

بررسی چندشکلی های DNA در بین تعدادی از ژنوتیپ های پنبه آپلند (*Gossypium hirsutum* L.) با استفاده از تکنیک RAPD - PCR

کمال قاسمی بزدی، سیروس عبدمیشانی، عبدالهادی حسین زاده و

بدراالدین ابراهیم سیدطباطبایی

به ترتیب کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی مؤسسه تحقیقات پنبه کشور (مرگان)، استاد و استادیار

گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۱/۳۱

خلاصه

در این مطالعه، آنالیز RAPD جهت بررسی چندشکلی های DNA بین تعدادی از ژنوتیپ های پنبه آپلند مورد استفاده قرار گرفت. بیست و شش ژنوتیپ با ۹۰ آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بررسی گردیدند. بیست و یک آغازگر در تمام ۲۶ ژنوتیپ پنبه، چندشکلی نشان دادند و از تعداد کل ۲۳۷ قطعه DNA تکثیرشده، ۲۱۹ قطعه (۹۲/۴٪) چندشکل بودند. جهت تخمین فاصله ژنتیکی، از ۱۳ آغازگر که بیشترین چندشکلی را در میان ژنوتیپ ها نشان دادند، استفاده شد. تجزیه کلاستر به روش UPGMA پس از آنالیز چند متغیره بر اساس ضرایب تشابه جاکارد نشان داد که ۲۶ ژنوتیپ می توانند در شش گروه قرار گیرند. ماتریس تشابه داده ها مشخص کرد که ژنوتیپ های ۱۸۹-۸۲۲۰۳ و سای اکرا-۳۲۴ دارای تشابه ۱۰/۴٪، در حالی که زودرس موتاژنر و بختگان به میزان ۴۳/۶٪ مشابهند. ضرایب تشابه اغلب ژنوتیپ های دیگر در محدوده ای بین ۱۵-۳۵٪ بود. نتایج به دست آمده، خویشاوندی های ژنتیکی ژنوتیپ های امریکایی و رقم شاهد ساحل را با تعدادی از ژنوتیپ های با منشأهای مختلف آشکار ساخت. این تجزیه و تحلیل روشن نمود که خویشاوندی های ژنتیکی اکثر ژنوتیپ ها مربوط به مرکز پیدایش آنهاست. نتایج نشان داد که آنالیز RAPD، ابزاری قوی برای کمک به تشخیص خویشاوندی های ژنتیکی در میان ژنوتیپ های پنبه می باشد.

واژه های کلیدی: پنبه، چند شکلی، PCR، RAPD، DNA

دارا می باشد (۱۳).

مقدمه

اصلاح نباتات بر پایه اصول ژنتیکی، یکی از فنون موفق در قرن بیستم به شمار می رود، ولی با توجه به افزایش روز افزون جمعیت، می بایست کارآیی روشهای اصلاحی برای افزایش بازده در واحد سطح و زمان بهبود یافته و تکنیک های جدیدی در جهت تغییر ساختار ژنتیکی گیاهان مورد استفاده قرار گیرند. یکی از راه های افزایش سریع تولید مواد غذایی و الیاف با کیفیت بهتر، استفاده از

گیاه پنبه به عنوان مهمترین و قدیمی ترین گیاه لیفی مصارف گوناگونی دارد و از نظر اقتصادی و تجاری دارای اهمیت فوق العاده می باشد. هر چند تجارت غلات و رقابت الیاف مصنوعی با الیاف پنبه موجب شده است که این گیاه اهمیت نسبی خود را از دست بدهد، ولی با این وجود، مصرف جهانی و سطح زیر کشت آن افزایش یافته است و از نظر غذایی نیز به عنوان یک دانه روغنی، مقام دوم جهان را

۲- تعیین فاصله ژنتیکی و خویشاوندی ژنتیکی ژنوتیپها

مواد و روشها

در تیرماه ۱۳۷۷، بذور ۲۶ ژنوتیپ پنبه آپلند (جدول ۱)، از مؤسسه تحقیقات پنبه کشور (گرگان) تهیه شد. بذور ابتدا به وسیله اسید سولفوریک غلیظ به مدت ۱۰-۵ ثانیه لیتترگیری، با قارچ کش ضد عفونی و در داخل گلدانهای در گلدخانه کشت گردیدند.

یک الی دو هفته پس از جوانه زنی از اولین و تازه ترین برگهای کوتیلدونی شش گیاه از هر ژنوتیپ، حدود ۳/۰-۱/۰ گرم جدا کرده و به صورت بالک، داخل یک ورقه آلومینیومی پیچیده، آن را داخل یک فلاسک کوچک بر روی یخ گذاشته و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردیدند. استخراج DNA، طبق روش مینی پرپ انجام گرفت. نمونه های استخراج شده DNA تا زمان اندازه گیری کیفیت و کمیت آنها، در یخچال با دمای ۴°C نگهداری شدند.

کنترل کیفیت، با استفاده از طیف جذبی DNA (روش اسپکتروفتومتری) صورت گرفت. اگر نسبت A_{260}/A_{280} در محدوده ۲-۱/۸ می بود، نشان می داد که جذب، صرفاً توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و میزان DNA مطلوب بوده و از کیفیت خوبی برای PCR برخوردار است و از آن در کارهای بعدی استفاده می گردید، در غیر این صورت نمونه مورد نظر را بیرون ریخته و نمونه دیگری استخراج می شد. پس از انتخاب محلول هایی که نسبت جذبی آنها در محدوده مورد نظر بود، از اعداد مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر جهت محاسبه میزان غلظت DNA طبق فرمول زیر استفاده گردید:

$50 \times \text{ضرب رقت} \times A_{260} = \text{غلظت DNA (میکرو لیتر / نانو گرم)}$
ضرب رقت، میزان تعداد دفعاتی است که محلول پایه رقیق شده است. عدد ۵۰ هم ضرب تصحیح دستگاه است (۴).

