pollen donors, such as Pooya, may represent an effective approach for improving kernel size and, consequently, market value in commercial orchards. Furthermore, targeting the miR396a–*BEN1* regulatory pathway presents a promising molecular avenue for the genetic improvement of seed size. Future studies should focus on identifying additional miR396a-regulated genes and elucidating the wider regulatory networks associated with brassinosteroid signaling. A comprehensive integration of

morphological, molecular, and epigenetic analyses will further enhance our understanding of how pollen genotype shapes kernel development.

#### **Author contributions**

Conceptualization: Behrouz Shiran (B.S.) and Marjan Jafari (M.J.); methodology, M.J.; software: M.J.; validation: B.S. and M.J.; formal analysis: M.J. investigation: M.J.; writing-original draft preparation: M.J.; writing-review and editing: B.S.; supervision: B.S.; project administration: B.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

#### **Data availability statement**

Not applicable.

#### **Acknowledgements**

This research was partially supported by Shahrekord University and Iran National Science Foundation (INSF). We would like to acknowledge the Biotechnology and Horticultural Research Institute of Shahrekord University that support our research on laboratory experiments. We are grateful to Dr. S. H. Nourbakhsh who provided valuable almond samples. We wish to highlight our gratitude to Dr. Hossein Fallahi and Dr. Pedro J Martínez-García for data analysis.

#### **Ethical Considerations**

The study was conducted under standard horticultural practices. No human or animal experimentation was involved. Ethical standards regarding data integrity, authenticity, and transparency were strictly observed. The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.


#### **Funding**

The study was partially funded by the Shahrekord University S, Iran, and Iran National Science Foundation (INSF). This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### **Conflict of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

## بررسی تغییرات ناشی از منبع دانه‌گرده بر اندازه میوه و الگوی بیانی miR396a و ژن هدف آن در مراحل نمو میوه *Prunus arabica*

مرجان جعفری 

دانش آموخته دکتری علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، کد پستی: ۸۸۱۸۶۳۴۱۴۱، شهرکرد، ایران. رایانامه: marjanjafari326@gmail.com

بهرروز شیران 

نویسنده مسئول: استاد تمام، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، کد پستی: ۸۸۱۸۶۳۴۱۴۱، شهرکرد، ایران. رایانامه: beshiran45@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۲۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۱۲

### چکیده

**هدف:** بادام (*Prunus dulcis* MILL) از میوه‌های بسیار ارزشمندی است که به صورت تجاری در مناطق معتدل جهان کشت می‌شود. امروزه میوه‌های بزرگتر بازار فروش و سود بیشتری دارند. با توجه به تأثیر منابع گرده بر ویژگی‌های میوه بادام از جمله اندازه هسته، در این تحقیق پدیده زنیبا در سطح مورفولوژیک و مولکولی جهت شناسایی و تایید ژن‌های مرتبط با اندازه میوه، مورد مطالعه قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** برای این منظور بادام اربیکا با گونه *Prunus orientalis* و رقم سفید با دانه ریز و دو رقم مامایی و پویا با دانه درشت گرده‌افشانی شد و نمونه‌برداری از مراحل مختلف رشد میوه برای مطالعات مورفولوژیک و مولکولی انجام شد. ابعاد میوه با کولیس دیجیتال و وزن با ترازو دیجیتال اندازه‌گیری شد.

**نتایج:** نتایج خصوصیات مورفولوژیک بذر نشان داد که بین تلاقی‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد، به طوری که گرده‌افشانی با رقم پویا باعث افزایش ویژگی‌های مورفولوژیکی مانند طول، عرض، ضخامت و وزن هسته والد مادری نسبت به *P. orientalis* شد. همچنین برای بررسی نقش زنیبا بر اندازه میوه در سطح مولکولی، میزان بیان ژن‌های *Pdu-miR396a*-*BEN1* به عنوان ژن‌های دخیل در فرآیند رشد و نمو گیاهان، در مراحل مختلف رشد مغز بادام حاصل از تلاقی‌های مختلف بررسی و نقش احتمالی آن‌ها در کنترل اندازه هسته توسط RT-qPCR تایید شد. به طوری که *Pdu-miR396a* کاهش بیان معنی‌داری را در میوه بزرگ حاصل از تلاقی اربیکا × پویا در مقایسه با دیگر تلاقی‌ها داشت. همچنین روند بیان این ژن کاهش یافته و با پیشرفت مراحل نمو و بزرگ شدن اندازه میوه، بیان آن کاهش پیدا کرده است. علاوه بر این همبستگی منفی بین بیان *Pdu-miR396a* و پروتئین هدف آن (*BEN1*) (BRI1-5 ENHANCED 1 (BEN1))، مشاهده شد. به طوری که *PduBEN1*

افزایش بیان معنی‌داری را در میوه بزرگ حاصل از تلاقی اربیکا × پویا در مقایسه با دیگر تلاقی‌ها داشت. بنابراین، *Pdu-miR396a-BENI* به طور بالقوه در تنظیم اندازه دانه بادام توسط والدین مادری و پدری نقش دارد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که *Pdu-miR396a-BENI* به طور بالقوه در تنظیم اندازه دانه بادام نقش اساسی دارد و توسط والدین مادری و پدری بر اندازه میوه تاثیر می‌گذارد بنابراین بررسی بیان این ژن در کنار بررسی های مورفولوژیکی می‌تواند نشان دهنده و تایید کننده پدیده زنیای در بادام باشد.

**کلیدواژه‌ها:** زنیای، ژن، مغز بادام، miRNA، RT-qPCR.

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** جعفری مرجان، شیران بهروز (۱۴۰۵) بررسی تغییرات ناشی از منبع دانه‌گرده بر اندازه میوه و الگوی بیانی miR396a و ژن هدف آن در مراحل نموی میوه *Prunus arabica*. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۲)، ۱-۲۰.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.



© the authors

## مقدمه

بادام وحشی با نام علمی *Prunus arabica* (Olivier)، که با نام *Amygdalus arabica* Olivier نیز شناخته می‌شود (Shmida et al., 2013)، متعلق به خانواده Rosaceae، جنس *Prunus*، زیرجنس *Amygdalus* و بخش *Spartioides* است (Browicz and Zohary, 1996). نوعی میوه، که درخت آن بومی نواحی خاورمیانه و جنوب آسیا می‌باشد و در ایران در نواحی نیم خشک و کوهستانی کشت می‌شود. بادام گیاهی با ژنوم دیپلوئیدی و دارای ۱۶ کروموزوم است. این گیاه غیرخودگشن بوده و از نظر ژنتیکی هتروزیگوت است (Kester et al., 1991). بادام دارای خودناسازگاری گامتوفیتی است و وجود والد‌گرده دهنده جهت گرده‌افشانی و تشکیل بذر ضروری می‌باشد بنابراین بذر، حاصل ترکیب والد پدری و مادری متفاوت می‌باشد. اصطلاح زنیای برای توصیف اثر ژن‌های والدین در نمو بذر تعریف شده و همچنین اثر والد‌گرده دهنده بر بافت بیرونی بذر را متازنیای گویند. زنیای به اثرات متفاوت باروری با استفاده از منابع مختلف‌گرده بر اندازه، شکل، رنگ و ترکیب شیمیایی دانه‌ها و میوه‌ها گفته می‌شود (Denney, 1992). این پدیده نشان‌دهنده تاثیر مستقیم‌گرده بر رشد و توسعه اندوسپرم و جنین (بافت دانه) و همچنین بافت میوه است و می‌تواند در شناسایی مناسب‌ترین والد پدری به منظور بهبود عملکرد و کیفیت میوه، به‌ویژه در کشت مخلوط ارقام مورد استفاده قرار گیرد (Olfati et al., 2010). این پدیده در بسیاری از محصولات میوه معروف از جمله زغال اخته (Ehrlenfeldt, 2003)، سیب (Militaru et al., 2015)، انگور (Sabir, 2015)، زیتون (Shemer et al., 2014) و همچنین در سبزیجاتی مانند گوجه فرنگی (Piotto et al., 2013) و خیار (Olfati et al., 2010) گزارش شده است. هسته یا مغز بادام که قسمت خوراکی آن می‌باشد، حائز اهمیت است و میزان عملکرد بادام وابسته به درصد تشکیل میوه و اندازه آن است. رشد بذر، علاوه بر شرایط محیطی، تحت تاثیر مکانیسم‌های مولکولی مختلف و ژن‌های مرتبط با نمو بذر می‌باشد. اپی‌ژنوم شامل مجموعه‌ای از مکانیسم‌های تنظیمی مانند متیلاسیون DNA، تغییرات ساختار کروماتین، اصلاحات دم هیستون و RNAهای تنظیمی از جمله miRNAها است و نقش مهمی در کنترل الگوهای بیان ژن در گیاهان دارد. این مکانیسم‌ها در پاسخ به شرایط محیطی

