نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۰، شماره ۴ ، زمستان ۱۳۹۱، ص. ۶۸۰-۶۷۴

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 10, No. 4, Winter 2013, p. 674-680

بررسی تنوع ژنتیکی بین برخی از ژنوتیپ‌های پنبه (*Gossypium* sp.) موجود در ژرم پلاسم ایران با استفاده از نشانگر مولکولی بین ریزماهواره ایISSR

فرج‌اله شهریاری احمدی[۱]- مهدی صالحی[۲*]- ولی‌اله قاسمی عمران[۳]- محمدرضا رمضانی‌مقدم[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۹/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۷/۲۳

چکیده

پنبه گیاهی مهم و اقتصادی در دنیاست و مصارف عمده‌ای به لحاظ صنعتی و تغذیه‌ای دارد و یکی از اصلی‌ترین محصولات درآمدزا در شمال شرق ایران محسوب می‌شود. تنوع مبنای تمامی گزینش‌ها در اصلاح نباتات است، طوریکه با افزایش تنوع ژنتیکی در جامعه دامنه انتخاب وسیعتر می‌شود. لذا به منظور تعیین تنوع ژنتیکی در پنبه، تحقیقی بر روی ۲۴ رقم از ارقام تتراپلوئید و دیپلوئید پنبه موجود در خزانه ژنتیکی ایستگاه تحقیقات پنبه شرق کشور-کاشمر با استفاده از نشانگر ISSR ۱۳ و آغازگر حاوی توالی‌های ساده تکراری با هدف تکثیر قطعاتی از DNA ژنومی آنها انجام گردید. در نتایج حاصل از این تحقیق ۱۲۸ باند امتیازبندی شد که ۱۰۹ باند آن چندشکلی را به نمایش گذاشتند. برای ارزیابی شباهت ژنتیکی میان ارقام از تحلیل خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و نی (۱۹۷۲) با روش UPGMA استفاده شد. بررسی دندروگرام حاصل بیانگر سطح بالایی از تنوع در ارقام مورد مطالعه بود و حاکی از وجود دو گروه اصلی با شباهت ژنتیکی ۷۰ درصد داشت به طوریکه ژنوتیپ‌های پنبه را به دو گروه تتراپلوئید و دیپلوئید کاملا تفکیک می‌نمود. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر (CT)5'(RC3')8 (۱۰۰ درصد) و کمترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگرهای (AG)5'(YA3')8 (۲۵ درصد) و (TC)5'(G3')8 (۲۵ درصد) بدست آمد. براساس ماتریس تشابه بیشترین شباهت ژنتیکی مربوط به ارقام ورامین و خرداد و کمترین شباهت ژنتیکی مربوط به ارقام آوانگارد و بختگان بدست‌آمد. در مجموع نتایج این پژوهش نشان‌داد که نشانگرهای ISSR بطور موثری می‌توانند برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام پنبه مورد استفاده قرارگیرند.

واژه های کلیدی: تنوع ژنتیکی، ارقام پنبه، نشانگر ISSR، دیپلوئید، تتراپلوئید

مقدمه

پنبه گیاهی مهم و اقتصادی در دنیاست که الیاف آن در صنعت نساجی کاربرد زیادی دارد و منبعی از فراورده‌های جانبی نظیر روغن و سلولز است (۷ و ۱۰). کشت آن در ایران سابقه‌ای طولانی دارد و یکی از اصلی‌ترین محصولات درآمدزا در شمال شرق ایران محسوب می شود (۲۴). جنس *Gossypium* از خانواده Malvaceae می‌باشد که تقریبا ۵۰ گونه را در برمی گیرد که در قاره‌های مختلف بجز اروپا گسترش یافته اند. از این تعداد ۱۸ گونه در آمریکای شمالی، جنوبی و مرکزی، ۱۴ گونه در شمال شرق آفریقا و جنوب غربی آسیا و ۱۷ گونه در استرالیا یافت می گردد (۲۲).