برای یکسان نمودن غلظت همه نمونه ها به ۵ نانوگرم، از آب

استریل دوبار تقطیر شده طبق فرمول زیر استفاده می گردید:

$$W_1 V_1 = W_2 V_2$$

در این فرمول،

$$W_1 = \text{غلظت DNA در محلول پایه}$$

تکنیک های بیوتکنولوژی گیاهی می باشد که به عنوان یک علم چندبُعدی، دستاورد جدید دانشمندان و محققان زیست شناسی جهت استفاده مستقیم از علم ژنتیک در سطح سلول است. روشهای مختلف بیوتکنولوژی به وسیله دست ورزی گیاهان در سطح بافت، سلول و ملکول، می توانند تغییراتی را از لحاظ نوع و فراوانی در ریخته ارثی گیاهان امکان پذیر سازند که از طریق روشهای کلاسیک اصلاح نباتات غیر ممکن و یا مشکل می باشد. دانش زیست شناسی ملکولی در دو دهه اخیر با سرعت حیرت انگیزی باعث ایجاد تحولات، پیشرفتها و نوآوریهای بی شماری گردیده است. این پیشرفتها، ابزار قدرتمندی را برای مطالعات ژنتیکی تفصیلی گیاهان عالی از جمله گیاهان زراعی فراهم کرده اند. شاید اساسی ترین و مفیدترین این ابزارها، نشانگرهای DNA باشند که تفاوت های قابل ثبت اطلاعات ژنتیکی (توالی های بازی DNA) بین دو یا چند موجود می باشد (۲). بسیاری از پیچیدگیهای گزینش بر اساس فنوتیپ را می توان از طریق گزینش مستقیم ژنوتیپ و با استفاده از نشانگرهای DNA که با صفات مورد نظر پیوستگی دارند، برطرف نمود. بیشترین نشانگرهای DNA که مورد استفاده قرار گرفته اند، مبتنی بر RFLP بوده اند. این تکنیک دارای معایبی نظیر طولانی بودن روش، استفاده از مواد رادیواکتیو، هزینه و زحمت زیاد و عدم تشخیص چندشکلی کافی در بسیاری از گونه های زراعی بوده و لذا استفاده از آن، در بسیاری از آزمایشگاه ها دارای محدودیت است (۱ و ۱۹). کشف واکنش زنجیرهای پلیمرز (PCR) در اواسط دهه ۱۹۸۰ در ژنتیک ملکولی انقلابی ایجاد کرد.

تکنیک RAPD بر مبنای PCR یکی از فن آوریهای جدید نشانگرهای DNA است که در سال ۱۹۹۰ ابداع گردیده است (۱۹). مزایای این روش: سهولت، سرعت و نیاز به مقدار کم DNA نمونه است و در موارد مختلفی در ژنتیک و اصلاح نباتات استفاده شده است (۹ و ۱۹). در این تحقیق از این تکنیک برای بررسی تنوع ژنتیکی در بین یک سری از ژنوتیپ های زراعی پنبه آپلند (*Gossypium hirsutum* L) که بیشترین سطح زیر کشت پنبه های دنیا و همچنین ایران را تشکیل می دهند (۱۳)، استفاده شد و سعی گردید دو هدف زیر بررسی شود:

۱- تعیین چندشکلی موجود بین ژنوتیپ پنبه های آپلند

مخلوط واکنش، مقدار ۵ میکرولیتر از DNA تهیه شده با غلظت پنج نانوگرم بر میکرولیتر، به ۲۰ میکرولیتر از مخلوط اجزای موجود در جدول ۲ اضافه می‌گردید که در نهایت این مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری برای انجام PCR مورد استفاده قرار می‌گرفت.

W_p = میزان DNA مورد نظر در محلول قابل مصرف
 V_1 = حجم محلول پایه که بایستی برداشته شود
 V_p = حجم کل محلولی که بایستی تهیه شود
برای انجام واکنشهای PCR، از دستورالعمل کارلوس اف کوئروس با اندکی تغییرات، استفاده گردید. برای هر

جدول ۱- نام و منشأ ژنوتیپ های پنبه مورد استفاده در این تحقیق.

شماره	ژنوتیپ	نام انگلیسی	منشأ
۱	سیندوز - ۸۰	Sindos - 80	یونان
۲	زودرس موتاژنز	Early Mutagenesis	امریکا
۳	ورامین*	Varamin	امریکا x امریکا
۴	بخنگان*	Bakhtegan	امریکا
۵	هوپی کالا x ۳۴۹	Hopicala x 349	امریکا x امریکا
۶	آکالا اس جی ۲ x سی لند	Acala Sj2 x Sealand	امریکا x امریکا
۷	سی کالا-۳۳	Sicala-33	استرالیا
۸	کرما-۱۱۱	Crema-111	اسپانیا
۹	آکالا اس جی ۲ x ۳۴۹	Acala Sj2 x 349	امریکا x امریکا
۱۰	ساحل*	Sahel	امریکا x امریکا
۱۱	۰۱۰	010	ازبکستان
۱۲	۸۲۲۰۳-۱۸۹	82203-189	استرالیا
۱۳	شیرپان-۵۳۹	Shirpan-539	بلغارستان
۱۴	تابلادیللا	Tabladilla	اسپانیا
۱۵	چکوروا-۱۵۱۸	Gukurovea-1518	ترکیه
۱۶	بی-۵۵۷	B.557	پاکستان
۱۷	۲۲۰۴۱-۶	22041-6	در دسترس نیست
۱۸	سای اکرا-۳۲۴	Siokra-324	استرالیا
۱۹	بلی آیزوار	Beliizovar	بلغارستان
۲۰	کوکر x بلغار	Coker x Bulgar	امریکا x بلغارستان
۲۱	هوپی کالا x ۱۲۱۱ ث	Hopicala x C1211	امریکا x امریکا
۲۲	ساحل x بلغار	Sahel x Bulgar	امریکا x بلغارستان
۲۳	تاشکند-۱	Tashkand-1	ازبکستان
۲۴	نازلی-۸۴	Nazili-84	ترکیه
۲۵	بلغار-۴۳۳	Bulgar-433	بلغارستان
۲۶	شیرپان-۶۰۳	Shirpan-603	بلغارستان

*. ساحل هیبریدی از Coker-100 Wilt x 349، ورامین هیبریدی از Coker-100 Wilt x 539 و بخنگان حاصل از گزینش Acala Sj2 است که منشأ همه آنها امریکاست.

