مجله پژوهش‌های پنبه ایران
جلد دوم، شماره اول، ۱۳۹۳
۷۵-۹۱
www.jcri.ir

مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی بین برخی از ژنوتیپ‌های پنبه دیپلوئید و تتراپلوئید ایران با استفاده از مارکر RAPD

محمدرضا رمضانی‌مقدم*[۱]، اسلام مجیدی هروان[۲]، حمیدرضا زمانی‌زاده[۳]، سیدابوالقاسم محمدی[۴] و مهدی عزیزی[۱]

[۱]استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، [۲]استاد پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، [۳]دانشیار دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، [۴]استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۲۷

چکیده

گونه‌های جنس *Gossypium* (حدودا ۴۹ گونه) ذخایر عظیمی از تنوع ژنتیکی برای اصلاح پنبه زراعی هستند. برای تعیین روابط ژنتیکی درون و بین گونه ای جنس *Gossypium*، ۳۰جفت آغازگر (Primer) ده تایی RAPD روی ۱۰ رقم از دو گونه دیپلوئید زراعی *Gossypium herbaceum* L. (A1) و *Gossypium arboreum* L. (A2) و ۱۸ ژنوتیپ از دو گونه تتراپلوئید (AD) *Gossypium hirsutum* L. استفاده گردید. با استفاده از مارکر RAPD کلاً ۴۲۲ باند تکثیر که ۳۶۶ (۸۶/۷٪) تا از این باندها چند شکلی بودند. تشابهات ژنتیکی بین تمام گونه‌ها محاسبه گردید و براساس آنها دندروگرام مربوطه به روش UPGMA ترسیم گردید که با روابط تاکسونومی‌بین گونه‌ها یکی بود. در برخی موارد روابط خویشاوندی به خوبی با گروه‌بندی ژنتیکی استنتاج و تایید شد. تجریه خوشه‌ای بر اساس تشابهات ژنتیکی برای شناسایی ژنتیکی ارقامی‌که به‌طور بالقوه ذخایر مهمی‌از ژرم پلاسم برای اصلاح پنبه خصوصاً صفات کیفی الیاف هستند صورت گرفت.

واژگان کلیدی: انگشت نگاری DNA، گونه‌های جنس *Gossypium*، تشابه ژنتیکی، روابط خویشاوندی

*نویسنده مسئول: mr.ramezani@areo.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های شگرفی که در زمینه بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی صورت گرفته است ابزار قدرتمندی را برای مطالعات ژنتیکی تفصیلی گیاهان عالی من جمله گیاهان زراعی فراهم آورده است. شاید اساسی‌ترین و مفیدترین این ابزار نشانگرهای DNA باشد که انقلاب عظیمی‌در اصلاح نباتات و به‌ویژه در شناسایی ارقام و ذخایر ژنتیکی بوجود آورده است. امروزه استفاده از این نشانگرها گسترش چشمگیری یافته و از موارد عمده بهره‌گیری از این ابزار توانمند مطالعات ژنتیک تکاملی و روابط خویشاوندی، طبقه بندی موجودات زنده و اصلاح نباتات می‌باشد.

اصلاح نباتات بر پایه ژنتیکی، یکی از فنون موفق در قرن بیستم به شمار می‌رود، ولی با توجه به افزایش روز افزون جمعیت، می‌بایست کارآیی روش‌های اصلاحی برای افزایش بازده در واحد سطح و زمان بهبود یافته و تکنیک‌های جدیدی در جهت تغییر ساختار ژنتیکی گیاهان مورد استفاده قرارگیرند. یکی از راه‌های افزایش سریع تولید مواد غذایی و الیاف با کیفیت بهتر، استفاده از تکنیک‌های بیوتکنولوژی گیاهی می‌باشد که با عنوان یک علم چند بعدی، دستاورد جدید دانشمندان و محققان زیست‌شناسی جهت استفاده مستقیم از علم ژنتیک در سطوح سلول است. روش‌های مختلف بیوتکنولوژی به‌وسیله دست‌ورزی گیاهان در سطح بافت، سلول و مولکول، می‌توانند تغییراتی را از لحاظ نوع و فراوانی در ریخته ارثی گیاهان امکان‌پذیر سازند که از طریق روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات غیرممکن و یا مشکل می‌باشد. دانش زیست شناسی مولکولی در دو دهه اخیر با سرعت حیرت انگیزی باعث ایجاد تحولات، پیشرفت‌ها و نوآوری‌های بی‌شماری گردیده است. این پیشرفت‌ها، ابزار قدرتمندی را برای مطالعات ژنتیکی تفصیلی گیاهان عالی از جمله گیاهان زراعی فراهم کرده‌اند. شاید اساسی‌ترین و مفیدترین این ابزارها، نشانگرهای DNA باشند، که تفاوت‌های قابل ثبت اطلاعات ژنتیکی (توالی‌های بازی DNA) بین دو یا چند موجود می‌باشند. بسیاری از پیچیدگی‌های گزینش براساس فنوتیپ را می‌توان 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 گرفته‌اند، مبتنی بر RFLP بوده‌اند. این تکنیک دارای معایبی نظیر طولانی بودن روش، استفاده از مود رادیواکتیو، هزینه و زحمت زیاد و عدم تشخیص چند شکلی کافی در بسیاری از گونه‌های زراعی بوده و لذا استفاده از آن، در بسیاری از آزمایشگاه ها دارای محدودیت است. کشف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در اواسط دهه ۱۹۸۰ در ژنتیک ملکولی انقلابی ایجاد کرد.