مانند تنش خشکی، دما، آفات و تغذیه، تغییر کرده و الگوی بیان ژن‌های مرتبط با رشد و عملکرد را تنظیم می‌کنند (Shahsavari et al., 2022). در سال‌های اخیر، شواهد قابل توجهی نشان داده است که تنوع اپی‌ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های گیاهی می‌تواند موجب تفاوت در صفات فیزیولوژیکی، عملکردی و پاسخ‌های دفاعی شود. به‌عنوان مثال، تغییر در الگوی متیلاسیون پروموتور ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه یا مسیرهای آنتی‌اکسیدانی، سبب افزایش یا کاهش بیان آن‌ها در مراحل مختلف رشد یا تحت تنش می‌شود. تنظیم بیان ژن در گیاهان به‌صورت زمانی و بافتی انجام می‌گیرد و تنها بخش محدودی از ژنوم در هر بافت فعال است. این موضوع سبب می‌شود miRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها در هر بافت الگوی بیان منحصر به فردی داشته باشند (Khabiri et al., 2023; Mohammadabadi et al., 2024). چنین ویژگی‌ای اهمیت تحلیل بیان ژن در بافت یا مرحله رشدی مرتبط با صفت مورد مطالعه را نشان می‌دهد؛ موضوعی که در این مطالعه از طریق qPCR و با تمرکز بر ژن هدف و miRNA مربوطه دنبال شد. miRNAها توالی‌های کوچک و غیرکدکننده RNA (حدود ۲۲-۱۸ نوکلئوتید) هستند که نقش‌های مهمی در رشد و نمو، هدایت سیگنال، تجزیه پروتئین و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی در گیاهان ایفا می‌کنند. این مولکول‌ها با اتصال به mRNA هدف موجب تجزیه یا مهار ترجمه آن شده و در نهایت میزان پروتئین تولیدی را کاهش می‌دهند (Muzaffar and Bisht, 2017). اغلب ژن‌های هدف miRNAها، عوامل رونویسی هستند که فرآیندهای مختلف رشد گیاه، از جمله تشکیل، رشد و رسیدگی میوه‌ها را کنترل می‌کنند. به‌عنوان مثال ۱۲ خانواده miRNA حفاظت شده از جمله 157, 396, 319, 171, 159, 166, 164, 396, miR396 و ... به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد میوه در آناناس شناسایی شدند (Yew and Kumar, 2011). تحقیقات مختلفی عملکرد miR396 را در رشد میوه گوجه‌فرنگی بررسی کرده‌اند. در گوجه‌فرنگی دو نوع miR396a و miR396b وجود دارد که در این میان، miR396a در بافت‌های مختلف مانند لپه، گل، کاسبرگ و میوه به‌طور قابل توجهی بیشتر از miR396b بیان شده است. برای ارزیابی نقش دقیق‌تر این miRNA، از روش افزایش بیان STTM396a / 396a-88 در گوجه‌فرنگی استفاده شد که در نتیجه بیان بیش از حد آن گل‌ها، کاسبرگ‌ها و میوه‌ها به‌وضوح بزرگتر شدند و وزن میوه به ترتیب ۴۵٪ و ۳۹٪ افزایش یافت (Cao et al., 2016). مطالعات انجام شده در گونه‌های گیاهی مختلف نشان می‌دهد که یک تعادل تنظیمی متقابل میان miR396 و ژن‌های هدف آن، یعنی GRFها (فاکتورهای تنظیم‌کننده رشد) وجود دارد. در این ساز و کار، miR396 با مهار ژن‌های GRF میزان رشد بافت را کنترل می‌کند بنابراین miR396 با هدف قرار دادن فاکتورهای تنظیم‌کننده رشد (GRFs)، مسیر کلیدی در کنترل رشد و نمو گیاه است (Hewezi and Baum, 2012). GRFها، GIFها و miR396 توسط خانواده‌های ژن‌های کوچکی که اعضای آنها اغلب توابع همپوشانی دارند، رمزگذاری می‌شوند. همچنین بررسی‌های تطبیقی در گیاهان مختلف نشان داده‌اند که دامنه تنظیم miR396 بر خانواده GRF بسته به گونه متفاوت است. برای مثال، در صنوبر، تمام GRFها (۱۹ ژن) توسط miR396 تنظیم می‌شوند، در حالی که در آرابیدوپسیس تنها هفت ژن از نه GRF دارای جایگاه اتصال miR396 هستند. GIFها می‌توانند به‌عنوان هماهنگ‌کننده رونویسی که فعالیت GRF را افزایش می‌دهد، عمل کنند، که به نوبه خود با miR396 متضاد هستند. مؤلفه‌های ماژول GIF / miR396-GRF به‌صورت هم‌افزا فعالیت می‌کنند و فرآیندهای مختلف نمو را در اندام‌ها و گونه‌های متنوع گیاهی تنظیم می‌کنند. با این حال، GRF و GIF ممکن است توابع اضافی مستقل از یکدیگر باشند و شبکه را انعطاف‌پذیر و پیچیده‌تر کنند (Liebsch and Palatnik, 2020). بنابراین شناسایی و بررسی عملکرد miRNAها به‌عنوان عوامل تنظیمی مؤثر در بیان ژن، اطلاعات مفیدی را در مورد مکانیسم مولکولی رشد بذر و میوه در اختیار ما قرار می‌دهد که می‌توان از آن‌ها در جهت

ارتقاء رشد و اندازه میوه بهره برد. لذا، این آزمایش با هدف بررسی اثر دانه گرده (پدیده زنی) بر اندازه مغز بادام طراحی گردید. به منظور مشاهده بهتر تغییر اندازه در اثر والد پدری، از گونه *P. arabica* به عنوان والد مادری (دارای میوه خیلی کوچک و با مصرف خوراکی) استفاده شده است. همچنین با توجه به اثبات نقش miR396a در رشد میوه سایر گیاهان، الگوی بیان این میرنا و ژن هدف آن در مراحل مختلف نمو میوه بادام بررسی شد. به طور کلی، استفاده از شاخص‌های اپی ژنتیکی و تحلیل بیان ژن، رویکردی کاربردی در مطالعات اصلاح نباتات و تولید گیاهان با عملکرد و مقاومت بالاتر است و یافته‌های این تحقیق نیز در همین راستا می‌تواند به روشن شدن نقش تنظیمی miRNA و ژن هدف آن در مسیرهای سلولی مرتبط کمک کند.