جدول ۲- مقدار مواد مورد نیاز برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR.

اجزای واکنش	مقدار لازم برای هر نمونه (میکرولیتر)	مقدار کل برای X نمونه (میکرولیتر)
۱- آب دو بار تقطیر شده	۱۴/۲	۱۴/۲ (۱/۱X)
۲- بافر (۱۰ برابر)	۲/۵	۲/۵ (۱/۱X)
۳- dNTP	۲	۲ (۱/۱X)
۴- کلرید منیزیم	۰/۶	۰/۶ (۱/۱X)
۵- آغازگر	۰/۵	۰/۵ (۱/۱X)
۶- تک پلیمرز	۰/۲	۰/۲ (۱/۱X)
جمع	۲۰	۲۰ (۱/۱X) = ۲۲X

تبدیل لگاریتمی داده‌ها (در جدولی به همراه مهاجرت باندهای نشانگر مربوطه) کدگذاری با اعداد صفر و یک انجام شد. برای یکنواخت سازی داده‌ها، از رگرسیون خطی $y=a+bx$ استفاده شد و با استفاده از جدول توافقی، کمی کردن داده‌ها (رتبه‌بندی) صورت گرفت.

ماتریس تشابه پس از آنالیز چند متغیره، با استفاده از ضریب تشابه جاکارد به دست آمد و با استفاده از کلاستر بندی ماتریس‌ها بر اساس این ضرایب تشابه، یک دندروگرام (شکل ۲) به روش UPGMA به جهت گروه بندی ژنوتیپ‌های مختلف پنبه با استفاده از نرم افزار SPSS رسم گردید.

نتایج و بحث

از ۹۰ آغازگر مورد استفاده (آغازگرهای UB₁₁ تا UB₁₀₀)، ۶۹ آغازگر یا هیچ گونه باندی تولید نکردند و یا اینکه محصولات تکثیر شده آنها وضوح و قابلیت تکرار کافی را نداشته و بنابراین حذف گردیدند. بیست و یک آغازگر باقیمانده در ۲۶ ژنوتیپ پنبه، تولید پروفیل‌های تکثیر چندشکل، نمودند و مجموعاً ۲۳۷ قطعه (لوکوس) DNA را تکثیر کردند که از بین آنها، ۱۸ قطعه (۷/۶٪) در برین تمام ژنوتیپ‌ها تک‌شکل بودند و بقیه قطعات (۹۲/۴٪)، در یک یا چند تا از ۲۶ ژنوتیپ پنبه تولید پروفیل‌های چندشکل نمودند که این نشان دهنده درصد بالای چند شکلی بود. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف، متفاوت بود. بیشترین قطعه تکثیر

برنامه‌ای که برای دستگاه ترموسایکلر در نظر گرفته شد، به قرار زیر بود:

یک چرخه:

شروع و اسرشت سازی DNA ۲ دقیقه ۹۴°C

۴۵ چرخه:

تک رشته‌ای شدن DNA ۱ دقیقه ۹۲°C

اتصال آغازگر به DNA ۱ دقیقه ۳۵°C

بسط آغازگر ۲ دقیقه ۷۲°C

یک چرخه:

تکمیل بسط ۵ دقیقه ۷۲°C

پس از تکمیل چرخه‌های دستگاه، نمونه‌ها بلافاصله از دستگاه خارج گردیده و در دمای ۴°C نگهداری می‌شدند. برای انجام الکتروفورز از ژل عمودی پلی‌اکریلامید با غلظت ۶٪ استفاده می‌شد. پس از پایان کار دستگاه الکتروفورز، ژل به آرامی خارج شده و با استفاده از اتیدیوم بروماید با غلظت ۱-۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت نیم ساعت، رنگ آمیزی می‌گردید. سپس ژل را رنگ زدایی نموده، باندها را زیر نور UV مشاهده و از آن عکس گرفته می‌شد. به خاطر کیفی بودن داده‌ها، نخست جدول توافقی صفر و یک تشکیل گردید. بدین منظور، برای گروه بندی ژنوتیپ‌ها ابتدا مهاجرت باندی باندهایی را که واضح بوده و نسبت به زمینه ژل دارای شدت بالایی بودند، با خط کش میلیمتری از کف چاهک به عنوان مبدأ، اندازه گیری نموده و سپس با استفاده از محاسبات آماری و

