Archive of SID

مجله تازه های زیست فناوری سلولی- مولکولی
دوره اول، شماره اول، زمستان ۱۳۸۹

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف پنبه با استفاده از مارکرهای مولکولی RAPD

فرزانه تفویضی*[۱]، مسعود شیدایی[۲]، فرح فراهانی[۳]

[۱] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران- ایران
[۲] استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم پایه، دانشگاه شهید بهشتی، تهران- ایران
[۳] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم- ایران

چکیده

سابقه و هدف: پنبه یکی از مهم ترین محصولات گیاهی در ایران است و در نواحی مختلفی کشت می شود. کشت مداوم یکسری از ژنوتیپ ها منجر به فرسایش ژنتیکی در دراز مدت می گردد، بنابر این مطالعه تنوع ژنتیکی و معرفی ارقامی با تنوع ژنتیکی بالا امری مهم و ضروری است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تنوع ژنتیکی ده رقم مختلف پنبه تتراپلوئید (*Gossypium hirsutum* L.) با استفاده از روش مولکولی RAPD مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: از ۳۰ پرایمر مورد بررسی، ۲۲ پرایمر باندهای قابل ارزش گذاری تولید نمودند. در مجموع، ۳۸۷ باند حاصل شد که ۱۷۸ باند پلی مرف بودند. پرایمر OPM11 بیشترین باند پلی مرف و پرایمر OPC09 بیشترین باند اختصاصی را تولید کردند در حالی که بعضی از پرایمرها هیچ باند اختصاصی نداشتند. بعضی ارقام دارای باندهای اختصاصی بودند. بیشترین باند اختصاصی متعلق به رقم سی اکرا بود (۶ باند).

نتیجه گیری: گروه بندی ارقام با روش NJ انجام گرفت که نشان دهنده تنوع ژنتیکی ارقام مورد مطالعه براساس مارکرهای مولکولی RAPD بود. بر اساس دندروگرام رسم شده دو رقم والدینی سی اکرا و نازلی دارای بیشترین تشابه ژنتیکی (۱۰۰٪ bootstrap) با یکدیگر بودند.

کلمات کلیدی: *Gossypium hirsutum* L.، مارکرهای RAPD، تنوع ژنتیکی

مقدمه

پنبه یکی از مهم ترین محصولات لیفی و اقتصادی به شمار می رود و در ۷۰ کشور جهان کاشته می شود. . الیاف پنبه به لحاظ بر خورداری از بعضی خصوصیات منحصر به فرد مانند استحکام، مقاومت در برابر گرما، دوام، رنگ پذیری، انتقال رطوبت، کیفیت و لطافت پارچه های حاصله از اهمیت بالایی بر خوردار می باشند. بذر پنبه دومین مقام را از نظر میزان روغن بعد از سویا دار است، لذا تولید روغن، دومین هدف کاشت و پرورش پنبه را تشکیل می دهد. به طور کلی پنبه تاثیرات مهم و اساسی در اقتصاد کشورها از جمله تامین کالاهای اساسی جامعه نظیر نخ، پارچه، روغن، علوفه دام، تاثیر در صنعت و اقتصاد ملی کشور نظیر کارخانجات نساجی، پنبه پاک کنی، روغن کشی، بافندگی و تاثیر در اشتغال زایی دارد. در حال حاضر، بیش از ۱۸۰ میلیون نفر در جهان به طور مستقیم و غیر مستقیم وابسته به مشاغل مرتبط با پنبه و مشتقات آن می باشند (عالیشاه، ۱۳۷۴). در نواحی مختلفی جغرافیایی هم از ارقام دیپلوئید گیاه (Gossypium berbaceum) و هم تتراپلویید (G.hirsutum) ایران کشت می شوند. گر چه پیشرفت های بزرگی در زمینه بهبود روش های تکثیر مرسوم و رایج پنبه صورت گرفته است، ولی بسیار وقت گیر بوده و تجاری کردن واریته های جدید به ۱۰-۶ سال زمان نیاز دارد. کشت یکنواخت ارقام مختلف پنبه، همچنین انتخاب ژنوتیپ ها بر اساس چند صفت زراعی خاص باعث از دست رفتن تنوعات ژنتیکی موجود در گیاهان می شود که فرسایش ژنتیکی (genetic erosion) نام دارد. از طرفی، تنوع ژرم پلاسم یکی از نقاط توجه به نژادگران می باشد. به نژادگران بر اساس تنوع ژنتیکی بین والدین، ترکیبات ژنی منحصر به فردی را برای ارقام جدید برتر ایجاد می کنند. استفاده بیش از حد از ارقام نزدیک به هم باعث آسیب پذیری بیشتر ارقام در برابر حشرات و بیماری ها خواهد شد. اهمیت تنوع ژنتیکی در آسیب پذیری محصولات امری بسیار

آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، دانشکده ی علوم زیستی، گروه زیست شناسی
Email:farzaneh.tafvizi@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۹/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۰۳
www.SID.ir

Archive of SID

شناخته شده است (Van Esbroeck and Bowman., 1998). مارکرهای (Random Amplifiled Poloymorph DNA) RAPD مولکولی در جهت آشکار سازی تنوع ژنتیکی بین ارقام و ژنوتیپ های گیاهان زراعی از جمله پنبه مورد استفاده قرار گرفته اند (Kumar et al., 2003; Vafaie-tabar et al., 2003; Mehetre et al., 2004).