## مواد و روش‌ها

**انتخاب ارقام، گرده افشانی و نمونه گیری:** گونه *P. arabica* دارای اندازه میوه کوچک به عنوان والد مادری انتخاب و گرده افشانی آن توسط گونه *P. orientalis* و رقم سفید به عنوان والد گرده دهنده با اندازه میوه کوچک و ارقام پویا و مامایی به عنوان والد گرده دهنده با اندازه میوه بزرگ صورت گرفت. این آزمایش در مزرعه هدف در روستای شوراب صغیر از توابع شهرستان سامان استان چهارمحال و بختیاری در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. جهت گرده افشانی، جمع‌آوری گرده در مرحله متورم شدن کامل گل (درست قبل از باز شدن گل) صورت گرفت. برای این منظور شاخه‌های با طول ۰/۵ متر از همه ارقام جمع‌آوری و جهت پیش‌رس کردن گرده ته شاخه‌ها در سطل حاوی آب با یک درصد ساکارز در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس گرده در مرحله قبل از باز شدن گل بوسیله فشار روی شاخه‌های بریده شده و الک کردن با الک ۲ میلی‌متری جمع‌آوری گردید و سپس به مدت ۲۴ ساعت در معرض نور در دمای اتاق خشک شدند و در شیشه‌های کوچک در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان گرده افشانی نگهداری شدند. قبل از گرده افشانی جهت برآورد جوانه‌زنی گرده، دانه‌های گرده در پتری دیش با محیط مصنوعی (۱٪ آگار + ۱۵٪ ساکارز + ۲۰ میلی گرم بر لیتر بوریک اسید) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از اطمینان از داشتن گرده با قابلیت جوانه زنی خوب آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام و برای هر تیمار (ترکیب گرده و تخم‌زا) شاخه‌ای از درخت با تعداد جوانه گل کافی انتخاب و جوانه‌های گل در مرحله متورم شدن با قطع پرچم و گلبرگ اخته شدند. با توجه به اینکه جذب کننده حشرات در بادام گلبرگ‌ها هستند بنابراین با حذف گلبرگ‌ها دیگر نیازی به پوشاندن شاخه‌ها نیست. گرده افشانی دستی گل‌ها با استفاده از میله شیشه‌ای یک روز پس از اخته کردن گل‌ها انجام شد (شکل ۱). جهت نمونه‌گیری برای بررسی‌های مولکولی، بدلیل پوشش دادن کامل مراحل نمو میوه و بررسی الگوی بیان ژن‌ها نمونه‌گیری از مادگی قبل از گرده افشانی (زمان اخته کردن) و در فواصل زمانی ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۰ و ۳۶ روز پس از گرده افشانی در ۲ تکرار بیولوژیک انجام شد. به این صورت که از شاخه بریده استفاده و در سطل حاوی آب جهت جلوگیری از تنش خشکی به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند، سپس میوه‌ها از شاخه‌ها جدا و سریعاً در ازت مایع فریز و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. نهایتاً جهت بررسی اندازه میوه از لحاظ ظاهری نمونه‌گیری در مرحله رسیدن کامل بذر در سه تکرار انجام شد. برای محاسبه این صفات ۲۰ بذر به طور تصادفی از هر تکرار به عنوان نمونه استفاده شدند.



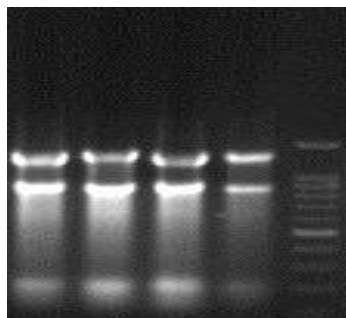
شکل ۱. مراحل گرده افشانی دستی

Figure 1. The stages of pollination

**سنجش اندازه میوه بادام:** صفات مورد اندازه گیری عبارت بودند از: طول، عرض و ضخامت مغز بادام با پوسته سخت، طول، عرض و ضخامت مغز بدون پوسته و همچنین وزن مغز بادام با و بدون پوسته. اندازه گیری ابعاد میوه در مرحله رسیدن کامل با استفاده از کولیس و وزن مغزها توسط ترازوی دیجیتال ۰.۰۰۰۱ انجام شد. از جمله تجزیه آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SAS در سطح ۵ درصد و مقایسه بین میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن یا LSD صورت گرفت. ترسیم نمودارها نیز توسط نرم افزار Excel و Prism انجام شد.

#### بررسی های مولکولی - استخراج RNA: استخراج RNA کل از گیاه بادام به دلیل وجود ترکیبات پلی فنولیکی و

پلی ساکاریدی مشکل می باشد. بنابراین در این تحقیق از روش روبینوپینا و زاپاتا پرز که به نوعی روش تغییر یافته یانگ و همکاران می باشد و به خوبی تمامی ترکیبات فنلی و پلی ساکاریدی و همچنین سایر آلودگی های متابولیتی را حذف می کند، استفاده شد (Rubio-Piña and Zapata-Pérez, 2011; Yang et al., 2008). بدین منظور ۱۰۰ میلی گرم از بافت بذر منجمد شده به کمک نیتروژن مایع پودر شده و حدود ۱۱۰۰ میکرولیتر بافر استخراج حاوی ۰.۱ M Tris-HCl (pH=8); NaCl 1.4M; EDTA 20mM (pH=8); CTAB PVP 2% (W/V) 2% (اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در ادامه کلورفرم به هر نمونه اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد و rpm ۶۵۰۰ سانتریفوژ شد. دو مرحله اضافه نمودن فنل و کلورفرم (۱:۱) به اندازه هم حجم محلول و کلورفرم: ایزوامیل الکل (۱:۲۴) به شکل پشت سر هم، مانند مرحله اول انجام شد. پس از هر سانتریفوژ عصاره رویی به تیوب جدیدی اضافه گردید. در مرحله آخر سانتریفوژ، به مایع رویی لیتیوم کلراید (۸ مولار) به اندازه یک سوم حجم محلول اضافه نموده و به مدت ۴ ساعت در ۲۰- درجه نگهداری گردید. پس از گذشت این زمان به منظور تشکیل پلت، محلول به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه و سرعت rpm ۱۱۰۰۰ سانتریفوژ شد و پس از مراحل شستشو با الکل ۸۰٪ پلت حاصله با ۱۰۰ میکرولیتر آب DEPC حل گردید. خالص سازی و حذف آلودگی DNA نمونه ها توسط آنزیم DNaseI RNase Free براساس روش پیشنهادی شرکت انجام شد. کمیت و کیفیت RNA بعد از خالص سازی برای اطمینان بیشتر به روش بیوفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر و ژل ۱/۲ درصد آگارز بررسی شد (شکل ۲).