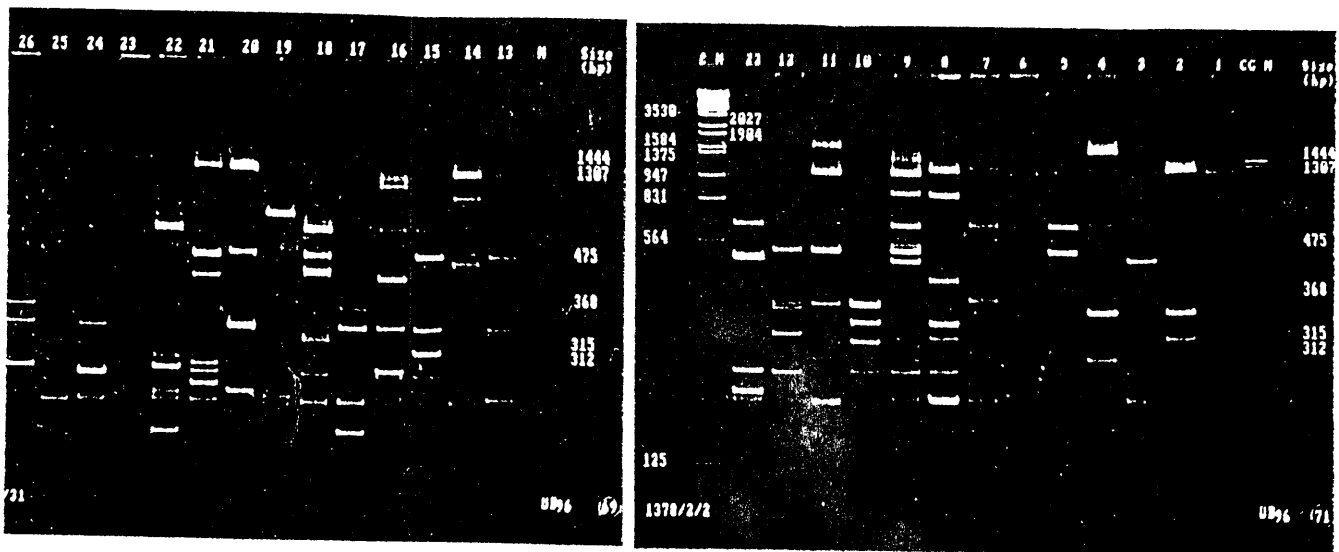
از ۱۳ آغازگر که چندشکلی بیشتر، وضوح بهتر و قابلیت تکرارپذیری بالاتری داشتند، در محاسبات آماری استفاده گردید. این آغازگرها عبارت بودند از: UB₁₆، UB₁₇، UB₁₈، UB₂₃، UB₂₅، UB₂₉، UB₃₀، UB₇₄، UB₇₆، UB₇₉، UB₉₁، UB₉₅ و UB₉₆.

الگوهای بانندی به دست آمده توسط آغازگر UB₉₆ در شکل یک نشان داده شده است. این آغازگر نسبت به بقیه آغازگرها، تعداد

شده، ۱۹ عدد و مربوط به آغازگر UB₉₆ و کمترین آن دو عدد و مربوط به آغازگر UB₇₈ بود. اندازه قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف نیز متفاوت بود ولی در این تحقیق، فقط قطعاتی که اندازه آنها در محدوده اندازه قطعات نشانگر pBR (۱۴۴۴-۳۱۲ جفت باز) بود مورد بررسی قرار گرفت. این ۲۱ آغازگر می‌توانستند برای بررسی فاصله ژنتیکی و یا خویشاوندی ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها به کار روند، ولی به علت اطمینان بیشتر، فقط

جدول ۳ - لیست آغازگرهای تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی مورد استفاده

آغازگر	توالی بازی ۳ ⇒ ۵	تعداد کل قطعات تکثیر شده	تعداد قطعات چندشکلی (b)	درصد چندشکلی (b/a × ۱۰۰)
UB ₁₂	CCT GGG TCC A	۱۲	۱۲	۱۰۰
UB ₁₆	GGT GGC GGG A	۱۰	۹	۹۰
UB ₁₇	CCT GGG CCT C	۱۱	۱۱	۱۰۰
UB ₁₈	GGG CCC TTT A	۱۷	۱۷	۱۰۰
UB ₂₃	CCC GCC TTC C	۱۴	۱۳	۹۲/۸۶
UB ₂₅	ACA GGG CTC A	۱۲	۱۲	۱۰۰
UB ₂₈	CCG GCC TTA A	۵	۴	۸۰
UB ₂₉	CCG GCC TTA C	۹	۷	۷۷/۷۷
UB ₃₀	CCG GCC TTA G	۱۶	۱۶	۱۰۰
UB ₃₁	CCG GCC TTC C	۶	۶	۱۰۰
UB ₃₃	GGG GCC TTA A	۵	۳	۶۰
UB ₃₂	CCG GCT GGA A	۶	۶	۱۰۰
UB ₃₄	CCG GCC CCA A	۹	۹	۱۰۰
UB ₇₄	GAG CAC CTG A	۱۲	۱۲	۱۰۰
UB ₇₈	GAG CAC CAG T	۱۲	۱۲	۱۰۰
UB ₇₆	GAG CAC TAG C	۲	۱	۵۰
UB ₇₉	GAG CTC GTG T	۱۷	۱۷	۱۰۰
UB ₈₉	GGG GGC TTG G	۱۵	۵	۳۳/۳۳
UB ₉₁	GGG TGG TTG C	۱۲	۱۲	۱۰۰
UB ₉₅	GGG GGG TTG G	۱۶	۱۶	۱۰۰
UB ₉₆	GGC GGC ATG G	۱۹	۱۹	۱۰۰



شکل ۱- الگوهای بانندی به دست آمده بر اساس آغازگر UB96. CG-M و M = نشانگر pBR، M = نشانگر DNA-HindIII، شماره‌های ۱ تا ۲۶ = ژنوتیپ‌های پنبه مورد بررسی که در جدول ۱- قید گردیده‌اند. Size (bp) = اندازه قطعات نشانگر. ژنوتیپ شماره ۲۳ در ژل ب تکثیر نشده بود و بنابراین در ژل الف دوباره تکرار گردیده است.

Case	Genotypes	Num	0	5	10	15	20	25
Early Mut.		2	-+-----+-----+					
Bakhtegan		4	-+-----+-----+					
Sahel		10	-----+-----+-----+					
Varamin		3	-----+-----+-----+					
Sahel X Bulgar		22	-----+-----+-----+					
Coker X Bulgar		20	-----+-----+-----+					
Hopi. X C1211		21	-----+-----+-----+					
A.Sj2 X 349		9	-----+-----+-----+					
010		11	-----+-----+-----+					
Hopi. X 349		5	-----+-----+-----+					
A.Sj2 X Sealand		6	-----+-----+-----+					
Sicala-33		7	-----+-----+-----+					
Tabladilla		14	-----+-----+-----+					
82205-189		12	-----+-----+-----+					
Chirpan-539		13	-----+-----+-----+					
Chirpan-603		26	-----+-----+-----+					
Gukurova-1518		15	-----+-----+-----+					
Bulgar-433		25	-----+-----+-----+					
Beliizovar		19	-----+-----+-----+					
Nazili-84		24	-----+-----+-----+					
Sindos-80		1	-----+-----+-----+					
Tashkand-1		23	-----+-----+-----+					
Crema-111		8	-----+-----+-----+					
22041-6		17	-----+-----+-----+					
B.557		16	-----+-----+-----+					
Siokra-324		18	-----+-----+-----+					

شکل ۲- دندروگرام مربوط به ۲۶ ژنوتیپ پنبه آپلند، تولید شده از داده‌های RAPD، با استفاده از آنالیز UPGMA. مقیاس بر اساس ضرایب تشابه جاکارد می‌باشد.