یک روش عملی با کاربرد وسیع برای تعیین ویژگی‌های DNA گیاهان یا سایر موجودات زنده استفاده از PCR با پرایمرهای الیگونوکلوئوتیدی است دارای توالی‌های تصادفی کوتاه برای تولید

نشانگرهای ژنتیکی است. این اساس روش RAPD است، تکنیک RAPD یکی از فن‌آوری‌های جدید نشانگرهای DNA است که در سال ۱۹۹۰ به‌وسیله ویلیامز و همکاران ابداع گردیده است. مزایای این روش سهولت، سرعت و نیاز به مقدار کم DNA نمونه است و در موارد مختلفی در ژنتیک و اصلاح‌نباتات استفاده شده است. مشکل عمده این روش علاوه بر غالبیت آن عدم تکرارپذیر بودن نتایج مربوط به باندهای تکثیر شده است. ماهیت فرآیند تکثیر با پرایمر های کوتاه بدین ترتیب است که مکان‌های زیادی در ژنوم از این پتانسیل برخوردارند که به‌عنوان یک DNA الگو (Template) عمل کنند و لذا مجموعه حاصل ممکن است در اثر هر نوع تغییری در روش آماده کردن DNA الگو، ترکیبات موجود در واکنش و شرایط استفاده شده در PCR تحت تاثیر قرار بگیرد. این بدان معنی‌است که برای مثال تغییر غلظت پرایمر یا DNA ی الگو ممکن است موجب تولید محصولات متفاوتی شود. کسب نتایج قابل اعتماد بستگی به استاندارد نمودن شرایط یا شناسایی ترکیبی از شرایط دارد که با وجود تغییر در متغیرهای کلیدی به نتایج ثابت منجر شود.

در روش RAPD برای بررسی فرآورده‌های حاصل از PCR ژل آگاروز استفاده می‌شود (اقبال ۱۹۹۴و ۱۹۹۷). این روش برای تعیین تنوع موجود بین ارقام مناسب است و حتی می‌توان از آن در تشخیص واریته‌های گونه‌های با دگرگشنی متغیر مانند چاودار استفاده کرد (اقبال و ریبورن، ۱۹۹۴).

تاتیننی و همکاران (۱۹۹۶) با استفاده از ۱۸ نشانگر RAPD تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم پنبه را بررسی و تنوع در سطح مولکولی و فنوتیپی را مقایسه نمودند. آنها گزارش نمودند که دندروگرام حاصل از اطلاعات نشانگر RAPD و داده های مر فولوژیکی دو گونه تتراپلوئید *G.hirsutum* و *G.barbadense* را در دو کلاستر جدا طبقه‌بندی نمود.

اقبال و همکاران (۱۹۹۷) ۵۰ آغازگر تصادفی ده تایی برای آنالیز RAPD در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ۲۲ رقم تجارتی پنبه از دو گونه *G.hirsutum* و *G. arboreum* استفاده نموده و گزارش کردند که ۴۹ آغازگر در همه ۲۲ رقم پلی مورفیسم نشان دادند.

قاسمی‌بزدی و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از ۹۰ پرایمر تصادفی ده تایی ۲۶ ژنوتیپ از گونه تتراپلوئید *G.hirsutum* را آنالیز RAPD نموده و گزارش نمودند که ۲۱ پرایمر برای همه این ارقام پلی مورفیسم نشان داده و از تعداد کل ۲۳۷ باند حاصل ۲۱۹ باند پلی مورفیک بودند. همچنین ضرایب تشابه اغلب ژنوتیپ‌ها در محدوده ۳۵-۱۵ درصد بود.

وفایی تبار (۲۰۰۳) با استفاده از ۲۶ آغازگر ده‌تایی، آنالیز RAPD را بر روی ۷ رقم از گونه دیپلوئید *G. arboreum* و ۱۵ رقم از گونه تتراپلوئید *G.hirsutum* انجام داده و گزارش نمود که تمام ۲۶ آغازگر بین ارقام پلی‌مورفیسم نشان داده و از ۳۷۱ باند تولید شده ۸۸ درصد آنها پلی مورفیک بودند. وی همچنین گزارش نمود که ارقام تتراپلوئید سطوح بالاتری از تشابه را نسبت به دیپلوئیدها نشان دادند.

در این تحقیق از تکنیک RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی در بین یک سری از ژنوتیپ‌های زراعی پنبه آپلند (*Gossypium hirsutum* L.) که بیشترین سطح زیر کشت پنبه‌های دنیا و همچنین ایران را تشکیل می‌دهند، پنبه مصری (*Gossypium barbadense* L.) و ۱۰ نمونه از دو گونه دیپلوئید *G.herbaceum* L., *G. arboreum* L. استفاده شد و سعی گردید دو هدف زیر بررسی شود:

۱- تعیین پلی مورفیسم موجود بین و درون گونه‌های زراعی پنبه.

۲- تعیین فاصله ژنتیکی و خویشاوندی ژنتیکی درون گونه‌ای و بین گونه‌ای.

مواد و روش‌ها

الف) مواد گیاهی

در بهمن‌ماه ۱۳۸۳، ۲۸ نمونه از چهار گونه زراعی *G.herbceum*، *G. arboreum* *G.hirsutum* و *G.barbadense* (جدول‌های ۱و ۲) پس از کرک زدایی در اسیدسولفوریک غلیظ به‌مدت ۱۰-۵ ثانیه، با قارچکش ضدعفونی و در داخل گلدان در گلخانه در مجاورت آزمایشگاه کشت گردید.

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های پنبه تتراپلوئید مورد بررسی

شماره	رقم	نام انگلیسی	گونه	منشاء
۱	نازیلی-۸۴	Nazili-84	*G. hirsutum*	ترکیه
۲	آکالا اس جی ۲ × سی آیلند	Acala Sj2 ×Sea Island	*G. hirsutum*	آمریکا
۳	سی آیلند	Sea Island	*G. hirsutum*	آمریکا
۴	بختگان*	Bakhtegan	*G. hirsutum*	آمریکا
۵	نارا برای	Narabray	*G. hirsutum*	استرالیا
۶	۴۳۳۴۷	43347	*G. hirsutum*	یونان
۷	۸۱۸-۳۱۲	818-312	*G. hirsutum*	یونان
۸	۴۳۲۰۰	43200	*G. hirsutum*	یونان
۹	مهر*	Mehr	*G. hirsutum*	بلغارستان
۱۰	کرما	Crema	*G. hirsutum*	اسپانیا
۱۱	ساحل*	Sahel	*G. hirsutum*	ایران
۱۲	ورامین*	Varamin	*G. hirsutum*	ایران
۱۳	اولتان*	Ultan	*G. hirsutum*	ایران
۱۴	سوپر اکرا	Super Okra	*G. hirsutum*	استرالیا
۱۵	ایرما –۳۲۳	Irma-323	*G. hirsutum*	ترکیه
۱۶	سیندوز-۸۰	Sindos-80	*G. hirsutum*	یونان
۱۷	دکتر عمومی	Dr.Omoumi	*G. barbadense*	مراکش
۱۸	ترمس-۱۴	Termus-14	*G. barbadense*	مصر