شکل ۲. الگوی الکتروفورزی RNAهای استخراج شده از مغز بادام در حال نمو بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد، M100؛ نشانگر اندازه

**Figure 2. Electrophoresis pattern of RNAs extracted from developing almond kernels on 1.2% agarose gel, M100; size marker**

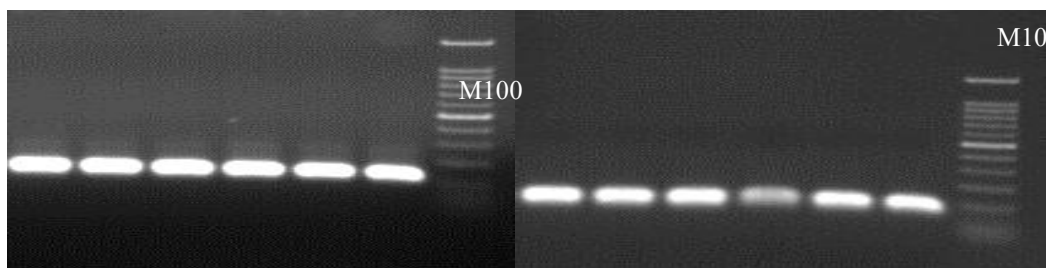
**طراحی آغازگر miRNA و ژن هدف:** طراحی آغازگر جهت بررسی بیان miRNA و سنتز cDNA با استفاده از روش stem-loop RT PCR که توسط چین و همچنین وارکونی و همکارانش معرفی شده، انجام شد ( Varkonyi-Gasic et al., 2007; Chen, 2005). در این روش از آغازگر اختصاصی stem-loop RT به منظور سنتز cDNA و از آغازگرهای اختصاصی رفت و عمومی برگشت به منظور تأیید سنتز و بررسی بیان استفاده گردید. طراحی آغازگر ژن هدف با استفاده از نرم افزار آنالین (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/Primer3/>) در برابر داده‌های ژنوم بادام با تنظیمات پیش فرض شامل محتوای GC حدود ۵۰٪، عدم حضور نوکلئوتید G در انتهای ۵'، اندازه قطعه تکثیری بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نوکلئوتید و با دمای TM بین ۵۷ تا ۶۵ درجه سلنتی‌گراد انجام و توسط وب سایت NCBI Primer-BLAST بررسی شدند (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). توالی آغازگرهای طراحی شده برای miRNA396a و ژن هدف آن در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای بیان ژن Pdu-miR396a-BEN1 در مغز بادام

**Table 1. Oligonucleotide primer pairs used for Pdu-miR396a-BEN1 gene expression in the almond kernel**

Primer name	Primer sequences 5'→3'	Annealing (°C)
<i>Pdu-mir396a</i>	F: GGGGTTCCACAGCTTTCTT	57
	RT: GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCG CACCAGAGCCAAC ACGTTC	87
universal	GTGCAGGGTCCGAGGT	56
<i>PduBEN1</i>	F: TCACAAGGCTGCTGCTTTTG	59.61
	R: ACTCCAAGACAGTGAAACGC	58.42

**سنتز cDNA ژن هدف و miRNA و endpoint PCR:** به منظور سنتز cDNA برای miRNA از روش stem-loop RT-PCR استفاده گردید (Varkonyi-Gasic et al., 2007). قبل از سنتز cDNA، به دلیل بالا بودن غلظت RNAهای استخراج شده آن‌ها را رقیق کرده و ۲۰۰ نانوگرمی برای سنتز cDNA آماده شد و از میکروتیوب‌های عاری از آنزیم نوکلئاز و کیت سنتز cDNA شرکت YTA استفاده شد. برای این منظور یک میکرولیتر ۲۰۰ نانوگرم و ۱ میکرولیتر از آغازگر ساقه-حلقه (Stem loop-RT) با غلظت ۱ میکرومولار و ۲ میکرولیتر water Free Nuclease به آن اضافه شد. جهت حذف ساختار ثانویه نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از آن سریعاً به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. سپس ۸ میکرولیتر مخلوط واکنش (بافر RT، آنزیم RT، آنزیم بازدارنده RNase، dNTP و آب DEPC) به هر تیوب حاوی RNA و پرایمر اضافه شد. حجم نهایی واکنش ۱۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. جهت ساخت cDNA نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر با سیکل دمایی ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ثانیه و دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. به منظور سنتز cDNA برای ژن هدف از کیت سنتز cDNA شرکت YTA استفاده شد. مراحل این نوع سنتز cDNA مشابه با سنتز cDNA برای miRNA است با این تفاوت که پرایمر مورد استفاده الیگو dT و عمومی است و RNA نیز با غلظت بالاتری (۱ میکروگرم) مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌ها در ترموسایکلر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. جهت اطمینان از تکثیر صحیح cDNA و درست طراحی شدن آغازگرها، برنامه تکثیر با استفاده از پرایمرهای Forward و Reverse انجام شد (شکل ۳).



شکل ۳. الکتروفورز محصول End point PCR میرنا و ژن هدف آن بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد

**Figure 3. Electrophoresis of end point PCR product of miRNA and its target gene on 1.2% agarose gel**

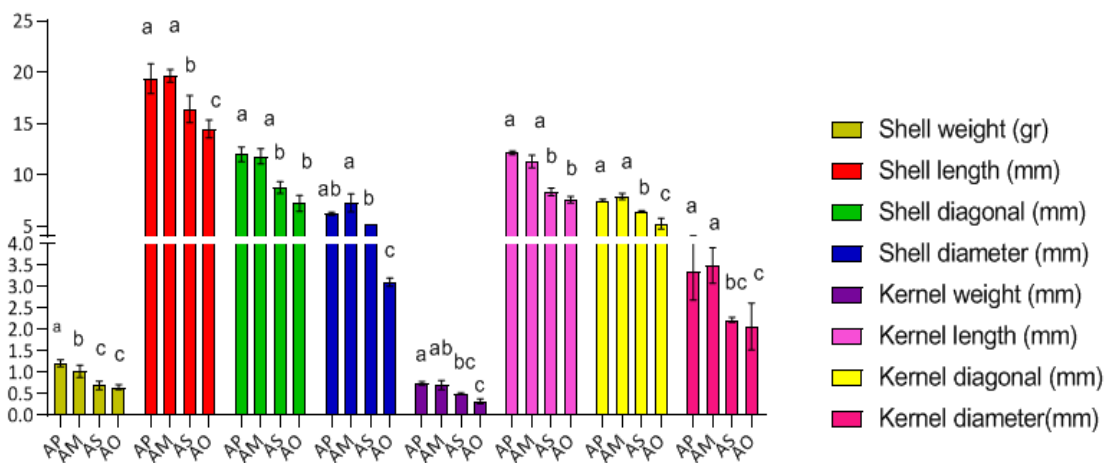
**بررسی میزان بیان miRNA و ژن هدف توسط qPCR:** در این تحقیق به منظور مطالعه بیان ژن‌ها از روش PCR در زمان واقعی (qPCR) از نوع غیراختصاصی (non-specific) که بر مبنای استفاده از DNA – binding agent مانند SYBER GREEN می‌باشد، استفاده گردید. انجام واکنش PCR-time Real با استفاده از دستگاه gene-Q Rotor شرکت Qiagene انجام و از کیت SYBR® Green Real Time PCR Master Mix شرکت Takara طبق دستورالعمل استفاده شد. هر مخلوط واکنش شامل ۲ میکرولیتر cDNA، ۱۵ میکرولیتر سایبرگرین (TaKaRa) (2X)، ۲ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت و ۱۱ میکرولیتر آب با حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر بود. شرایط دمایی شامل ۹۵ درجه برای ۱۵ دقیقه، ۴۰

چرخه با ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۲۰ ثانیه انجام شد. از ژن‌های خانه‌داری مثل 18S rRNA و آلفاتیوبولین که بیان‌شان تقریباً ثابت است، برای کالیبره کردن و نرمال‌سازی نتایج استفاده شد. سپس با محاسبه  $2^{-\Delta\Delta CT}$  میزان تغییر در سطح بیان ژن مشخص شد (Livak and Schmittgen, 2001).