باند، درصد چندشکلی و قدرت وضوح بالاتری داشت.

شکل های ۳ و ۴ فراوانی باندها را بر روی آغازگرهای مورد بررسی نشان می دهند. در نمودار یک، هیستوگرام فراوانی مطلق مجموع تمام باندهای ۱۳ آغازگر در محدوده اندازه های ۲۰۰ جفت بازی نشان داده شده است. این نمودار نشان می دهد که با افزایش اندازه باندها، فراوانی آنها کاهش می یابد. بیشترین تعداد قطعات تکثیر شده در محدوده ۵۰۰-۳۰۰ جفت باز و کمترین تعداد در محدوده ۱۳۰۰-۱۱۰۰ جفت باز بودند.

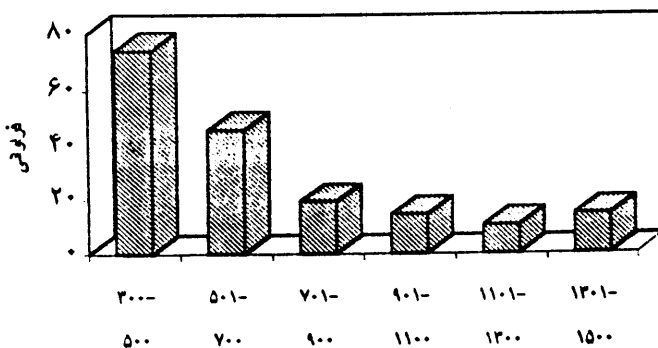
شکل ۳، تعداد کل قطعات تکثیر شده برای هر آغازگر را به همراه تعداد قطعات چندشکل و درصد چند شکلی مربوط به هر آغازگر نشان می دهد. از ۲۱ آغازگر مورد مطالعه، چند شکلی در ۱۴ آغازگر، ۱۰۰٪ بود. کمترین درصد چند شکلی ۳۳/۳۳٪ و مربوط به آغازگر UB89 و میانگین چند شکلی در تمام آغازگرها بر روی ۲۶ ژنوتیپ پنبه ۹۲/۴٪ بود. بیشترین تعداد باند، ۱۹ عدد و مربوط به آغازگر UB96 و کمترین تعداد، ۲ عدد و مربوط به آغازگر UB78 بود و از بین آنها آغازگرهای UB17، UB18، UB23، UB25، UB30، UB95 و UB96 مناسبترین آغازگرها بودند.

بر اساس ماتریس تشابه، کمترین شباهت بین واریتهای ۱۰/۴٪ و مربوط به دو ژنوتیپ ۱۸۹-۸۲۲۰۳ و ۳۲۴-سای اکرا- است. همچنین ژنوتیپهای ۱۸۹-۸۲۲۰۳ و بی-۵۵۷ با تشابه ۱۱/۸٪ و شیرپان-۵۳۹ و بی-۵۵۷ با ۱۲/۳٪ شباهت کمی نسبت به یکدیگر دارند. دو ژنوتیپ زودرس موتاژن و بختگان نیز با ۴۳/۶٪ بیشترین شباهت بین واریتهای را به خود اختصاص داده اند. همچنین ژنوتیپهای شیرپان-۵۳۹ و شیرپان-۶۰۳ با ۴۲/۲٪ تشابه، زودرس موتاژن و ورامین با ۴۱٪ و زودرس موتاژن و ساحل با ۴۰/۴٪ شباهت زیادی نسبت به یکدیگر نشان داده اند. در مجموع از بین کلیه ۲۶ ژنوتیپ مورد بررسی، زودرس موتاژن با میانگین ۲۴/۴۳٪ بیشترین و سای اکرا-۳۲۴ با میانگین ۱۸/۶٪ کمترین شباهت را با بقیه ژنوتیپها نشان دادند.

در دندروگرام شکل ۲، محور متشابه در فاصله ژنتیکی ۲۰ بریده شد، زیرا در این حالت بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی ژنوتیپها نیز تفسیر بهتری خواهیم داشت. در این حالت گروه های زیر را خواهیم داشت:

در گروه اول ۱۱ ژنوتیپ قرار گرفته اند که با توجه به اطلاعات موجود، در ۱۰ ژنوتیپ آن، یک یا هر دو والد، امریکایی اند و منشأ ۰۱۰ ازبکستان است. رقم تجاری ساحل که در این تحقیق به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود، در این گروه قرار گرفته است. این رقم به عنوان یک رقم متحمل به بیماری ورتیسیلیوم (بوته میری) اصلاح گردیده است. در جدول تشابه جاکارد شباهت زیادی بین ژنوتیپهای ساحل، ورامین، بختگان و زودرس موتاژن مشاهده می شود و از لحاظ مورفولوژیکی نیز به عنوان ارقام دارای خصوصیات زودرسی، عملکرد مناسب، کیفیت نسبتاً خوب لیاف و درصد کیل زیاد می باشند. بقیه ژنوتیپها، خصوصاً آنهایی که از آکالا و هوپی کالا منشأ گرفته اند نیز چنین خصوصیتی را دارا می باشند. زکها منشأ ترکیبی دارند و حاصل یک سری تلاقی هستند که بازدهی، مقاومت در برابر پژمردگی و زودرسی را در سطح بالایی در پنبه ایجاد کرده اند. اغلب ژنوتیپهایی که در این گروه قرار گرفته اند، تا حدودی مقاومت به بیماری را دارا می باشند و مقاومت بعضی از آنها حتی از ساحل هم بیشتر است. همچنین خصوصیات مورفولوژیکی آنها شباهت زیادی به رقم شاهد دارد. منشأ ژنوتیپ ۰۱۰ با وجود اینکه ازبکستان است ولی به دلیل اینکه سازگاری عملکرد آن همانند ورامین و ساحل و سایر خصوصیات کیفی آن نیز مشابه ورامین می باشد، در این گروه قرار گرفته است.