مارکرهای DNA، مزایایی نسبت به مارکرهای مورفولوژیکی دارند، پلی مرف هستند و آثار اپی استاتیک و پلیوتروپیک ندارند و تحت تاثیر شرایط محیطی قرار نمی گیرند. بنابر این در جهت افزایش و بالا بردن ذخیره ژرم پلاسم به کار می روند (Cantrell et al., 1999). در این تحقیق، تنوع مولکولی ارقام پنبه و هیبریدهای آن ها مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی: بذرهای پنبه مورد مطالعه در این تحقیق، شامل ارقام والدینی سی اکرا، ساحل، نازلی، تابلادیلا و هیبریدهایشان یعنی ساحل × سی اکرا، سی اکرا × نازلی، ساحل × نازلی، ساحل × تابلادیلا، سی اکرا × تابلادیلا و نازلی × تابلادیلا متعلق به جنس *Gossypium hirsutum* می باشند که از مرکز تحقیقات پنبه شهرستان گرگان تهیه شدند. بعد از حذف الیاف سلولزی از سطح بذرها، بذرها به مدت روز خیسانده شده و سپس داخل گلدان کاشته شدند. سه هفته بعد از رویش گیاه، از برگ های تازه روییده برای استخراج DNA ژنومی استفاده شد.

استخراج DNA: جهت استخراج DNA ژنومی از روش Dela Rosa و همکاران استفاده شد (Dela Rosa., 2002). این روش مبتنی بر استفاده از CTAB بوده و روش تغییر یافته (Murry and Tompson., 1980) می باشد.

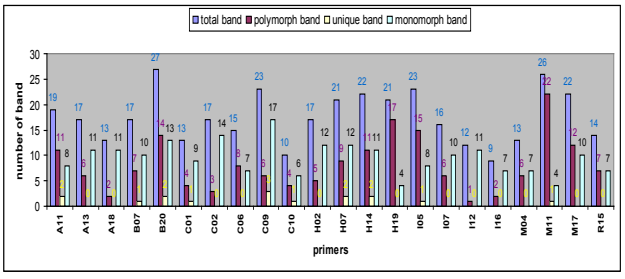
واکنش PCR: برای انجام واکنش PCR سی پرایمر RAPD تهیه شده از شرکت اپرون مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR متشکل از ۱ نانوگرم DNA الگو، 1X Buffer PCR که شامل (۱۰mM.Tris HCL pH =۸.۸ ،۲۵ mM KCL)، ۲۰۰µM dNTP و ۰،۸ میکرومولار پرایمرهای تصادفی ۱۰ جفت بازی و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، حجم کلی واکنش ۲۵µL در نظر گرفته شد. تکثیر DNA در دستگاه (Corbet,Australia) و Palmcycler GP-۰۰۱ انجام شد. دناتوره شدن DNA الگو در دمای ۹۲ درجه سانتی گراد DNA انجام شد. دناتوره شدن DNA به مدت ۳ دقیقه انجام گرفت و به دنبال آن واکنش تکثیری در ۳۵ سیکل به شرح زیر انجام شد :

دناتوره شدن در ۹۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمر در ۳۶ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و گسترش پرایمر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه. انکوباسیون نهایی به مدت ده دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای حصول اطمینان از تکمیل و گسترش پرایمرها صورت گرفت. جهت آشکار سازی از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ با استفاده از بافر PCR محصولات TBE ۰.۵ x (۰.۵ mM EDTA , pH= ۸ , ۴۴.۵ mM Tris /Borate). ژل با رنگ اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد و با نور uv، مورد بررسی قرار گرفت (Sambrook et al. 2001) مارکر ۱۰۰bp (Gene Ruler,fermentas) به عنوان مارکر مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

داده های RAPD به صورت دو حالته می باشند. بدین صورت که حضور باندها با کد یک و عدم حضور باندها با کد صفر مشخص می شود. پس از ارزش گذاری نشانگرهای RAPD به طریق فوق، آنالیزهای آماری زیر بر روی داده ها انجام گرفت. ضریب تشابه Juccard و نیز فاصله ی ژنتیکی (Nei., 1979) Neis در بین ارقام مورد مطالعه محاسبه شد و برای گروه بندی ژنوتیپ ها روش NJ (Neighbor Joining) مورد استفاده قرار گرفت. ارقام با استفاده از آنالیز PCO (Principal Coordinate analysis) انجام گرفت (Podani., 2000; Weising et al., 2005).

یافته ها

۳۰ پرایمر برای واکنش RAPD-PCR استفاده شد که فقط ۲۲ پرایمر قادر به ایجاد باند بودند. در کل، ۳۸۷ باند حاصل شد که ۱۷۸ باند پلی مرف و ۲۰۹ باند در بین ارقام مورد مطالعه مشترک بودند. در بین پرایمرهای مورد استفاده، پرایمر OPB-20 و OPM-11، به ترتیب با ۲۷ و۲۶ باند، بیشترین باند را ایجاد نمودند (شکل۱)، در حالی که پرایمرهای OPI-16, OPC-10 به ترتیب با ۱۰ و ۹ باند کمترین باندها را تولید کردند (شکل ۱).