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس ویژگی‌های مورفولوژیکی بذرهای بادام حاصل از تلاقی رقم مادری اریبکا با رقم گرده‌دهنده (پدري) سفید، پویا، مامایی و *P. orientalis* در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج جدول ۲، بین وزن و طول مغز با پوسته و طول مغز بدون پوسته میوه‌های بادام حاصل از تلاقی‌های مختلف تفاوت معنی‌دار آماری وجود داشت اما بین سایر صفات از جمله قطر و عرض مغز با پوسته و وزن مغز قطر و عرض مغز بدون پوسته بادام تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد. در واقع با عنایت به نتایج بدست آمده می‌توان اظهار داشت که نوع رقم پدري گرده‌دهنده بر کمیت و شکل مغز بادام اثر می‌گذارد. همانگونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، در بررسی اثر ساده رقم پدري گرده‌دهنده، صفات وزن، طول، عرض و ضخامت مغز با پوسته و بدون پوسته در میوه‌های حاصل از تلاقی رقم مادری «اریبکا × پویا» بیشتر از میوه‌های بدست آمده از سایر تلاقی‌ها بود. این نتایج نشان می‌دهد که اثر زنیای رقم گرده‌دهنده بر صفات مرتبط با عملکرد به وضوح قابل مشاهده است. ارقام مختلف بادام از محتوای ژنتیکی متنوعی برخوردار هستند و این تفاوت‌ها می‌تواند بسیاری از شاخص‌های رشد از جمله صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی میوه را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین تفاوت مشاهده شده در وزن، طول، عرض و ضخامت مغز (با پوسته و بدون پوسته) در تلاقی‌های مختلف، ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی والدین و بیان ژن‌های متفاوت در آن‌ها است. بر این اساس تلاقی رقم اریبکا با پویا عملکرد بهتری نسبت به سایر تلاقی‌ها نشان داد. بخش زیادی از تفاوت‌های مشاهده شده در میوه به تاثیر رقم گرده‌دهنده بر ویژگی‌های میوه باز می‌گردد. اثر دانه گرده بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بافت‌های مادری میوه (برون‌بر و میان‌بر) متانیا و اثر آن بر ویژگی‌های بذر یا هسته میوه زنیای نامیده می‌شود. بنابراین، برتری تلاقی‌ها از نظر وزن مغز با پوسته، ناشی از شدت اثر زنیای متفاوت در والدین پدري است. براساس نتایج، ارقام پویا و مامایی دارای دانه گرده با اثر زنیای قویتر هستند که باعث افزایش وزن مغز با و بدون پوسته و در نتیجه تولید مغزهای پرتر و مغزی‌تر می‌شوند. در مقابل گونه *P. Orientalis* اثر زنیای ضعیف‌تری داشته و میوه‌هایی با وزن مغز کمتر تولید کرده است. بنابراین، استفاده از ارقام پدري پویا و مامایی نسبت به *P. Orientalis* برای بهبود عملکرد و کیفیت میوه بادام برتری دارد. همچنین در مطالعه بر روی تلاقی رقم مادری شاهرود ۲۱ بادام با ارقام گرده‌زای پدري تونو، سوپرنوا، ژنگو، ۵-۱۵، فیلیپ سئو و همچنین خودگرده‌افشانی رقم مادری گزارشده که در رقم مادری شاهرود ۱۲، بیشترین میزان وزن میوه با پوسته در رقم شاهرود ۲۱ مربوط به گرده‌افشانی باز آن بود (Alizadeh Salta, 2007). همچنین Jafari et al. (2022) نشان دادند که والد گرده‌دهنده بر صفات مختلف از جمله میزان وزن، طول، عرض و ضخامت مغز همراه با پوسته و بدون پوسته در تلاقی‌های مختلف تاثیر معنی‌داری دارد به طوری که تلاقی با والد پدري با میوه بزرگتر، میوه‌های بزرگتری داشتند (Jafari et al., 2022). سایر محققین نتایج متفاوتی با این تحقیق گزارش نمودند به طور مثال، Dicenta et al. (2002) با بررسی اثر خود و دگرگرده‌افشانی شش رقم خودسازگار بادام (لاوران، مارتا، آنتونتا، گوارا، S۲۳۳۲ و S۴۰۱۷) دریافتند خود گرده‌افشانی یا دگرگرده‌افشانی این ارقام تفاوت معنی‌داری بر درصد پوست به مغز بادام نداشت (Dicenta

et al., 2002) و یا Ortega et al. (2002) با بررسی اثر خودگرده افشانی و دگرگرده افشانی روی دو رقم خودسازگار بادام لاورانه و مارتا گزارش کردند که در ارقام خودسازگار اثر گرده خودی و غیرخودی روی درصد پوست به مغز معنی دار نبود (Ortega et al., 2002). در پژوهشی Vazifhashenas et al. (2015) نیز به بررسی تاثیر تلاقی‌های مختلف بین دو رقم مادری (ملس یزدی و رباب فارس) و شش رقم پدری (پوست سیاه، بی هسته دانه قرمز راور کرمان، بی هسته کم‌بار نجف آباد، بی هسته سنگان خاش، گرج تفتی و پیشوای ورامین) انار پرداخت و گزارش نمود بیشترین وزن پوست میوه انار در تیمار تلاقی ارقام بی‌هسته کم‌بار نجف آباد × ملس یزدی مشاهده گردید (Vazifhashenas et al., 2015).



شکل ۴. بررسی اثر دانه گرده با گرده افشان‌های مختلف بر ویژگی‌های مورفولوژیکی میوه‌های والد مادری *P.arabica*: AO: تلاقی بین '*P.arabica*' × '*P.Orientalis*'; AM: تلاقی بین '*P.arabica*' × '*Mamae*'; AP: تلاقی بین '*P.arabica*' × '*Pooya*' و AS: تلاقی بین '*P.arabica*' × '*Sefid*'. نمودارها میانگین خصوصیات مورفولوژیکی ۶۰ دانه (۶۰ عدد) از سه گیاه را نشان می‌دهد. حروف مختلف برای یک صفت نشان دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است ( $P < 0.05$ ).