در گروه دوم، ۳ ژنوتیپ قرار گرفته اند که منشأ سی کالا-۳۳ و ۱۸۹-۸۲۲۰۳ از استرالیا و تابلادیلای اسپانیاست. در گروه سوم، ۸ ژنوتیپ قرار گرفته اند که منشأ ۴ ژنوتیپ



محدوده اندازه باند (جفت باز)

شکل ۳ - هیستوگرام فراوانی مطلق مجموع باندهای ۱۳ آغازگر مورد بررسی در محدوده های اندازه ۲۰۰ جفت بازی.

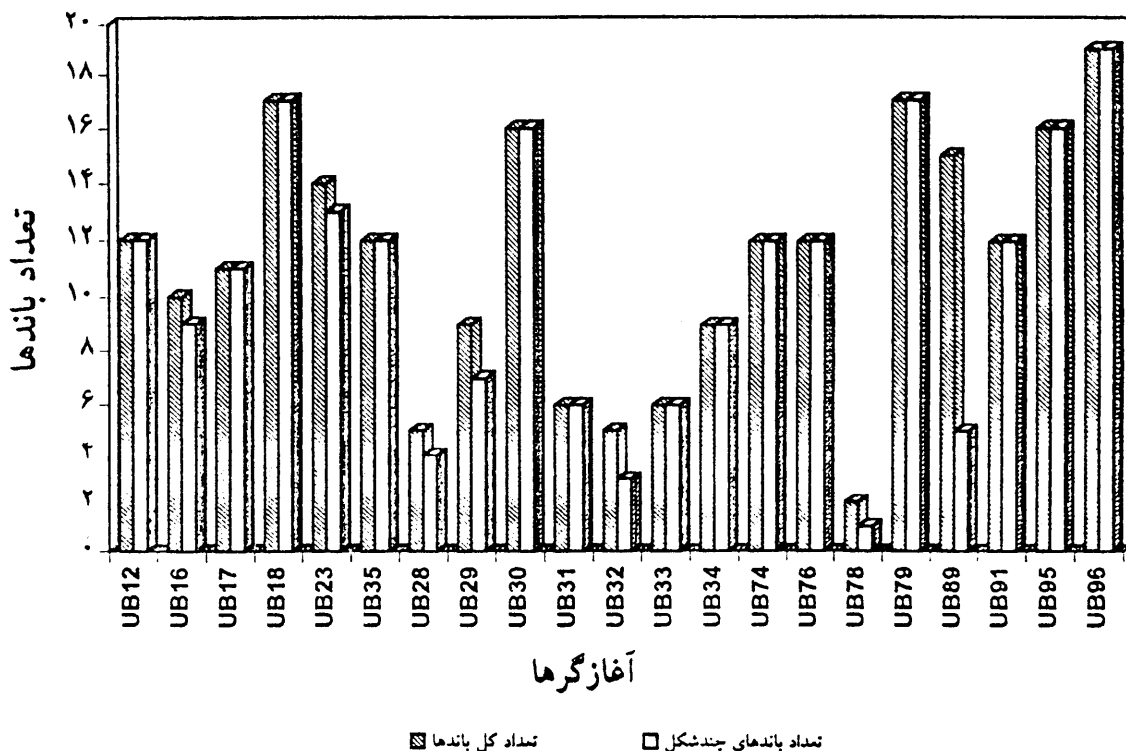
شیرپان-۵۳۹، شیرپان-۶۰۳، بلغار-۴۳۳ و بلی آیزوار از بلغارستان، دو ژنوتیپ چکورو-۱۵۱۸ و نازیلی-۸۴ از ترکیه، سیندوز-۸۰ از یونان و تاشکند-۱ از ازبکستان است. مشخصه اصلی این گروه زودرسی است، خصوصاً ژنوتیپ‌های شیرپان که خیلی زودرسند و فرم بوته کوچکی دارند. در مجموع ژنوتیپ‌های موجود در این گروه از ژنوتیپ‌های گروه اول زودرس ترند. در گروه چهارم دو ژنوتیپ قرار دارند که منشأ کرما-۱۱۱ از اسپانیا و منشأ ۶-۲۲۰۴۱ در دسترس نیست.

دو ژنوتیپ بی-۵۵۷ و سای‌اکرا-۳۲۴ هم به دلیل خصوصیات منحصر به فردی که دارند، در دو گروه جداگانه قرار گرفته‌اند. بی-۵۵۷ تنها ژنوتیپ مورد بررسی است که منشأ آن پاکستان است، تحمل به بیماری آن بیشتر از ساحل بوده، دارای فرم بوته بسته، زودرس، مناسب برای کشت در دشتهای مکانیزه و پرمحصول است. درصد کیل و الیاف آن در حد پایین تری نسبت به ساحل بوده و به خوابیدگی حساس است. اینها مشخصاتی هستند که این ژنوتیپ را از بقیه ژنوتیپ‌ها متمایز کرده است. سای‌اکرا-۳۲۴ هم به دلیل خصوصیات مورفولوژیکی بسیار متفاوتی که دارد، حتی از