ساحل هیبریدی از Coker-100 Wilt×349، ورامین هیبریدی از Coker-100 Wilt×539، بختگان حاصل از گزینش Acala Sj2 است که منشاء همه آنها آمریکا است. رقم دکتر عمومی‌حاصل از گزینش دو رقم الیاف بلند تادلا ۶ و تادلا ۹ از کشور مراکش مهر حاصل از گزینش از رقم B-433 که منشاء آن بلغارستان است و اولتان از تلاقی رقم ساحل با رقم کلوستر و زودرس C1211 که منشاء آن روسیه است حاصل شده است.

جدول ۲- مشخصات پنبه‌های دیپلوئید مورد بررسی

شماره	توده	نام انگلیسی	گونه	بومی
۱	بهاران مهریز	Baharan-e-Mehriz	*G.herbaceum*	ایران
۲	الیاف رنگی	Alyaf-Rangi	*G.herbaceum*	ایران
۳	سرخه سمنان	Sorkhe-e-Semnan	*G.herbaceum*	ایران
۴	گرمسار	Garmsar	*G.herbaceum*	ایران
۵	کرمان	Kerman	*G.herbaceum*	ایران
۶	قوزه و برگ قرمز قم	Ghozeh va Barg Ghermez-e-Qom	*G.herbaceum*	ایران
۷	آریا	Aria	*G.herbaceum*	ایران
۸	کاشمر	Kashmar	*G.herbaceum*	ایران
۹	بنفش کرمان	Banafsh-e- Kerman	*G.herbaceum*	ایران
۱۰	آربورئوم	Arboreum	*G.arboreum*	هندوستان

ب) استخراج[1]، خالص‌سازی[2] و اندازه‌گیری کمیت[3] DNA:

- ترکیبات بافر[4] استخراج :

I. 0.1 M Tris-HCl, PH=8.0
II. 1.0 M NaCl
III. 0.02 M EDTA, PH=8.0
IV. 2% (w/v) cTAB
V. 2% (w/v) Polyvinlypyrrolidone-40
VI. 1 mM 1,10-Phenanthrolin
VII. 0.2% (v/v) β-mercaptoethanol

- مواد خالص‌سازی DNA :

1- Extraction
2- Purification
3- Quantification
4- Buffer

I. Chloroform : isoamyl alcohol (CIA,24:1, v/v)
II. Isopropanol
III. 70% ethanol
IV. 100% ethanol
V. Low salt Tris-EDTA
VI. Cleaning solution:
0.05 M Tris-HCl, PH=8.0
0.05 M EDTA, PH=8.0
2% (w/v) cTAB
2.05% (w/v) NaCl
0.02% (w/v) 1,10-Phenanthrolin
VII. 80% ethanol + 15 mM ammonium acetate
VIII. RNase A 10mg/ml

مراحل جداسازی[1] و خالص سازی DNA : در این مطالعه از یک مادیفیکیشن[2] جدید از دو رو ش مینی پرپ[3] (ژانگ و استوارت، ۲۰۰۰؛ لی و همکاران، ۲۰۰۱) استفاده گردید (نتایج در دست انتشار). حدود ۱۰ روز پس از جوانه‌زنی از برگ‌های لپه‌ای شش گیاه از هر نمونه حدود ۰/۱ گرم برداشت شده و بلافاصله به‌صورت بالک داخل یک کروزه چینی با استفاده از یک دسته هاون در ازت مایع آسیاب شده و داخل یک لوله میکرو سانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر استخراج روی آن ریخته درب لوله بسته شده و ۴۰ تا ۶۰ ثانیه وُرتکس[4] گردید تا به خوبی مخلوط گردد، بعد از نگهداری یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در حمام بن ماری یک حجم مساوی از کلروفرم: ایزو آمیل الکل اضافه شده و در ۱۲۰۰۰×g، ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. قسمت مایع فوقانی لوله به یک لوله جدید ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شده و روی آن ۰/۵ میلی‌لیتر ایزو پروپانول سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) ریخته و برای یک ساعت در دمای ۲۰- نگهداری گردید. سپس در ۱۲۰۰۰×g، ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و قسمت مایع حذف شد. پس از شستشوی متوالی به ترتیب در اتانول ۷۰ و ۱۰۰ درصد، پلت DNA خلاء خشک شده و در ۳۰۰ میکرولیتر بافر Low salt Tris-EDTA سوسپانسیون گردید.

DNA استخراجی سپس در معرض یک مرحله تمیزسازی اضافه به شرح ذیل قرار گرفت: با ۰/۵ میلی لیتر از محلول تمیز کننده مخلوط شده ودر دمای اطاق به‌مدت یک ساعت هم زده شد[5] و پس از

1- Isolation
2- Modification
3- Mini Prep
4- Vortex
5- Shaken

آن محلول در دمای اطاق به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از حذف قسمت مایع، پلت[1] DNA با ۰/۵ میلی‌لیتر از اتانول ۸۰٪+ ۱۵ میلی‌مول استات آمونیوم و ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰٪ شستشو شد. پلت DNA خالص‌سازی شده، خلاء خشک شد و مجدداً در ۳۰۰ میکرولیتر بافر Low salt Tris-EDTA سوسپانسیون گردید.

اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA استخراجی: کنترل کیفیت، با استفاده ازروش اسپکتروفتومتری صورت گرفت، برای هر نمونه جذب محلول در دو طیف ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت و ثبت گردید، سپس نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر (A_{260}/A_{280}) برای هر نمونه بدست آورده شد. اگر نسبت در محدوده ۲-۱/۸ بود، نشان می‌داد که جذب فقط توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و میزان DNA مطلوب بوده و از کیفیت خوبی برای PCR برخوردار بود و از آن در کارهای بعدی استفاده می‌گردید، در غیر این صورت نمونه مورد نظر را بیرون ریخته و نمونه دیگری استخراج می‌شد. پس از انتخاب محلول‌هایی که نسبت جذبی آنها در محدوده مورد نظر بود، از اعداد جذب مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر جهت محاسبه میزان غلظت (کمیت) DNA از رابطه زیر استفاده گردید :

۵۰× ضریب رقت × عدد جذب در ۲۶۰ نانومتر = غلظت DNA (میکرولیتر/ نانوگرم)

ضریب رقت، میزان تعداد دفعاتی است که محلول پایه رقیق شده است. عدد ۵۰ هم ضریب تصحیح دستگاه است (اقبال و رایبورن، ۱۹۹۴). برای یکسان نمودن غلظت همه نمونه ها به ۱۰ نانوگرم، از آب استریل دوبار تقطیر شده طبق رابطه زیر استفاده شد:

$$W_1V_1 = W_2V_2$$

که در رابطه فوق:

W_1= غلظت DNA در محلول اولیه

W_2= میزان DNA مورد نظر در محلول نهایی

V_1= حجمی‌که از محلول اولیه باید برداشته شود

V_2= حجم کل محلولی که باید تهیه شود (محلول نهایی)

1- Pellet

ج) تکثیر[1] DNA و آنالیز RAPD

واکنش PCR: واکنش‌های PCR به تفکیک هر آغازگر و نمونه DNA در لوله‌های استریل ۰/۲ میلی‌لیتری PCR انجام گردید. برای هر مخلوط واکنش مقدار ۵ میکرو لیتر DNA تهیه شده با غلظت ده نانوگرم بر میکرولیتر، به ۲۰ میکرولیتر از مخلوط اجزای موجود در جدول ۳ اضافه گردید که در نهایت این مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۳- مقدار مواد مورد نیاز برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR.

اجزای واکنش	مقدار لازم برای هر نمونه (میکرولیتر)
آب دوبار تقطیر شده استریل	۱۶/۸۲
بافر 10X PCR	۲/۵
مخلوط dNTP (شامل ۲۰۰µ M از هر یک از dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	۰/۵
کلرید منیزیم mM	۳/۷۵
آغازگر	۰/۳۳
تک DNA پلی مراز	۰/۱
DNAی الگو	۱
جمع	۲۵

واکنش‌های تکثیر در یک دستگاه ترمو سایکلر[2] مدل: Ependorf-Gradiant Master Cycler) به شرح ذیل صورت گرفت:

یک چرخه :		
شروع واسرشت سازی DNA	۲ دقیقه	۹۴ درجه سانتی‌گراد
۴۵ چرخه:		
تک رشته ای شدن DNA	۱۵ ثانیه	۹۴ درجه سانتی‌گراد
اتصال آغازگر به DNA	۳۰ ثانیه	۴۰ درجه سانتی‌گراد
بسط آغازگر	۹۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد
یک چرخه:		
بسط نهایی	۵ دقیقه	۷۲ درجه سانتی‌گراد

و محصولات تکثیر PCR تا انجام الکتروفورز ژل آگارز در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

1- Amplification
2- Thermocycler

الکتروفورز ژل آگارز[1]:
برای انجام الکتروفورز از ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده شد.

آنالیز داده‌های RAPD: پس از انجام الکتروفورز نتایج حاصل از RAPD برای هر نمونه آغازگر، برای وجود باند عدد (۱) و عدم وجود عدد (۰) امتیازدهی شد. داده‌ها در یک جدول دو طرفه ثبت و ضریب تشابه جاکارد[2] محاسبه گردید. سپس بر اساس ضرایب تشابه بدست آمده از نتایج RAPD با استفاده از روش UPGMA تجزیه خوشه‌ای انجام و دندروگرام مربوطه ترسیم گردید.

نتایج

استخراج و خالص‌سازی DNA با استفاده از روش مورد استفاده در این تحقیق به نحو مطلوبی صورت گرفت .نتایج حاصل از دو روش اسپکتروفوتومتری و استفاده از ژل آگارز ۰/۸٪ هر دو میزان کمیت وکیفیت DNA استخراجی را تایید نمود. لذا این روش اقتصادی، سریع و کم خطر استخراج DNA برای پنبه معرفی می‌گردد. ۳۰ آغازگر ده‌تایی برای آنالیز RAPD مورد استفاده قرار گرفت (جدول۴).

جدول ۴- آغازگرهای تصادفی ده تایی مورد استفاده در این تحقیق.