شکل ۱- نمودار تعداد کل باندها به همراه تعداد باندهای پلی مرف، مشترک و اختصاصی در هر پرایمر.

www.SID.ir

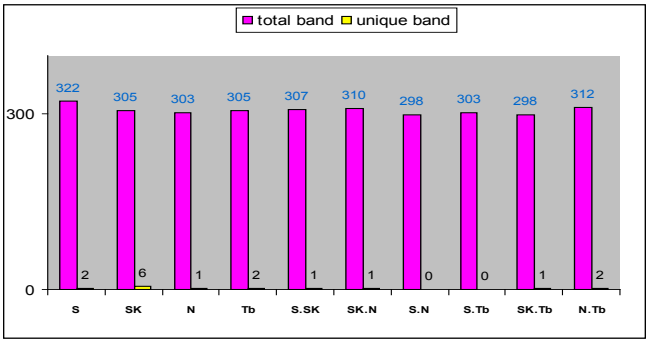
Archive of SID

پرایمر OPM-11 با ۲۲ باند و پرایمر OPI-12 با یک باند به ترتیب، بیشترین و کمترین باندهای پلی مرف را تولید کردند (شکل۱)

از ۲۲ پرایمر مورد استفاده، ۱۰ پرایمر به نام های:

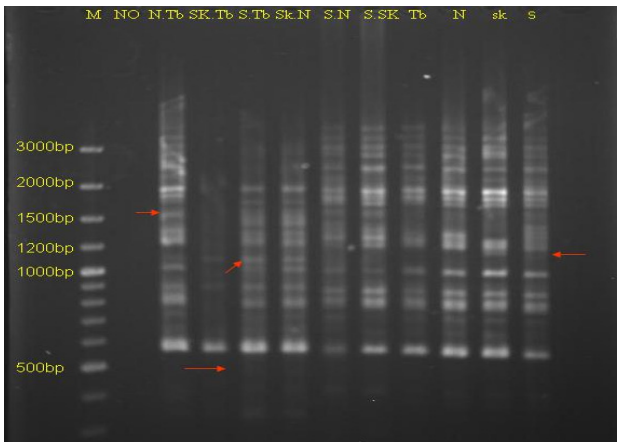
OPA-11 ,OPB-07, OPB-20 ,OPC-01 ,OPC-09

OPC-10 ,OPH-07, OPH14 ,OPI-05 ,OPM-11, باندهای اختصاصی (unique band) ایجاد نمودند. که در این میان بیشترین باند اختصاصی (۳باند) توسط پرایمر OPC-09 تولید شد (شکل۱) و بعضی پرایمرها، باند اختصاصی تولید نکردند رقم Sahel با ۳۲۲ باند، بیشترین و رقم های sahel× Nazilli و Tabladilla× Sikra با ۲۹۸ باند کمترین باند را تولید نمودند (شکل۲).



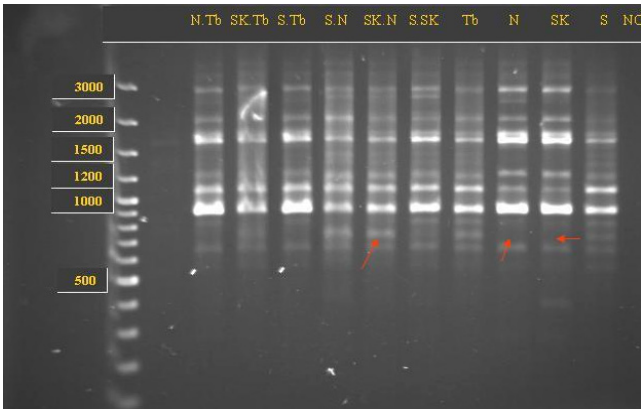
شکل۲- نمودار کل باندها به همراه باندهای اختصاصی در هر ژنوتیپ.
S=Sahel, SK=Siokra, N=Nazilli, Tb=Tabladilla, S.Sk=Sahel x Siokra,Sk.N=SiokraxNazilli,S.N=SahelxNazilli,S.Tb=Sahel x Tabladilla, Sk.Tb=Siokra x Tabladilla, N.Tb=Nazilli x Ta