دو ژنوتیپ استرالیایی دیگر نیز متمایز شده است. تحمل به پژمردگی ورتیسلیومی در حد رقم ساحل، متحمل به بلایت باکتریایی، عملکرد ۳۰٪ بیشتر از ورامین و ساحل، برگهای کرکدار، شاخه‌های رویشی زیاد، فرم بوته گسترده، بریدگیهای برگ عمیق و زودرسی از مشخصاتی هستند که این ژنوتیپ را از بقیه متمایز می‌کند. بریدگیهای برگ خیلی عمیق از خصوصیات منحصر به فرد ارقام سای‌اکراست و در طبقه‌بندی برگهای پنبه، چنین برگهایی به نام «برگهای بامیه ای» یا «برگهای تیپ اکرا» شناخته می‌شوند

مشاهده می‌شود که دو گروه اخیر ضمن اینکه از لحاظ ملکولی در دو گروه مختلف قرار گرفته‌اند، از لحاظ مورفولوژیکی نیز خصوصیات کاملاً متمایزی از یکدیگر و همچنین از رقم شاهد ساحل دارند. بنابراین کلاسترنندی ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های RAPD، گروه‌بندی مورد انتظار ما را بر اساس اطلاعاتی که از منشأ این ژنوتیپ‌ها داریم، تأیید می‌کند. همچنین این نتایج، صحت آنالیز UPGMA را بر اساس تشابه ژنوتیپ‌ها تأیید می‌نماید.

با وجود اینکه منشأ ژنوتیپ‌های سی‌کالا-۳۳، سای‌اکرا-۳۲۴ و ۱۸۹-۸۲۲۰۳ استرالیاست، ولی در دو گروه



شکل ۴ - هیستوگرام تعداد کل قطعات تکثیر شده به همراه تعداد باندهای چند شکل برای ۲۱ آغازگر.

قبلي كمي در مورد آن وجود دارد، مي تواند نقش مهمي داشته باشد. سطح چند شكلي نمايان شده به وسيله اين ژنوتپ ها مي تواند در نقشه يابي ژنتيكي جمعيت ها براي نشانمند نمودن صفات مهم اقتصادي نظير كيفيت الياف به كار رود و همچنين در گزينش والدين براي اهداف اصلاحي كمك خواهد كرد. تاتينني و همكاران (۱۶) نيز نشان دادند كه آناليز RAPD به طور واقعي مي تواند خويشاوندی های ژنتيكي درون تعداد گوناگوني از ژرم پلاسم پنبه را تعيين كند.

بهترين نوع بررسي خويشاوندی در ميان ژنوتپ ها زماني خواهد بود كه هم از اطلاعات مورفولوژيكي و هم از RAPD استفاده شود (۱۶). ژنوتپ هايي كه در اين تحقيق، بر اساس تمام داده ها بيشترين تنوع را ارائه دادند، ساي اكر-۳۲۴ (از استراليا) و بي-۵۵۷ (از پاكستان) بودند. انتقال صفات مطلوب اين ژنوتپ ها نظير مقاومت به بلايت باكتريايي و پژمردگي ورتيسليومي، عملكرد زياد، زودرسي و كركدار بودن برگها در ساي اكر-۳۲۴ و مطلوب بودن ژنوتپ بي-۵۵۷ براي كشت در دشتهای مكانيزه به ارقام ساحل و ورامين و يا ارقام زراعي مناسب ديگر اهميت زيادي دارد و خصوصيات منحصر به فرد اين ژنوتپ ها، ممكن است آنها را والدين مناسبی برای نقشه يابي جمعيت ها به خاطر نشانمند نمودن صفات مربوط به كيفيت الياف نمايد.

به دليل اينكه هتروزيس در تلاقيهای بين گونه ای و درون گونه ای پنبه كاملاً به اثبات رسیده است (مصاحبه شخصي با دكتور جاناگودار از هندوستان، شهريور ۱۳۷۸)، در پروژه های اصلاح نباتات، بر اساس فاصله های ژنتيكي به دست آمده از اين تحقيق، مي توان ژنوتپ هايي را كه داراي عدم تشابه بالايي هستند، با يكديگر تلاقي داده و از هتروزيس موجود استفاده نمود.

طبق دندروگرام شكل ۴، ژنوتپ های ساي اكر-۳۲۴، بي-۵۵۷ و ۱۸۹-۸۲۲۰۳ چنين شرايطي را خواهند داشت تا به عنوان والدين تلاقي در برنامه های دورگ گيري با ارقام استاندارد ساحل، ورامين، بختگان و زودرس موتاژنر مورد استفاده قرار گيرند.

مختلف قرار گرفته اند. اين سه ژنوتپ از لحاظ مورفولوژيكي نيز خصوصيات متمايزي از يكديگر دارند. مولتاني و ليون (۱۱) نيز در يك مقايسه جفتي در ميان ارقام پنبه هيرسوتوم نشان دادند كه احتمال دارد حتي بين ارقام خويشاوند خيلي نزديك نظير سي كالا وي-۱ و سي كالا وي-۲ و همچنين ساي اكرال-۲۲ و ساي اكرال-۲۳ نيز با استفاده از نشانگرهای ملكولي فرق گذاشته شود.

از بررسيهای انجام شده براي گروه بندی ژنوتپ های پنبه آبلند، مي توان استنباط كرد كه تكنيك RAPD به همراه روشهای آماری چند متغيره مثل تجزيه كلاستر، پتانسيل قابل توجهی جهت بررسي روابط خويشاوندی تكاملی، تنوع ژنتيكي و جغرافيايي اين گياه دارد. به عنوان مثال، در گروه اول، ژنوتپ هايي قرار گرفته اند كه اكثرشان منشأ امريكايي دارند، نسبت به بيماری ورتيسليوم تحمل مناسبی داشته و پرمحصول و زودرسند. در گروه دوم، دو ژنوتپ استراليايي و يك ژنوتپ از اسپانيا قرار گرفته اند كه تقريباً مشخصات مشابهی دارند و تحمل به بيماری آنها كمتر از ساحل است. در گروه سوم، ژنوتپ هايي با منشأهای مختلف قرار گرفته اند، ولی خصوصيت اصلي همه آنها زودرسي است، خصوصاً ژنوتپ های با منشأ بلغارستان كه خيلي زودرسند. گروه های پنج و شش به دليل داشتن خصوصيات مورفولوژيكي كاملاً متفاوت در دو گروه جداگانه و متمايز از تمام گروه های ديگر قرار گرفته اند. بنا بر اين مي توان به نتايج به دست آمده از دندروگرام اطمینان كرد.