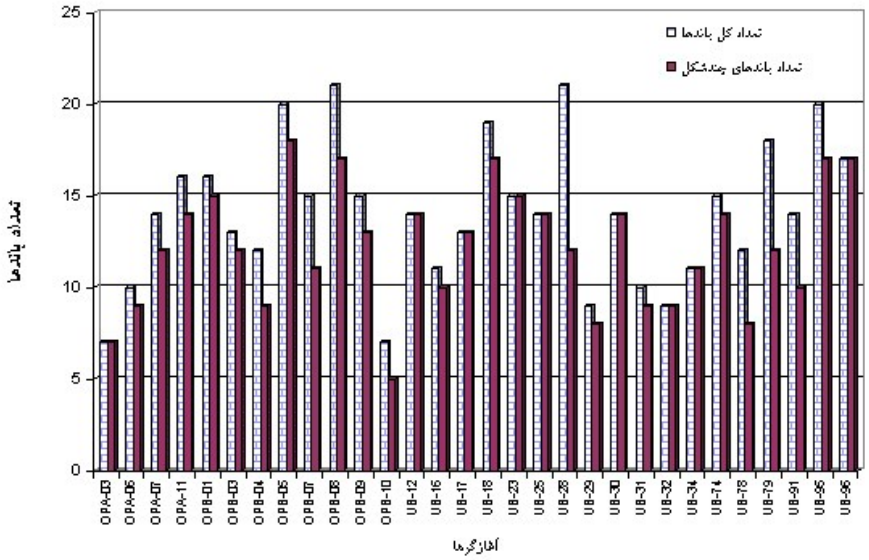
شماره	آغازگر	توالی ("۳ → '۵)	تعداد کل قطعات تکثیر شده (T)	تعداد قطعات دارای چند شکلی (P)	درصد چند شکلی (P/T)×۱۰۰
۱	OPA-03	AGTCAGCCAC	۷	۷	۱۰۰
۲	OPA-06	GGTCCCAGAC	۱۰	۹	۹۰
۳	OPA-07	GAAACGGGTG	۱۴	۱۲	۸۶
۴	OPA-11	CAATCGCCGT	۱۶	۱۴	۸۸
۵	OPB-01	GTTTCGCTCC	۱۶	۱۵	۹۴
۶	OPB-03	CATCCCCCTG	۱۳	۱۲	۹۲
۷	OPB-04	GGACTGGAGT	۱۲	۹	۷۵
۸	OPB-05	TGCGCCCTTC	۲۰	۱۸	۹۰
۹	OPB-07	GGTGACGCAG	۱۵	۱۱	۷۳
۱۰	OPB-08	GTCCACACGG	۲۱	۱۷	۸۱
۱۱	OPB-09	TGGGGGACTC	۱۵	۱۳	۸۷
۱۲	OPB-10	CTGCTGGGAC	۷	۵	۷۲
۱۳	UB-12	CCTGGGTCCA	۱۴	۱۴	۱۰۰
۱۴	UB-16	GGTGGCGGGA	۱۱	۱۰	۹۱

1- Agarose gel electrphoresis
2- Jaccard's Coefficient of Similarity

ادامه جدول ۴-

۱۵	UB-17	CCTGGGCCTC	۱۳	۱۳	۱۰۰
۱۶	UB-18	GGGCCCTTTA	۱۹	۱۷	۸۹
۱۷	UB-23	CCCGCCTTCC	۱۵	۱۵	۱۰۰
۱۸	UB-25	ACAGGGCTCA	۱۴	۱۴	۱۰۰
۱۹	UB-28	CCGGCCTTAA	۲۱	۱۲	۵۷
۲۰	UB-29	CCGGCCTTAC	۹	۸	۸۹
۲۱	UB-30	CCGGCCTTAG	۱۴	۱۴	۱۰۰
۲۲	UB-31	CCGGCCTTCC	۱۰	۹	۹۰
۲۳	UB-32	CCGCGTGGAA	۹	۹	۱۰۰
۲۴	UB-34	CCGGCCCCAA	۱۱	۱۱	۱۰۰
۲۵	UB-74	GAGCACCTGA	۱۵	۱۴	۹۳
۲۶	UB-78	GAGCACCAGT	۱۲	۸	۶۷
۲۷	UB-79	GAGCTCGTGT	۱۸	۱۲	۶۷
۲۸	UB-91	GGGTGGTTGC	۱۴	۱۰	۷۱
۲۹	UB-95	GGGGGGTTGG	۲۰	۱۷	۸۵
۳۰	UB-96	GGCGGCATGG	۱۷	۱۷	۱۰۰
کل	--	--	۴۲۲	۳۶۶	--
میانگین	--	--	۱۴/۱	۱۲/۲	۸۸

شکل ۱ تعداد کل قطعات تکثیر شده و همچنین تعداد باندهای چند شکل را برای ۳۰ آغازگر تصادفی مورد استفاده در ۲۸ نمونه مورد بررسی نشان می‌دهد.

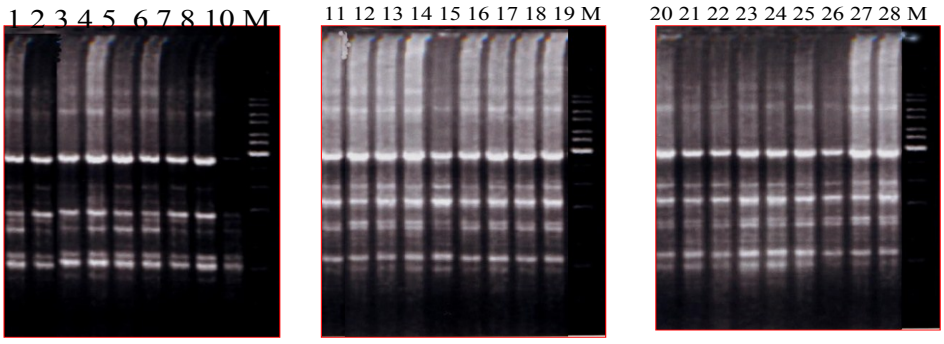


شکل ۱- تعداد کل قطعات تکثیر شده به همراه تعداد باندهای چند شکل برای ۳۰ آغازگر تصادفی.

تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف، متفاوت بود. از ۳۰ آغازگر مورد استفاده چند شکلی (پلی‌مورفیسم) در ۹ آغازگر ۱۰۰ درصد بود. کمترین چندشکلی ۵۷ درصد مربوط بـه آغـازگر UB-28 بوده و میانگین چندشکلی در همه آغازگرها بر روی ۲۸ نمونـه پنبـه ۸۸ درصـد بـود. بیشـترین قطعـه تکثیـر شـده ۲۱ عـدد و مربـوط بـه دو آغـازگر UB-28 و OPB-08 و کمتـرین ۷ عـدد و مربـوط بـه آغازگرهای OPA-03 و OPB-10 بود. از این ۳۰ آغازگر برای بررسی فاصله ژنتیکی و یـا خویشـاوندی بین ژنوتیپ‌ها استفاده شد. الگوهای باندی به‌دست آمده به‌وسیله آغازگرهای UB-12، UB-17 و UB-25 در شکل های ۲ تا ۴ نشان داده شده است.