شماره ۱۶ و ۱۰ (۱۲۵۰،۱۸۵۰bp) از پرایمر OPM-11 در Sahel, Tabladilla حضور دارند اما در هیبریدها دیده نشدند (شکل۳). باند شماره ۴ (۷۰۰ bp) پرایمر OPB-07 اختصاصی رقم Siokra × Tabladilla ، باند شماره ۲ (۳۲۰ bp) پرایمر OPH - 07 اختصاص به رقم Nazilli داشت، در حالی که باند شماره ۵ همان پرایمر اختصاصی Tabladilla بود. بعضی ارقام، مثل رقم های هیبرید Sahel × Nazilli و Tabladilla× Sahel هیچ باند اختصاصی تولید نکردند. بعضی باندها فقط در دو ژنوتیپ حضور داشتند. برای مثال باند شماره ۴ (۴۸۰ bp) پرایمر OPM - 11 در ارقام هیبرید Sahel × Nazilli و Sahel × Tabladilla (شکل ۳) مشاهده شد در حالی که باند شماره ۹ (۱۱۸۰ bp) همان پرایمر در ژنوتیپ های والدینی Sahel, Siokra رویت شد. بعضی باندها در تمام ژنوتیپ ها حضور داشتند و فقط در یک ژنوتیپ به چشم نمی خوردند. برای مثال باندهای شماره ۱۷،۲۱،۲۲،۱۴،۱۵،۵،۶، (۷۵۰،۸۰۰،۱۰۰۰،۱۶۰۰،۱۷۵۰،۱۹۵۰،۲۸۰۰،۳۰۰۰) bp



شکل ۳- الگوی قطعات تکثیرشده با پرایمر OPM-11,
M=مارکر ۱۰۰bp و کنترل منفی=no .
S=Sahel, SK=Siokra, N=Nazilli, Tb=Tabladilla, ,S.Sk=Sahel x Siokra
Sk.N=Siokra x Nazilli, S.N=Sahel x Nazilli, S.Tb=Sahel x Tabladilla, Sk.Tb=Siokra x Tabla-

پرایمر OPM-11، تنها در Tabladilla× Siokra حضور نداشتند. باند شماره ۶ (۱۱۰۰ bp) پرایمر OPH-19 تنها در رقم هیبرید Nazilli × Tabladilla حضور نداشت. باندهای شماره۹ و۱۲ (۱۳۵۰،۱۷۵۰ bp) همان پرایمر در رقم هیبرید× Tabladilla Siokra حضور نداشتند. بعضی باندها در ژنوتیپ های والدینی حضور نداشتند ولی در ارقام هیبریدشان تکثیر یافتند. برای مثال باندهای شماره ۹ و۱۱ (۲۲۰۰،۲۹۰۰bp) پرایمر OPA -11 در هیبرید Siokra × Sahel حضور داشتند اما در والدینی تکثیر نیافتند (شکل ۴).

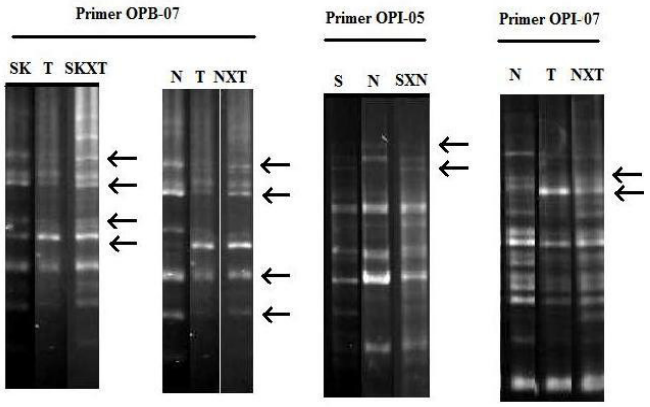


شکل ۴ - الگوی قطعات تکثیرشده با پرایمر OPM-11,
M=مارکر ۱۰۰bp و کنترل منفی=no .
S=Sahel, SK=Siokra, N=Nazilli, Tb=Tabladilla S.Sk=Sahel x Siokra Sk.N=Siokra x Nazilli, S.N=Sahel x Nazilli, S.Tb=Sahel x Tabladilla, Sk.Tb=Siokra x Tabladilla, N.Tb=Nazilli x Tabladilla

www.SID.ir

Archive of SID

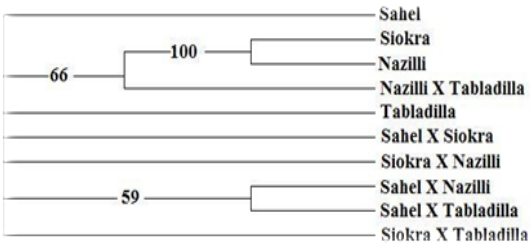
بعضی باندها در ژنوتیپ های والدینی حضور یافتند اما در هیبریدها دیده نشدند. باندهای شماره ۸،۱۴،۲۸ (۱۱۰۰،۱۴۵۰،۲۴۰۰ bp) پرایمر OPM-11 در رقم هیبرید Nazilli × Siokra دیده شدند اما در ارقام والدینی مشاهده نشدند. باندهای شماره ۸ و۴ (bp ۴۸۰،۱۱۰۰) پرایمرOPM-11 دررقم هیبرید Tabladilla × Sahel مشاهده شدند ولی در ژنوتیپ های والدینی تکثیر نیافتند (شکل۳). بعضی باندها در ژنوتیپ های والدینی دیده می شوند اما در هیبریدها حضور نداشتند. برای مثال، باندهای شماره ۲۵ و۲۰پرایمر OPM – ۱۱ (۱۰۰۰bp و ۲۶۰۰) و باندهای ۵ و ۴،۲،۱ از پرایمر (bp۹۲۰ و ۸۰۰ و ۶۷۰ و ۶۰۰) OPH -۱۹ در ژنوتیپ های والدینی Nazilli، Siokra حضور داشتند اما در هیبرید وجود نداشتند. باندهای شماره ۱۶ و ۱۰ از پرایمر (bp ۱۸۵۰ و ۱۲۵۰) OPM- ۱۱ در Sahel , Tabladilla حضور دارند اما در هیبریدها دیده نشدند (شکل۳). کوچکترین قطعه ارزش گذاری شده (bp ۱۸۰) توسط پرایمر ۱۴– OPH و بزرگ ترین قطعه ارزش گذاری شده (bp ۳۰۰۰) توسط پرایمر ۲۰ – OPH تکثیر یافتند. بعضی باندها وراثت Codominant را نشان دادند و دو باند متفاوت که در ژنوتیپ های والدینی حضور داشتند که هر دو در هیبرید آن دو نیز دیده شدند (شکل ۵).