از آنجايي كه شجره اغلب ژنوتپ های مورد استفاده شناخته شده است، مي توان تأييد نمود كه خويشاوندی های به دست آمده بين ژنوتپ ها بر اساس داده های RAPD به طور زيادي واقعي اند. بنا بر اين مي توان فرض كرد كه اگر چنين آناليزی به ژرم پلاسم های ديگر پنبه با اطلاعات شجره ای ناشناخته يا از منشأهای مختلف تعميم داده شود، احتمال دارد كه تصويری از خويشاوندی های ژنتيكي آنها فراهم كند.

با توجه به مطالب بحث شده در بالا مي توان چنين بيان داشت كه تكنيك RAPD به دليل داشتن ويژگي های خاص خود در بررسي چند شكلي و مطالعات ژنتيكي گياه پنبه، كه معمولاً اطلاعات

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

- عبدميشاني، س و ع. شاه نجات بوشهری. ۱۳۷۷. اصلاح نباتات (جلد دوم). مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۳۵۲ صفحه.

۲. قره یاضی، ب. ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای دی ان آ در اصلاح نباتات. مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحات ۳۸۱-۳۲۸.
3. Bamberg, J. B., H. D. R. Alfonso, C. Singsit and B. R. Edward. 1998. RAPD analysis of genetic diversity in *Solanum* population to predict the need for fine screening. Agricultural Research Service, Tektran.
 4. Brown, T. A. 1996. Gene Cloning , An introduction. Chapman and Hall. Fourth edition. UMIST, Manchester.
 5. Brown, T. A. 1998. Genetics: a molecular approach. Chapman and Hall. University of Manchester Institute of Science and Technology. 387pp.
 6. Chatfield, C. and A. J. Colins. 1995. Introduction to multivariate analysis. Chapman and Hall. London. 246pp.
 7. De Bustos, A. , C. Casanova , C. Soler and N. Jouve. 1998. RAPD variation in wild populations of four species of the genus *Hordeum* (Poaceae).Theor. Appl. Genet. 96:101-111.
 8. Geng, C. D. , Z. Z. Gong , J. Q. Huang and Z. L. Zhang. 1995. Identification of differences between cotton cultivars (*G. hirsutum*) using the RAPD method. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences. 11(4):21-24.
 9. Iqbal, M. J. , N. Aziz , N. A. Saeed , Y. Zafar and K. A. Malik. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis.Theor. Appl. Genet. 94:139-144.
 10. Menkir, A. , G. Peter and E. J. Gebisa. 1997. RAPD based assessment of genetic diversity in cultivated races of sorghum. Crop Sci. 37:564-569.
 11. Multani, D. S. and B. R. Lyon. 1995. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. Genome 38:1005-1008.
 12. Paterson, A. H. , C. L. Brubaker and J. F. Wendel. 1993. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium spp.*) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. Plant Molecular Biology Reporter 11(2):122-127.
 13. Poehlman, J. M. and A. S. David. 1995. Breeding Field Crops. Fourth ed.Iowa State Univ. Press, Ames. 494pp.
 14. Santalla, M. , J. B. Power and M. R. Davey. 1998. Genetic diversity in mung bean germplasm revealed by RAPD markers. Plant Breeding 117:473-478.
 15. Shen, F. 1996. Isolation of nuclear DNA from cotton and its RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) analysis. Acta Gossypii Sinica, China. 8(5):246-249.
 16. Tatineni, V. , R. G. Cantrell and D. D. Davis. 1996. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. Crop Sci. 36:186-192.
 17. Vroh, Bi. , I. P. Du. Jardin , G. Mergeai and J. P. Baudoin. 1997. Optimization and application of

- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) in a recurrent selection programme of cotton (*Gossypium spp.*). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 1(2):142-150.
18. Westman, A. L. and S. Kresovich. 1998. *Biotechnology and Plant Genetic Resources, Use of molecular marker techniques for description of Plant Genetic Variation*. Chapter 2. pp 9-49.
 19. Williams, J. G. K. , A. E. Kubelik , K. J. Livak , J. A. Rafalski and S. C. Tingey .1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.

**Investigation of DNA Polymorphisms Between Some Genotypes
of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)
Using RAPD - PCR Technique.**

**K. GHASEMI BEZDI, C. ABD-MISHANI,
A. HOSSEINZADEH and B. E. SAYED TABATABAEI**

**Researcher of Agricultural Biotechnology, Cotton Research Institute, Gorgan,
Iran, Professor and Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant
Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.**

Accepted April 19, 2000

SUMMARY

In this study, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to investigate the polymorphisms of upland cotton genotypes. Twenty six genotypes were analyzed with 90 random decamer primers using the Polymerase Chain Reaction (PCR). Twenty one primers detected polymorphism in all the 26 cotton genotypes. A total of 237 bands were amplified, 219 of which (92.4%) were polymorphic. Thirteen primers, clearly polymorphic, were used to estimate the genetic distances between genotypes. Cluster analysis by unweighted pair group method of arithmetic means (UPGMA), after multivariate analysis using Jaccard's similarity coefficients, showed that 26 genotypes could be placed in six groups. Similarity matrix data revealed that genotypes 82203-189 and Siokra-324 are 10.4% similar while Early Mutagenesis and Bakhtegan are 43.6% similar. The coefficient of similarity of most of the other genotypes ranges between 15 and 35%. Results indicated a genetic relationship between genotypes of different origins including American and control Sahel cultivar. This relationship was probably due to similarity of the center of origin of these genotypes. In general, results indicated that the RAPD analysis is a powerful tool in detecting the genetic relationships between cotton genotypes.

Key words: Cotton, DNA, Polymorphism, RAPD, PCR