5’ ——→3’

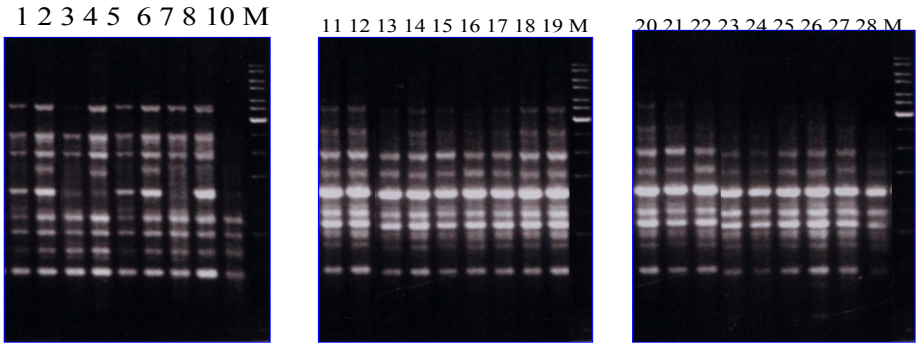
CCT GGG TCC A **UB12**



شکل ۲- الگوی باندی بدست آمده با آغازگر UB-12 شماره‌های ۱ تا ۲۸ نمونه‌های پنبه مورد بررسی می‌باشد. نمونه‌های ۱ تا ۱۰ ژنوتیپ‌های دیپلوئید و نمونه‌های ۱۱ تا ۲۸ ژنوتیپ‌های تتراپلوئید.

5’ ⟶3’

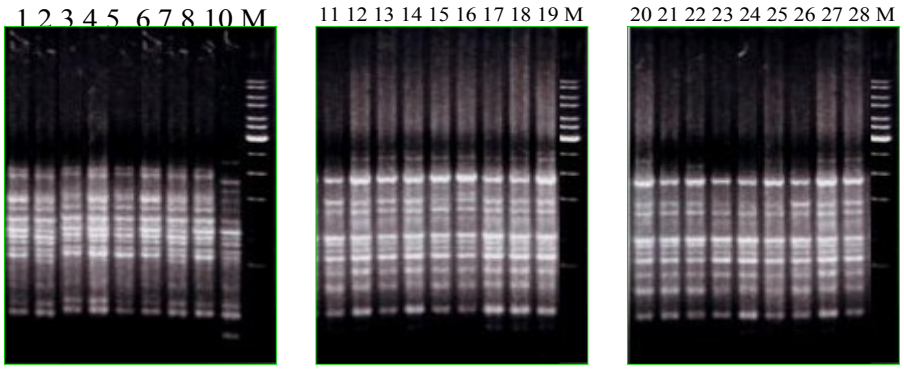
CCT GGG CCT C **UB17**



شکل ۳- الگوی باندی بدست آمده با آغازگر UB-17 شماره‌های ۱ تا ۲۸ نمونه‌های پنبه مورد بررسی می‌باشد. نمونه‌های ۱ تا ۱۰ ژنوتیپ‌های دیپلوئید و نمونه‌های ۱۱ تا ۲۸ ژنوتیپ‌های تتراپلوئید.

5’ ⟶3’

ACA GGG CTC A **UB25**



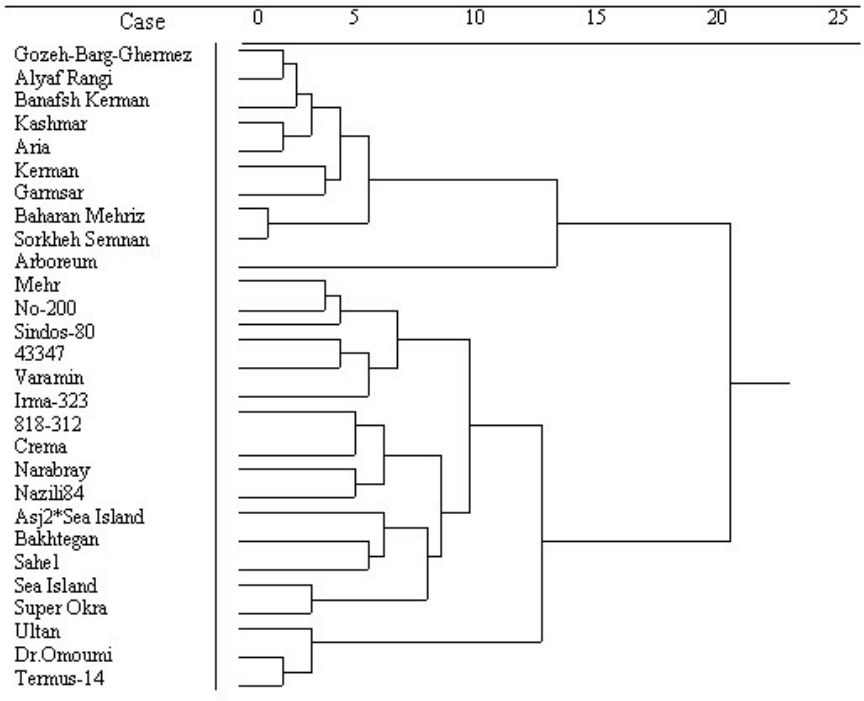
شکل ۴- الگوی باندی بدست آمده با آغازگر UB-25 شماره‌های ۱ تا ۲۸ نمونه‌های پنبه مورد بررسی می‌باشد. نمونه‌های ۱ تا ۱۰ ژنوتیپ‌های دیپلوئید و نمونه‌های ۱۱ تا ۲۸ ژنوتیپ‌های تتراپلوئید.

ماتریس تشابه بر اساس ضرایب تشابه جاکارد بین نمونه‌ها بر اساس وجود یا عدم وجود باند بدست آمد. جدول ۵ دامنه تغییرات ضرایب تشابه را براساس سطح پلوئیدی نشان می‌دهد.

جدول ۵- دامنه تغییرات ضرایب تشابه براساس نتایج (RAPD) در دو سطح پلوئیدی نمونه های پنبه.