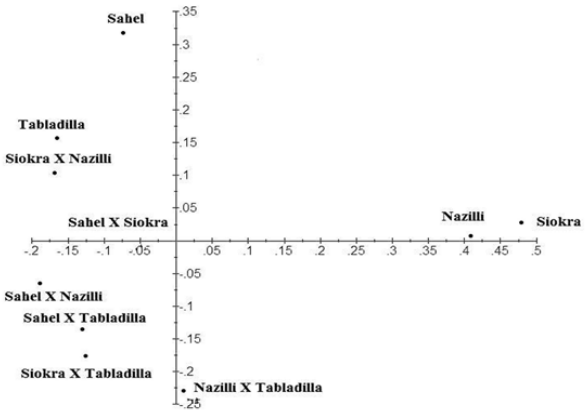
شکل۵- فلش ها نشان دهنده باندهای codominant درهیبریدها می باشند.

روش گروه بندی (NJ) بر روی داده های مولکولی انجام گرفت که توسط آنالیز PCO نیز تائید شد (شکل ۶ و ۷) در تمام آنالیزها دو رقم والدینی Siokra و Nazilli بیشترین تشابه ژنتیکی را با یکدیگر و دو رقم هیبرید Sahel × Soikra و Nazilli × Tabladilla تشابه ژنتیکی با ارقام والدینی نشان دادند.

دو رقم والدینی Nazilli و Siokra با ٪ bootstrap ۱۰۰ در دندروگرام NJ با هم در یک گروه قرار گرفتند. Nazilli × Sahel و Tabladilla × Sahel ارتباط نزدیکی با یکدیگر نشان دادند و در دندروگرام رسم شده با روش NJ با هم قرار گرفتند. دو هیبرید دیگر یعنی Tabladilla × Nazilli و Tabladilla × Siokra تشابه ژنتیکی با این ارقام نشان دادند و با همان فاصله در دندروگرام به آن ها متصل شدند. رقم× Tabladilla Nazilli در دندروگرام نزدیک به رقم والد خود Nazilli قرارگرفت



شکل ۶ - دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ژنوتیپ های پنبه با روش NJ. مقادیر بالای خوشه ها مقادیر Bootstrap می باشند.



شکل۷- نمودار رسته بندی PCO ژنوتیپ های پنبه بر اساس داده های مولکولی RAPD.

بحث

فقدان تنوع ژنتیکی در پیشرفت و توسعه آرام ارقام جدید پنبه با قابلیت هایی چون تولید محصول فراوان، کیفیت بالای محصول و مقاومت گیاه به استرس مشهود می باشد. یکی از راه کارها در جهت افزایش تنوع ژنتیکی، جمع آوری ژرم پلاسم ها و توسعه هیبریدهای inter – specific و intra – specific می باشد، هیبرید های inter – specific به دلیل وقوع شکست ژنتیکی درF2 و نسل های بعدی همیشه موفق نیستند.

www.SID.ir

Archive of SID

مقادیر کم DNA، عدم طراحی پرایمر اختصاصی و شناسایی ژن مورد نظر، آشکار سازی آسان بر روی ژل آگارز و در نهایت عدم نیاز به آشکار سازی توسط مواد رادیو اکتیو اشاره کرد (Williams et al., 1990 ,Weising et al., 1995). RAPD یک روش موفقیت آمیز و کار آمد در شناسایی و تمایز ارقام مختلف پنبه می باشد. بسیاری از محققین بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ های پنبه را با استفاده از مارکرهای RAPD انجام داده اند که در ادامه راجع به آن بحث می شود. بنابر این بسیاری از برنامه ها در راستای توسعه هیبرید های – intra specific پیش می رود. ورود ژن های جدید از طریق هیبریداسیون intra – specific به ارقام جدید، باعث افزایش خزانه ژنتیکی گیاه پنبه خواهد شد. برنامه های موفقیت آمیز اصلاح نباتات وابسته به داشتن دانش کافی و کامل از تنوع ژنتیکی در بین منابع ژنتیکی در دسترس ژرم پلاسم دارد و اصلاح گران را قادر به انتخاب منابع والدی مناسب در جهت ایجاد جمعیت متنوع (از نظر ژنتیکی) می سازد. چندین روش برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان وجود دارد که یکی از آن ها بکارگیری مارکرهای مولکولی است. مارکرهای مولکولی در کاهش سایز جمعیت در جهت اندازه گیری میزان تنوع در مراحل اولیه مفید خواهند بود. یکی از این مارکرها، مارکرهای مولکولی RAPD می باشد. روش RAPD – PCR یک روش ساده و آسان در جهت شناسایی تنوعات ژنتیکی می باشد و دارای مزایای بسیاری است که از آن جمله می‌توان به بکارگیری مقادیر کم DNA، عدم طراحی پرایمر اختصاصی و شناسایی ژن مورد نظر، آشکار سازی آسان بر روی ژل آگارز و در نهایت عدم نیاز به آشکار سازی توسط مواد رادیو اکتیو اشاره کرد (Williams et al., 1990, Weising et al., 1995). RAPD یک روش موفقیت آمیز و کار آمد در شناسایی و تمایز ارقام مختلف پنبه می باشد. بسیاری از محققین بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ های پنبه را با استفاده از مارکرهای RAPD انجام داده اند که در ادامه راجع به آن بحث می شود.