Figure 4. Study of pollen effect with different pollinizers on the morphological characteristic of *P. arabica* female parent fruits, AO the cross between '*P. arabica*' × '*P. Orientalis*'; AM the cross between '*P.arabica*' × '*Mamae*'; AP the cross between '*P. arabica*' × '*Pooya*' and AS the cross between '*P. arabica*' × '*Sefid*'. The graphs show the mean morphological characteristics of 60 seeds (n = 60) from the three plants. Different letters for the same trait indicate significant differences between treatments, according to Duncan's multiple range test ( $P < 0.05$ )

#### بررسی الگوی بیان *Pdu-miR396a* و ژن هدف آن (*PduBEN1*): مطالعه بر روی الگوی بیان *Pdu-*

*miR396a* و ژن هدف آن در مغز بادام تغییر بیان معنی‌داری در مراحل نمو و همچنین تلاقی‌های مختلف بادام نشان داد (جدول ۳). *Pdu-miR396a* کاهش بیان معنی‌داری را در میوه حاصل از تلاقی اریبکا × پویا به نسبت دیگر تلاقی‌ها که میوه کوچکتری داشتند، نشان داد (شکل ۵). همچنین روند بیان این ژن کاهش یافته و با پیشرفت مراحل نمو و بزرگ شدن اندازه میوه، بیان آن کاهش پیدا کرده است و از طرفی همبستگی منفی بین *Pdu-miR396a* و پروتئین هدف آن، BRI1-5 ENHANCED 1 (BEN1) مشاهده شد، به طوری که *PduBEN1* افزایش بیان معنی‌داری را در میوه حاصل از تلاقی اریبکا × پویا در مقایسه با دیگر تلاقی‌های با اندازه میوه کوچکتر داشت. همچنین روند بیان این ژن افزایش یافته و با پیشرفت

مراحل نمو و بزرگ شدن اندازه میوه بیان آن افزایش پیدا کرده است. به طوری که بیشترین و کمترین بیان *Pdu-miR396a* به ترتیب ۱۲ روز پس از گردهافشانی در تلاقی AO و ۳۶ روز پس از گردهافشانی در تلاقی AP بود، در حالی که *BENI* در تلاقی AP ۳۶ روز پس از گردهافشانی و در تلاقی AO ۱۲ روز پس از گردهافشانی به ترتیب بیشترین و کمترین بیان را دارا بود.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس ویژگی‌های مورفولوژیکی بذر بادام حاصل از تلاقی ارقام بادام با اندازه مختلف  
Table 2. The GLM of the morphological characteristics of almond seeds resulting from the crossing of almond cultivars with different sizes

میانگین مربعات (MS)								منابع تغییرات Source of variation
ضخامت مغز Kernel diameter	عرض مغز Kernel diagonal	طول مغز Kernel length	وزن مغز Kernel weight	ضخامت مغز با پوسته Shell diameter	عرض مغز با پوسته Shell diagonal	طول مغز با پوسته Shell length	وزن مغز با پوسته Shell weight	
0.385 <sup>ns</sup>	0.135 <sup>ns</sup>	0.123 <sup>ns</sup>	0.002 <sup>ns</sup>	0.235 <sup>ns</sup>	0.229 <sup>ns</sup>	3.973 <sup>ns</sup>	0.033 <sup>ns</sup>	2 بلوک Block
1.650 <sup>ns</sup>	4.181 <sup>**</sup>	14.905 <sup>**</sup>	0.110 <sup>ns</sup>	9.394 <sup>**</sup>	16.587 <sup>**</sup>	18.441 <sup>**</sup>	0.217 <sup>**</sup>	3 تلاقی Cross
0.177	0.082	0.178	0.005	0.184	0.575	0.322	0.003	6 خطا Error
15.03	4.22	4.29	12.64	7.85	7.62	3.25	5.82	- %CV

<sup>ns</sup>، \* و \*\* به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح ۱، ۵ درصد و عدم معنی‌داری آماری می‌باشد.

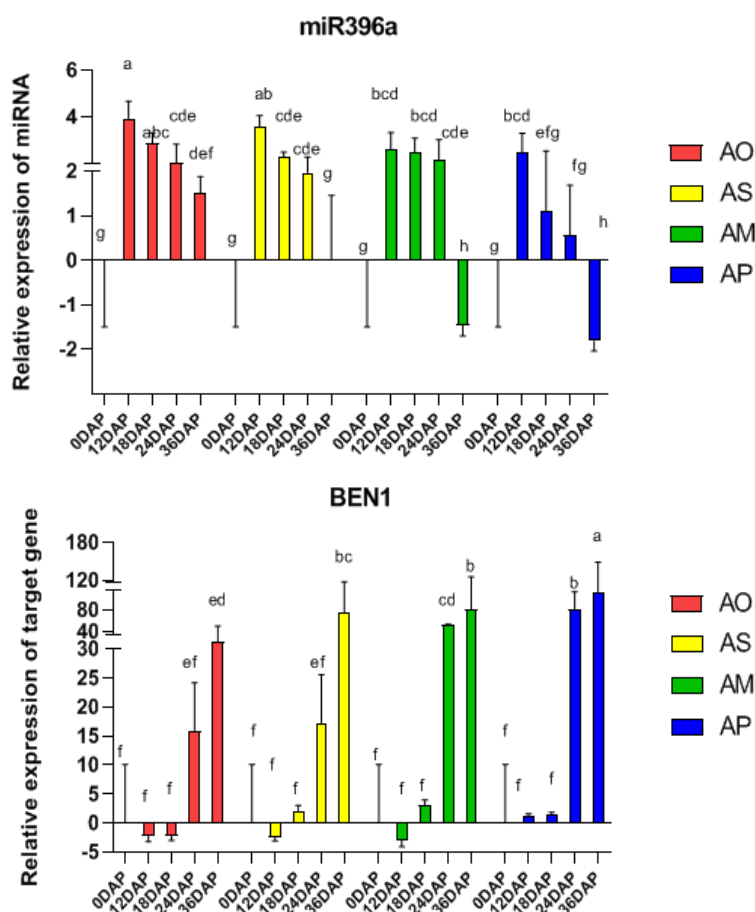
جدول ۳. تجزیه واریانس بیان *Pdu-miR396a* و ژن هدف آن در مراحل نمو مغز بادام حاصل تلاقی‌های مختلف  
Table 3. GLM of the expression of *Pdu-miR396a* and its target gene in almond seeds resulting from the crossing of almond cultivars with different sizes

<i>PduBENI</i>	<i>Pdu-miR396a</i>	درجه آزادی (df)	منابع تغییرات Source of variation
1883.02 <sup>ns</sup>	5.31 <sup>ns</sup>	3	بلوک Block
3314.17 <sup>**</sup>	9.16 <sup>**</sup>	3	تلاقی Cross
18428.06 <sup>**</sup>	36.62 <sup>**</sup>	4	مراحل Stages
1215.84 <sup>**</sup>	1.66 <sup>ns</sup>	12	تلاقی × مراحل Cross × Stage
277.84	0.701	57	خطا Error

<sup>ns</sup>، \* و \*\* به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح پنج درصد ( $P < 5\%$ ) و معنی‌داری در سطح یک درصد ( $P < 1\%$ )

همچنین اختلاف معنی‌داری بین مراحل نمو ۰، ۱۲ و ۱۸ روز پس از گردهافشانی تلاقی‌های مختلف مشاهده نشد (شکل ۵). *BENI* گیرنده اصلی هورمون گیاهی براسینواستروئید است که در سیگنال‌دهی هورمون‌ها نقش دارد و به طور خاص افزایش آن در مراحل رشد و نمو نهایی مغز بادام مشاهده شد. براسینواستروئیدها در نمو، شکل، تعداد و اندازه بذر نقش مهمی داشته و از طریق تنظیم بیان ژن و تاثیر بر فاکتور رونویسی ژن‌ها بطور مستقیم اندازه بذر را بطور مثبتی کنترل و تنظیم می‌کنند (Jiang and Lin, 2013). به این صورت که براسینواستروئیدها بوسیله گیرنده کیناز متصل به غشاء درک می‌شوند و سیگنال به دو فاکتور رونویسی *BZR1* و *BZR2* منتقل می‌گردد. این فاکتورهای رونویسی، بر روی رونویسی ژن‌های موثر براسینواستروئید اثر می‌گذارند. همچنین نتایج تحقیقات نشان داده که براسینواستروئیدها بر اندازه و وزن بذر در جنین و اندوسپرم تاثیر می‌گذارند

درحالی که شکل بذر توسط سیگنال‌های براسینواستروئید در پوشش‌های مادری تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Li and Li, 2015). *miRNA396a* به عنوان یک miRNA موثر در فرایند رشد و نمو شناخته شده است. عوامل تنظیم کننده ژن، ژن‌های هدف این miRNA هستند، که تصور می‌شود فاکتورهای رونویسی دخیل در تنظیم رشد و نمو گیاه را رمزگذاری می‌کنند (Correa et al., 2018).