	دیپلوئید با دیپلوئید (2X,2X)	دیپلوئید با تتراپلوئید (2X,4X)	تتراپلوئید با تتراپلوئید (2X,2X)
حداقل	۰/۶۵	۰/۲۳	۰/۵۸
حداکثر	۰/۹۳	۰/۴۴	۰/۹۶
میانگین	۰/۷۹	۰/۳۴	۰/۷۲

دندروگرام حاصل از نتایج تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس تشابهات بدست آمده از آنالیز RAPD در شکل ۵ آورده شده است که بر این اساس نمونه‌های پنبه در دو گروه عمده براساس سطح پلوئیدی طبقه‌بندی شده‌اند.



شکل ۵ – دندروگرام ارقام پنبه بر اساس روش UPGMA با استفاده از ۳۰ آغازگر تصادفی.

بحث

نتایج حاصل از آنالیز RAPD با استفاده از ۳۰ آغازگر تصادفی نشان دهنده تعداد مطلوب باند تشکیل شده (۴۲۲ باند) و همچنین تعداد باند چند شکلی ایجاد شده (۳۶۶ باند) بود، که به‌بطور متوسط در کل ۳۰ آغازگر تصادفی ۸۸ درصد پلی مورفیسم مشاهده گردید (جدول ۴).

در دندروگرام شکل ۵ نمونه‌های پنبه به دو گروه کلی تقسیم شده‌اند که این دو گروه همان دو سطح پلوئیدی یعنی دیپلوئید وتتراپلوئید ارقام پنبه است.

در داخل گروه اول که ۱۰ نمونه دیپلوئید قرار دارد، تک نمونه گونه *G.arboreum* که بومی هندوستان است در یک کلاستر جداگانه از ۹ نمونه گونه *G.herbaceum* که بومی‌مناطق مختلف ایران است قرار دارند. این مطلب با گروه‌بندی نمونه‌ها با استفاده از صفات مرفولوژیکی که در فصل چهارم بخش دوم آورده شده مطابقت دارد. توده‌های بومی‌ایران از گونه *G.herbaceum* از نظر صفات کیفی الیاف ضعیف بوده ولی به تنش‌های محیطی خصوصا تنش‌های غیرزنده تحمل خوبی نشان می‌دهند. ولی گونه دیپلوئید *G.arboreum* قدرت سازگاری پایینی داشته ولی صفات تکنولوژیکی الیاف آن در حد قابل قبولی می‌باشد. از نتایج حاصل از این بررسی و همچنین خصوصیات مرفولوژیکی این ارقام و تشابه کم نمونه‌های این دو گونه به یکدیگر چنینی استنباط می‌شود که می‌توان با استفاده از دورگ‌گیری می‌توان صفات مطلوب این دو گونه دیپلوئید را به اشتراک گذاشت. با توجه به اینکه هر دو گونه از نظر سطح پلوئیدی مشابه هستند لذا تلاقی آنها به آسانی صورت می‌گیرد.

در داخل گروه دوم که ۱۸ نمونه تتراپلوئید قرار گرفته‌اند، دو رقم دکتر عمومی و $Termus_{14}$ از گونه *G.barbadense* در یک کلاستر مجزا قرار گرفته و ۱۶ نمونه مربوط به گونه *G.hirsutum* براساس اختلافات و تشابهات با یکدیگر در کلاسترهای متفاوت قرار گرفته‌اند. این نتایج با اختلاف های جزیی از صفات مرفولوژیکی این ارقام نیز بدست آمد (رجوع شود به فصل چهارم بخش اول). ارقام گونه *G.barbadense* یا پنبه‌های پیما، جزو ارقام دیررس پنبه طبقه‌بندی شده، صفات تکنولوژیکی مطلوب الیاف خصوصا طول الیاف بالا داشته و مربوط به نواحی گرمسیری جهان نیز می‌باشند. در حالی که ارقام گونه *G.hirsutum* یا پنبه‌های آپلند، عمدتا جزو ارقام زودرس و متوسط رس پنبه قرار گرفته و در دامنه وسیعی از شرایط محیطی قابل کشت می‌باشند ولی صفات تکنولوژیکی الیاف آنها مانند پنبه‌های پیما نمی‌باشد. ارقام زودرس تر پنبه های آپلند مثل مهر، No-200، Sindoz-80، ۴۳۳۴۷ همه با منشاء اروپایی و سردسیر در این تحقیق در دسته های دورتر از پنبه های پیما (دکتر عمومی و $Termus_{14}$) که دارای منشاء آفرقایی و گرمسیر هستند، قرار گرفته‌اند. هچنین ارقام ساحل و بختگان که از ارقام تجاری ایران هستند و متحمل به بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی‌در یک دسته قرار گرفته و همچنینی در دسته‌های نزدیک به آنها ارقام متحمل دیگر نیز قرار گرفته‌اند.

از بررسی‌های انجام شده برای گروه‌بندی گونه‌های مختلف پنبه می‌توان استنباط کرد که نشانگر مولکولی RAPD به همراه روش‌های آماری چند متغیره مانند تجزیه کلاستر خواهد توانست برای بررسی روابط خویشاوندی، تنوع ژنتیکی و جغرافیایی پنبه مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به تطابق شباهت ها و اختلافات بدست آمده از دو روش مولکولی و مرفولوژیکی و همچنین منشاء جغرافیایی دسته های مختلف می‌توان به نتایج بدست آمده از دندروگرام شکل ۵ اعتماد کرد.

با توجه به اینکه شجره اغلب ژنوتیپ‌های مورد استفاده مشخص است، لذا می‌توان اذعان داشت که خویشاوندی‌های به‌دست آمده بین ژنوتیپ‌ها بر اساس این روش تا حد زیادی به واقعیت نزدیکند. بنابراین می‌توان چنین فرض کرد که اگر چنین آنالیزی به نمونه های دیگر پنبه با اطلاعات شجره‌ای ناشناخته یا از منشاءهای مختلف تعمیم داده شود، احتمال فراهم کردن تصویری از روابط خویشاوندی ژنتیکی آنها وجود دارد.

سطح چند شکلی نمایان شده به وسیله این نمونه ها می‌تواند در نقشه ژنتیکی جمعیت ها برای نشانمند نمودن صفات مهم اقتصادی مانند صفات تکنولوژیکی الیاف به کار رود.