شناسایی ۱۷۸ باند پلی مرف در ۱۰ رقم پنبه در تحقیق حاضر، نشان دهنده پلی مرفیسم ژنتیکی (تنوع ژنتیکی) در این ژنوتیپ ها است که می تواند در انجام برنامه های هیبریداسیون پنبه مورد استفاده قرار گیرد. به علاوه وجود باندهای ویژه در بعضی ارقام (ژنوتیپ های والدینی یا هیبرید) نشان دهنده وجود جایگاه ویژه در ژنوتیپ های مورد مطالعه است. مارکرهای مولکولی RAPD در جهت آشکار سازی تنوع ژنتیکی در بین ارقام پنبه دیپلوئید و تتراپلوئید مورد استفاده قرار می گیرند. Bhat و Rana در سال ۲۰۰۵ بر روی تنوع ژنتیکی ارقام پنبه تتراپلوئید و دیپلوئید توسط مارکرهای RAPD مطالعه کردند. ارقام دیپلوئید تنوع ژنتیکی بیشتری در مقایسه با ارقام تتراپلوئید نشان دادند (Rana and Bhat., 2005).

تحقیق دیگری در سال ۲۰۰۳ توسط Vafai – Tabar انجام گرفت و میانگین تشابه ژنتیکی در بین ارقام تتراپلوئید پنبه هندی ٪ ۷۹ ارزیابی شد (Vafai – Tabar., 2003). در حالی که Bhat و Rana میانگین تشابه ژنتیکی را ٪ ۷۴ گزارش کردند. مطالعات دیگر بر روی ارقام پنبه تتراپلوئید غیر هندی نیز میانگین تشابه ژنتیکی مشابهی را نشان داد (Rana and Bhat., 2005). در بعضی گزارشات دیگر میزان تشابه ژنتیکی بیشتری گزارش شده است. برای مثال Iqbal و همکاران در سال ۱۹۹۷ و Kumar و همکاران در سال ۲۰۰۳ تشابه ژنتیکی رابین ٪۹۰ – ۵۰ گزارش کردند(Iqbal et al., 1997, Kumar et al., 2003) . مطالعه مشابه که توسط Multani and lyon در سال ۱۹۹۸ بر روی ارقام *G. hirsutum* استرالیایی انجام گرفت، تشابه ژنتیکی ٪۸۹/۹ – ۹۲/۱ در بین ژنوتیپ ها بدست آمد. در تحقیق حاضر نیز میانگین تشابه ژنتیکی٪۵۰ در بین ارقام تتراپلوئید پنبه ایران ارزیابی شد که نشان دهنده تفاوت ژنتیکی بیشتری در بین ارقام می باشد. در تحقیقی که توسط شیدایی و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام گرفت، میزان پلی مرفیسم ٪ ۳۰/۶۱ ارزیابی شد و تشابه ژنتیکی ارقام پنبه مطالعه شده در مقایسه با مطالعات دیگر پایین بود (Sheidai et al., 2007a). در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۰۷ توسط شیدایی و همکاران انجام گرفت، میزان باندهای پلی مورف ٪ ۱۹ ارزیابی شد (Sheidai et al., 2007b). میزان پلی مرفیسم به دست آمده در تحقیقی که توسط Esmail و همکاران در سال ۲۰۰۸ روی ۲۱ ژنوتیپ و توسط ۲۳ پرایمر صورت گرفت،٪ ۸۴/۹۵ ارزیابی شد (Esmail et al., 2008).

همان طور که قبلاً نیز ذکر شد، بعضی باندها فقط در ژنوتیپ های والدینی حضور دارند و بعضی باندها نیز در ژنوتیپ های والدینی حضور ندارند اما درهیبریدها دیده می شوند. وجود یا عدم حضور باندهای منحصر به فرد (اختصاصی) در یک ژنوتیپ خاص می تواند به عنوان یک مارکر DNA مثبت یا منفی برای چنین ژنوتیپی مورد استفاده قرار گیرد و نیز در تعیین و تشخیص ژنوتیپ موثر واقع شود (EI – Defrawy, 2004). از آن جا که حتی تغییرات تک بازی در جایگاه اتصال پرایمر می تواند در تشکیل و یا عدم تشکیل باندهای RAPD تاثیر گذار باشد، این باندها می تواند نشان دهنده وقوع تغییرات ژنتیکی در ژنوم ارقام هیبرید باشد که می تواند ناشی از

www.SID.ir

Archive of SID

فقدان و یا بازآرایی تعدادی از نوکلئوتیدها در آن جایگاه باشد. رخداد کراسینگ اوور کروموزومی در طول میوز ممکن است باعث از بین رفتن جایگاه اتصال پرایمر در Offspring شود و در نهایت منجر به ایجاد الگوهایRAPD جدید در Offspring گردد (Smith et al., 1996).