شکل ۵. الگوی بیان ژن *Pdu-miR396a* و *PduBEN1* در مراحل نمو مغز بادام (۰، ۱۲، ۲۴، ۳۰ و ۳۶ روز پس از گرده‌افشانی) در چهار تلاقی (*P. arabisica* AP، (*P. arabisica* × مامایی) AM، (*P. arabisica* × *P. Orientalis*) AO، (*P. arabisica* × پویا) AS و (اریبکا × سفید). مقادیر  $\pm$ SE (خطای استاندارد) نشان دهنده میانگین حسابی دو تکرار است. حروف کوچک مختلف اختلاف معنی‌داری را در  $p < 0.05$  در آزمون چندگانه دانکن نشان می‌دهد.

Figure 5. The expression pattern of *Pdu-miR396a* and *PduBEN1* genes in the developmental stages of almond kernel (0, 12, 24, 30 and 36 days after pollination) in four crosses, AO: the cross between '*P. arabisica*' × '*P. Orientalis*'; AM: the cross between '*P. arabisica*' × '*Mamaee*'; AP: the cross between '*P. arabisica*' × '*Mamaee Pooya*' and AS: the cross between '*P. arabisica*' × '*Sefid*'. Values represent arithmetic mean of two replicates  $\pm$  SE (standard error). Different lowercase letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  in the Duncan's multiple range test.

در مقابل، ژن هدف *Pdu-miR396a* در بادام *PduBEN1* است که گیرنده اصلی هورمون براسینواستروئید گیاهی است و نقش بسیار مهمی در توسعه گیاهان، به ویژه در کنترل طویل شدن سلول دارد (Jiang and Lin, 2013). در پژوهشی Zhang et al. (2017) نشان دادند که *miR396a* در مراحل بلوغ در مقایسه با مراحل اولیه رشد میوه Hami melon کاهش یافته است (Zhang et al., 2017). همچنین Jafari et al. (2021) نشان دادند که والد پدری از طریق تاثیر بر میزان بیان *Pdu-miRNA396a* و ژن *PduBEN1* بر اندازه مغز بادام تاثیر می گذارد (Jafari et al., 2021). در مطالعه حاضر، بیان ژن *PduBEN1* در دانه‌های بزرگتر، بیشتر بود. بنابراین، پیشنهاد شد که *Pdu-miRNA396a* تنظیم کننده ژن هدف *PduBEN1* برای تنظیم رشد و نمو دانه بادام است. به طوری که Hwang et al. (2021) گزارش دادند که مسیرهای سیگنال دهی براسینواستروئیدها (BRs) در طیف وسیعی از مراحل رشد و نمو گیاهان و همچنین بسیاری از ویژگی‌های مهم زراعی، حیاتی هستند (Hwang et al., 2021). همچنین تاثیر والد پدری بر اندازه مغز، با بیان بیشتر *PduBEN1* در AP و AM در مقایسه با AS و AO نشان داده شد. این نتایج نشان می‌دهد که ژن *PduBEN1* بر اندازه دانه تاثیر می‌گذارد، بنابراین عملکرد با تاثیر *PduBEN1* بر طول سلول ارتباط نزدیک دارد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که رقم پدری گرده‌دهنده تاثیر معنی‌داری بر صفات مورفولوژیکی مغز بادام دارد، به‌ویژه وزن و طول مغز با و بدون پوسته. تلاقی رقم مادری اربیکا با پویا بیشترین اندازه و ضخامت مغز را تولید کرد، که بیانگر اثر زینا رقم پدری بر عملکرد میوه است. از نظر مولکولی، کاهش بیان *Pdu-miR396a* و افزایش بیان ژن هدف آن *PduBEN1* در میوه‌های بزرگتر مشاهده شد؛ این ژن از طریق مسیر سیگنال دهی براسینواستروئید، اندازه و طول سلول‌ها را تنظیم کرده و به طور مستقیم بر رشد و نمو مغز بادام اثر می‌گذارد. یافته‌ها نشان می‌دهد که انتخاب ارقام پدری مناسب مانند پویا و مامایی می‌تواند از طریق تنوع ژنتیکی و تنظیم مسیر *miR396a-BEN1* به بهبود کمی و کیفی مغز بادام منجر شود.

**سپاسگزاری:** این تحقیق تا حدی توسط دانشگاه شهرکرد و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) حمایت شده است. از پژوهشکده بیوتکنولوژی و گروه باغبانی دانشگاه شهرکرد که از تحقیقات ما در قسمت آزمایشگاهی حمایت کردند، سپاسگزاریم. از دکتر س. ح. نوربخش که نمونه‌های ارزشمندی از بادام را در اختیار ما قرار دادند، سپاسگزاریم. از دکتر حسین فلاحی و دکتر پدرو جی. مارتینز-گارسیا برای تجزیه و تحلیل داده‌ها سپاسگزاریم.

## References

- Alizadeh-Saltah, S. (2007). Compatibility of pollination and pollen tube growth of Shahrud 12 and 21 almond (*Prunus amygdalus* Batsch) cultivars (Master's thesis, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University).
- Amiri Roudbar, M., Mohammadabadi, M. R., Ayatollahi Mehrgardi, A., Abdollahi-Arpanahi, R., Momen, M., Morota, G., Brito Lopes, F., Gianola, D., & Rosa, G. J. M. (2020). Integration of single nucleotide variants and whole-genome DNA methylation profiles for classification of rheumatoid arthritis cases from controls. *Heredity*, *124*(5), 658–674. <https://doi.org/10.1038/s41437-020-0301-4>
- Barazandeh, A., Mohammadabadi, M. R., Ghaderi-Zefrehei, M., & Nezamabadi-Pour, H. (2016). Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship

- with genomic features. *Czech Journal of Animal Science*, 61(11), 487–495. <https://doi.org/10.17221/78/2015-CJAS>
- Bordbar, F., Mohammadabadi, M., Jensen, J., Xu, L., Li, J., & Zhang, L. (2022). Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in Simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing analyses. *Animals (Basel)*, 12(9), 1103. <https://doi.org/10.3390/ani12091103>
- Browicz, K., & Zohary, D. (1996). The genus *Amygdalus* L.(Rosaceae): species relationships, distribution and evolution under domestication. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43(3), 229-247. <https://doi.org/10.1007/Bf00123275>
- Cao, D., Wang, J., Ju, Z., Liu, Q., Li, S., Tian, H., Fu, D., Zhu, H., Luo, Y., & Zhu, B. (2016). Regulations on growth and development in tomato cotyledon, flower and fruit via destruction of miR396 with short tandem target mimic. *Plant Science*, 247, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.02.012>
- Correa, J. P. O., Silva, E. M., & Nogueira, F. T. S. (2018). Molecular control by non-coding RNAs during fruit development: From gynoecium patterning to fruit ripening. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1760. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01760>
- Denney, J.O., 1992. *Xenia* includes *metaxenia*. *HortScience*, 27(7), pp.722-728.
- Dicenta, F., Ortega, E., Cánovas, J. A., & Egea, J. (2002). Self-pollination vs. cross-pollination in almond: pollen tube growth, fruit set and fruit characteristics. *Plant Breeding*, 121(2), 163-167. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.00689.x>
- Ehlenfeldt, M. K. (2003). Investigations of *metaxenia* in northern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *Journal of the American Pomological Society*, 57(1), 26.
- Hewezi, T., & Baum, T. J. (2012). Complex feedback regulations govern the expression of miRNA396 and its GRF target genes. *Plant signaling & behavior*, 7(7), 749-751. <https://doi.org/10.4161/psb.20420>
- Hwang, H., Ryu, H., & Cho, H. (2021). Brassinosteroid signaling pathways interplaying with diverse signaling cues for crop enhancement. *Agronomy*, 11(3), 556. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030556>
- Jafari, M., Shiran, B., Rabiei, G., Ravash, R., Sayed Tabatabaei, B. E., & Martínez-Gómez, P. (2021). Identification and verification of seed development related miRNAs in kernel almond by small RNA sequencing and qPCR. *Plos one*, 16(12), e0260492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260492>
- Jafari, M., Shiran, B., Rabiei, G., Ravash, R., Sayed Tabatabaei, B. E., Martínez-García, P. J., & Martínez-Gómez, P. (2022). Identification of genes associated with kernel size in almond [*Prunus dulcis* (Mill.) DA Webb] using RNA-Seq. *Plant Growth Regulation*, 97(2), 357-373. <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00801-4>
- Jiang, W. B., & Lin, W. H. (2013). Brassinosteroid functions in Arabidopsis seed development. *Plant signaling & behavior*, 8(10), e25928. <https://doi.org/10.4161/psb.25928>

- Kester, D. E., Gradziel, T. M., & Grasselly, C. (1991). Almonds (*Prunus*). *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops* 290, 701-760.
- Khadiji, A. (2011). Fruit growing (general and private) (2nd ed.). Agricultural Education and Extension Publications. [In Persian].
- Khabiri, A., Toroghi, R., Mohammadabadi, M., & Tabatabaeizadeh, S. E. (2023). Introduction of a Newcastle disease virus challenge strain (sub-genotype VII.1.1) isolated in Iran. *Veterinary Research Forum*, 14(4), e221. <https://doi.org/10.30466/vrf.2022.548152.3373>
- Li, N., & Li, Y. (2015). Maternal control of seed size in plants. *Journal of Experimental Botany*, 66(4), 1087-1097. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru549>
- Liebsch, D., & Palatnik, J. F. (2020). MicroRNA miR396, GRF transcription factors and GIF co-regulators: a conserved plant growth regulatory module with potential for breeding and biotechnology. *Current opinion in plant biology*, 53, 31-42.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Militaru, M., Butac, M., Sumedrea, D., & Chițu, E. (2015). Effect of metaxenia on the fruit quality of scab resistant apple varieties. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 6, 151-156.
- Mohammadabadi, M., Babenko, I. O., Borshch, O., Kalashnyk, O., Ievstafiiieva, Y., & Buchkovska, V. (2024). Measuring the relative expression pattern of the *UCP2* gene in different tissues of the Raini Cashmere goat. *Agricultural Biotechnology Journal*, 16(3), 317-332. <https://doi.org/10.22103/jab.2024.24337.1627>
- Muzaffar, S., & Bisht, K. (2017). Recent developments in understanding the mechanism and functions of microRNAs. *Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol*, 5(02), 001-007. DOI: 10.7324/JABB.2017.50201
- Olfati, J. A., Sheykhtaher, Z., Qamgosar, R., Khasmakhi-Sabet, A., Peyvast, G. H., Samizadeh, H., & Rabiee, B. (2010). Xenia and metaxenia on cucumber fruit and seed characteristics. *International Journal of Vegetable Science*, 16(3), 243-252. <https://doi.org/10.1080/19315260903584167>
- Ortega, E., Egea, J., Cánovas, J., & Dicenta, F. (2002). Pollen tube dynamics following half-and fully-compatible pollinations in self-compatible almond cultivars. *Sexual Plant Reproduction*, 15(1), 47-51. <https://doi.org/10.1007/s00497-002-0137-5>
- Piotto, F. A., Batagin-Piotto, K. D., Almeida, M. D., & Oliveira, G. C. X. (2013). Interspecific xenia and metaxenia in seeds and fruits of tomato. *Scientia Agricola*, 70, 102-107.
- Rubio-Piña, J. A., & Zapata-Pérez, O. (2011). Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic journal of Biotechnology*, 14(5), 11-11. DOI: 10.2225/vol14-issue5-fulltext-10
- Sabir, A. (2015). Xenia and metaxenia in grapes: differences in berry and seed characteristics of maternal grape cv. 'Narince' (*Vitis vinifera* L.) as influenced by different pollen sources. *Plant Biology*, 17(2), 567-573. <https://doi.org/10.1111/plb.12266>
- Shahsavari, M., Mohammadabadi, M., Khezri, A., Borshch, O., Babenko, O., Kalashnyk, O., ... & Kondratiuk, V. (2022). Effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder

- consumption on insulin-like growth factor 1 gene expression in the liver tissue of growing lambs. *Gene Expression*, 21(2), 21-26. <https://doi.org/10.14218/GE.2022.00017>
- Shmida, A., & Cohen, O. (1989). Rare plants in Israel. *Amygdalus arabica*. *Teva Va 'aretz*, 31, 13-14.
- Shemer, A., Biton, I., Many, Y., Vaknin, Y., Lavee, S., Avidan, B., & Ben-Ari, G. (2014). The olive cultivar 'Picual' is an optimal pollen donor for 'Barnea'. *Scientia Horticulturae*, 172, 278-284.
- Shokri, S., Khezri, A., Mohammadabadi, M., & Kheyroodin, H. (2023). The expression of *MYH7* gene in femur, humeral muscle, and back muscle tissues of fattening lambs of the Kermani breed. *Agricultural Biotechnology Journal*, 15(2), 217-236. <https://doi.org/10.22103/jab.2023.21524.1486>
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., & Hellens, R. P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant methods*, 3(1), 12. doi:10.1186/1746-4811-3-12
- Vazifeh-Shenas, M. R. (2015). Evaluation of pollination methods and xenia and metaxenia effects in pomegranate (Doctoral dissertation, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad). [In Persian].
- Yang, G., Zhou, R., Tang, T., & Shi, S. (2008). Simple and efficient isolation of high-quality total RNA from *Hibiscus tiliaceus*, a mangrove associate and its relatives. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 38(3), 257-264. <https://doi.org/10.1080/10826060802164991>
- Yew, C. W., & Kumar, S. V. (2010, July). MicroRNA regulates gene expression during fruit development in pineapple. In *VII International Pineapple Symposium 902* (pp. 177-184).
- Zhang, H., Yin, L., Wang, H., Wang, G., Ma, X., Li, M., ... & Yi, H. (2017). Genome-wide identification of Hami melon miRNAs with putative roles during fruit development. *PLoS One*, 12(7), e0180600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180600>.