محققین زیاد دیگری نیز با استفاده از تکنیک RAPD و یا سایر مارکرها روابط ژنتیکی درون و بین گونه‌ای جنس *Gossypium* را تعیین نموده‌اند (تاتیننی و همکاران، ۱۹۹۶؛ اقبال و همکاران، ۱۹۹۷؛ لی و همکاران، ۲۰۰۱؛ وفایی تبار، ۲۰۰۳).

هتروزیس در تلاقی‌های بین و درون گونه‌ای پنبه در موارد زیادی گزارش شده است (رمضانی‌مقدم و طلعت، ۲۰۰۶). لذا در پروژه‌های اصلاح گونه‌های زراعی پنبه می‌توان بر اساس فاصله‌های ژنتیکی حاصل از این بررسی، ارقامی را که دارای کمترین تشابه هستند با هم تلاقی داده و از هتروزیس بهره برد. بر این اساس با توجه به قابلیت بالای تلاقی بین دو گونه تتراپلوئید *G.barbadense* و *G.hirsutum* (رمضانی‌مقدم و طلعت، ۲۰۰۶) می‌توان خصوصیات مطلوب این دو گونه به اشتراک گذاشته شود. همچنین با توجه به دوری گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید از یکدیگر و استفاده از تکنیک نجات جنین می‌توان نسبت به انتقال صفات مطلوب مقاومت به تنش‌های محیطی از گونه‌های دیپلوئید به تتراپلوئید اقدام نمود.

منابع

Abdalla, A.M., Reddy, O., El-Zik, K.M., and Pepper, A.E. 2001. Genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid cottons revealed using AFLP. *Theor. Appl. Genet*. 102: 222-229.

Alishah, O. 2001. Study of morphological traits and genetic variation in different genotypes of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) in Iran. Journal of seed and plant. 17(1): 44-60.

Ghasemi Bezdi K., Abdemishani, S., Hosseinzadeh, H., and Seyedtabatabei, B.A., 2000. Study on DNA polymorphism among some genotypes of Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) using RAPD-PCR technique. Journal of Agricul. Sci. of Iran. 31: 689-700.

Iqbal M.J., and Rayburn, A.L. 1994. Stability of RAPD markers for determining cultivar specific DNA profiles in rye (*Secale cereal* L.) *Euphytica*, 75: 215-220.

Iqbal, M.J., Aziz, N., Saeed, N.A., Zafar, Y. and Malik, K.A. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 94:139-144.

Li, H., Luo, J., Hemphill, J.K., Wang, J.T. and Gould, J.H. 2001. A rapid and high yielding DNA miniprep for cotton (*Gossypium* spp.). *Plant Mol. Biol. Report. 19:183a-183e.*

Ramazani Moghaddam, M.R., Majidi-haravan, E., Zamani-zadeh, H.R., Mohammadi, S.A. and Azizi, M. 2006. Study on genetic diversity in diploid cotton (*Gossypium herbaceum, G. arboreum*) using morphological traits. Journal of Agricultural Science. 4: 721-831.

Ramazani Moghaddam, M.R., and Talat, F. 2006. Investigation of general and specific combining ability in cotton using line × tester analysis. Journal of Agricultural Science. Special Issue (No.1). P: 57-65.

Ramazani-Moghaddam, M.R., Majidi, I., Zamanizadeh, H.R., Mohammadi, S.A., and Azizi, M. 2004. Genetic variation for improving the salt tolerance of domesticated diplod cotton. *Book of Absratcts*. *ICGI-2004 Conference.* pp: 92. Heyderabad, India.

Ramazani Moghaddam, M.R., 2004. Determination of the best selection index for cotton species (*Gossypium* sp.) under salinity stress and non-stress conditions. Ph.D. thesis of Azad University, Science and Research unit, Tehran. Iran. 187pp.

Stanton, M.A., Stewart, J., and Percival, A.E. 1994. Morphological diversity in the A genome cotton *G. arboreum* and *G. herbaceum.* Crop Sci. 34: 519-526.

Tatineni, V., Cantrell, R.G. and Davis, D.D. 1996. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. Crop Sci., 36:186-192.

Vafaie-Tabar, M. 2003. Studies on interspecific hybridization in *Gossypium* spp., Ph.D. Thesis. Faculty of the Post-Graduate School, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi.

Williams, W.A., Jones, M.B. and Demment, M.W. 1990. A concise table for path analysis statistic. Agron. J. 82:1022-1024.

Zhang J. and McD. Stewart, J. 2000. Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. J. of Cotton Sci. 4:193-201.

Iranian Journal of Cotton Researches
Vol. 1, No. 2, 2014
www.jcri.ir

Study of genetic diversity and relationships among some diploid and tetraploid cotton genotypes of Iran using RAPD's Marker

M.R. Ramazani-moghaddam[*1], E. Majidi-haravan[2], H.R. Zamani-zadeh[3], S.A. Mohammadi [4] and M. Azizi[1]
[1]Assistant Prof. Agricultural and Natural Resources, Research Center of Khorasan Razavi, Iran, [2]Prof. Agriculture Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran, [3]Associate Prof. Azad University, Science and Research unit, Tehran. Iran, [4]Prof. Tabriz University, Agronomy and Plant Breeding Department, Iran
Received: 2013/8/12 Accepted: 2014/2/16

Abstract

Gossypium species (about 49 species) are vast resources of genetic diversity for improvement of cultivated cotton. To determine intra- and inter-specific genetic diversity and relationships, it was employed 30 RAPD's random decamer primers on twenty eight cotton accessions from 2 diploid cultivated species (*G.arboreum, G.herbaceum*) and 2 tetraploid cultivated species (*G.hirsutum, G.barbadense*). A total of 422 RAPD bands were amplified of which 88% (366) were polymorphic. Similarity indices estimated on the basis RAPD markers and cluster analysis based on similarity values showed high correspondence between RAPD marker system and known taxonomic relationships.

***Keywords*:** DNA Fingerprinting; *Gossypium* Species; Genetic Similarity; Family Relationships

* Corresponding author; mr.ramezani@areo.ir