Sushir همکاران در سال ۲۰۰۸، آنالیزهای مولکولی و ستیوژنتیکی بر روی نسل های F1 و F1 حاصل از کراس interspecific بین *G. arboretum* و *G. anomalum* انجام دادند و گزارشات نشان داد که در بین نسل F2 انتخاب شده، گیاهان نسل F1 دارای یک باند اضافی نسبت به F1 و F2 -5 بودند که این امر نشان دهنده رخداد نو ترکیبی است. برعکس در گیاهان F2 -6 و F2 -8 فقدان جایگاه اتصال پرایمر مشاهده شد که نشان دهنده احتمال وقوع نوترکیبی بین ژنوم A و B از گونه های *G. arboretum* و *G. anomalum* می باشد (Sushir et al., 2008). گزارشاتی نیز مبنی بر توارث Codiminant مارکرهای RAPD در گیاهان وجود دارد. این چنین مارکرهایی احتمالاً در هیبریدهایی با ژنوتیپ های والدینی مشخص شناسایی می شوند و با ویژگی های مورفولوژیکی در ارتباط می باشند (Chen et al., 2004; Wang et al., 2005). Yu و همکاران در سال ۱۹۹۸ چندین مارکر SSR, RAPD, RFLP را در ارتباط با طول فیبر پنبه و دیگر ویژگی های کیفی پنبه شناسایی کردند. به طور مشابهی Lazo و همکاران در سال ۱۹۹۴ مارکرهای RAPD مرتبط با طول فیبر پنبه در هیبرید *G. hirutum* و *G. barbadense* شناسایی کردند (Lazo et al., 1994) به طور مشابهی در این تحقیق بعضی باندهای RAPD با توارث Codiminant شناسایی شد، حضور چنین مارکرهای RAPD در مطالعات هیبریداسیون در پنبه بویژه اگر در جهت منافع کشاورزی و بهره برداری باشد، می تواند مفید واقع گردد. مشاهده ارتباط نزدیک ارقام هیبرید Nazilli × Sahel و Tabladilla × Sahel در بررسی خوشه ای و آنالیز PCO، احتمالاً ناشی از وجود ژنوتیپ والدینی مشترک ساحل در این ارقام می‌باشد

به طور مشابهی، نزدیکی مشاهده شده بین ارقام هیبرید Tabladilla× Nazilli و Tabladilla × Siokra می تواند ناشی از حضور ارقام والدینی Nazilli و Tabladilla در بین آن ها باشد. این نتایج مطابق با مطالعات دیگری است که در آن ارقام هیبرید پنبه نزدیک به ژنوتیپ های والدینی قرار گرفتند (Rana and Bhat, 2005). این نتایج نشان می دهد که مارکرهای RAPD دارای پتانسیل و توانایی در شناسایی و متمایز نمودن ارقام پنبه می باشند و مسئله مهمی که می توان به آن اشاره کرد، کاربرد RAPD در شناسایی ارقام و ارتباط ژنتیکی ارقام با یکدیگر می باشد. به طوری که در دست داشتن اطلاعات نژادی و یا مبداهای جغرافیایی ارقام نمی تواند به طور صحیحی ارتباط ژنتیکی ارقام را نشان بدهد. در حالی که DNA مارکرها، ارتباطات ژنتیکی و دوری و نزدیکی ارقام با یکدیگر را بهتر و بیشتر نشان می دهند اگر به اندازه کافی DNA مارکرها مورد استفاده قرار گیرند و در سرتاسر کروموزوم ها پراکنده شده باشند. این مسئله توسط چندین محقق بیان شده است (Zhang et al., 2005; Esmail 2008; Iqbal et al., 1997; Multani et al., 1998). از طرفی شناسایی مارکرهای ویژه گونه و رقم نیز می تواند برای اصلاح گران و مهندسان ژنتیک در انتقال ژن های خاص از یک رقم به رقم دیگر و یا از یک گونه به گونه دیگر و ایجاد تنوعات ژنتیکی بیشتر مفید باشد (Rana and Bhat, 2005). بنابر این تحقیق حاضر نشان دهنده تفاوت های ژنتیکی در بین ژنوتیپ های والدینی پنبه و نیز هیبریدهای F1 بدست آمده می باشد که می تواند در برنامه های هیبریداسیون و اصلاح پنبه مورد استفاده قرار گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱- عالیشاه، ع، ۱۳۷۴، بررسی سیتولوژیکی و مورفولوژیکی ارقام دیپلوئید (بومی) پنبه ایران، پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مد رس.

2- Cantrell RG, Pederson J and Liu H ,1999., Mapping of introgressed cotton population with DNA markers. Plant and Animal Genome VII Conference, San Diego, January 17-21, W56.

3- Chen JF, Zhuang FY, Liu XA and Qian CT. Reciprocal differences of morphological and DNA characters in interspecific hybridization in Cucumis. Can J Bot, 2004; 82:16-21.

4- De la Rosa R, James C, and Tobutt KR. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite in olive (Olea europaea L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. Primer note Mol Ecol Notes, 2002; 2: 265 -267.

5- El-Defrawy MM, Mervat MH and Elsayed EN. Molecular polymorphism in Egyptian cotton(Gossypiumbarbadense L.). Assiut J Agr Sci, 2004; 35(4):83 -94.

6- Esmail RM, Zhang JF and Abdel-Hamid AM. Genetic Diversity in Elite Cotton Germplasm Lines Using Field Performance and Rapd Markers. World J Agr Sci, 2008; 4 (3): 369 - 375.

7- Iqbal KJ, Reedy OUK, El-Zik KM and Pepper AE. A genetic bottleneck in the Evolution under domestication of Upland cotton Gossypium hirsutum L. examined using DNA fingerprinting. Theoretical Appl Genet, 2001; 124: 180 -187.

8- Kumar P, Sing HK, Vikal Y, Randhawa LS and Chahal GS. Genetic diversity studies of elite cotton germplasm lines using RAPD markers and morphological characteristics. Ind J Genet, 2003; 63:5-10.

9- Lazo GR, Park YH and Kohel RJ. Identification of RAPD markers linked to fiber strength in Gossy

piumhirsutum and G.barbadense interspecific crosses.Biochemistry of cotton workshop, 1994; September 28-30.

10- Mehltre SS, Gomez M, Susan F, Aher AR and Shinde GC. RAPD and cytomorphological analyses of F1, F2 and amphidiploids (A1) generations of Gossypium arberetum X Gossypium caitis-virids. Cytm tologia, 2004; 69 367-369.

11- Multani DS and Lyon BR. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. Genome, 1998; 38: 1005 -1008.

Murry MG and Tompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res, 1980; 8:4321 -4325.

12- Podani J. Introduction to the Exploration of Multivariate Data. English translation, Backhuyes Publishers, Leide, 2000; pp.407.

13- Nei M and Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proce Nation Aca Sci USA, 1979; 76: 5269 -5273.

14- Rana MK and Bhat KV. RAPD markers for genetic diversity study among Indian cotton cultivars Curr Sci, 2005; 88: 1961- 1956.

www.SID.ir

Archive of SID

15- Sambrook J, Fritsch EJ, and Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

16- Sheidai M, Dokhanghei A, Shariari ZH. Noormohammadi Z, and Farahanei F. Study of genetic polymorphism in some tetraploid cotton cultivars by using RAPD analysis. Pakistan J Biol Sci,2007a; 10: 2748 -2751.

17- Sheidai M, Shariari ZH, Rokneizadeh H and Noormohammadi Z. RAPD and cytogenetic study of some tetraploid cotton (Gossypium hirsutum L) cultivars and their hybrids. Cytologia, 2007b; 72: 77- 82.

18- Smith JF, Burke CC and Wogner WL. Interspecific hybridization in natural populations of cyrtan dra (Generiaceae) on the Hawaiian Islands : evidence from RAPD markers. Pl Syst Evol, 1996; 200: 61 -77.

19- Sushir KV, Mehetre SS, Patil SC and Kamdi SR. RAPD and Cytogenetic Study in F1 and F2 of Interspecific Cross between Gossypium arboreum_Gossypium anomalum .Cytologia, 2008; 73:213-19.

20-Wang YX, Wang XF, Zhang GY and Han GY. Somatic Embryogenesis and Plant Rege neration fromwo Recalcitrant Genotypes of Gossypium hirsutum L . Agricul sci in china, 2005; 5: 323-329.

21- Weising K, Nybon M, Wolf K and Meyer W. DNA finger printing in plants of fungi. Plant Genet Res Newsl ,1995; 97: 3-39.

22- Yu J, Park YH, Lazo GR and Kohel RJ,1998, Molecular mapping of the cotton genome: QTL analysisof fiber quality properties Proceed Beltwide Cotton Conference, Sandiego, CA, 5-9 January,
National Cotton Council America ,Memphis, TN, p :485.

23- Vafaie-Tabar M, Chandrashekaran S, Singh RP and Rana MK. Evaluation of genetic diversity inIndian tetraploid and diploid cotton (Gossypium spp.) by morphological characteristics and RAPDInd J Genet, 2003; 63:230-234.

24- VanEsbroeck G and Bowman DT. Cotton germplasm diversity and its importance to cultivar development. J Cotton Sci, 1998; 2:121-129.

25- Weising K, Nybom H, Wolf K and Kahl G. DNA Finger Printing in Plants. Second edition. CRCPress, Taylor & Francis, 2005; pp.444.

26- Zhang BH, Liu F, Yao CB and Wang KB. Recent progress in cotton biotechnology and geneticengineering in China. Curr Sci, 2000; 79: 37 - 44.

www.SID.ir