چهار گونه زراعی از جنس*Gossypium* وجود دارد که شامل دو گونه تتراپلوئید دنیای جدید *G. hirsutum L.* و *G.barbadense L.* و دو گونه دیپلوئید دنیای قدیم *G.arbareum L.* و *G.herbaceum L.* است. از این میان پنبه تتراپلوئید آپلند (*G. hirsutum*, AD_1; 2n=4x=52) مهمترین گونه غالب زراعی در دنیاست که سازگاری وسیعی نسبت به بسیاری از مناطق دارد و تقریباً بیش از ۹۰ درصد تولیدات پنبه دنیا را شامل می‌شود. کشت گونه‌های دیپلوئید *G. arbareum L.* (A_1) و *G. herbaceum L.* (A_2) در هندوستان، ایران و برخی کشورهای آفریقایی رایج است و گونه *arboretum* فقط در هندوستان مورد کشت و کار قرار می گیرد و به پنبه هندی نیز معروف می‌باشد. عمده سطح کشت *herbaceum* در ایران منحصراً به استان خراسان‌رضوی و شهرستان‌های تابعه آن نیشابور و سبزوار می‌باشد (متوسط ۷ تا ۸ هزار هکتار). (۳، ۱۲، ۱۶ و ۱۷).

پیشرفت علوم و فناوری موجب بهره‌مندی متخصصان اصلاح

۱، ۲ و ۳ -به ترتیب دانشیار، دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email:mehdisalehi63@yahoo.com)
۴- استادیار ژنتیک و اصلاح نباتات و عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

نباتات از ماشین‌های کشاورزی، ابزار دقیق آزمایشگاهی، روش‌های برتر جمع‌آوری اطلاعات و تجزیه و تحلیل رایانه‌ای آنها شده است. در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های تحسین برانگیزی که در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی صورت گرفته، ابزار قدرتمندی را برای پژوهش‌های ژنتیک تفصیلی گیاهان عالی از جمله گیاهان زراعی فراهم کرده‌اند. شاید اساسی ترین و مفیدترین این ابزارها، نشانگرهای DNA باشند که همان تفاوت‌های قابل ثبت ردیف‌های بازی DNA موجود بین دو یا چند نمونه را آشکار می‌نماید. امروزه اطلاعات بدست‌آمده از نشانگرهای DNA کاربردهای بسیاری دارند، که عمده‌ترین آنها در پزشکی قانونی، تشخیص بیماری‌های گیاهی، قرنطینه گیاهی، پژوهش‌های ژنتیک تکاملی و فیلوژنتیک، طبقه‌بندی موجودات زنده و اصلاح نباتات است (۵). در طول قرن گذشته اصلاح پنبه بیشتر به سمت افزایش عملکرد، بهبود کیفیت الیاف و افزایش تحمل به تنش‌های زیستی معطوف بوده است. در حال حاضر نژادهای مختلف پنبه آپلند منبع عمده مواد گیاهی در برنامه‌های اصلاحی پنبه در سرتاسر دنیاست (۱۲، ۱۶ و ۱۷). انتخاب بر مبنای ژنوتیپ نیازمند تنوع است. با افزایش تنوع ژنتیکی در جامعه دامنه انتخاب وسیع‌تر می‌شود. (۲). بنابراین شناسایی و کشف تنوع مطلوب جهت استفاده در برنامه‌های آتی پنبه حائز اهمیت است (۳). در طول چند دهه گذشته تعدادی از تکنیک‌های مولکولی جهت تکمیل روش‌های سنتی برای تخمین تنوع و رابطه بین ژنوتیپ‌ها و شناسایی آنها استفاده شده‌است. نشانگرهای DNA ابزار قدرتمندی برای آشکارکردن چندشکلی و تنوع ژنومی است و کاربرد گسترده‌ای دارد. با توسعه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)، تعداد نشانگرهای مبتنی بر DNA بطور قابل ملاحظه‌ای گسترش یافته‌است (۱۱).

میکروساتلیت‌ها[1] که به توالی های تکراری ساده ((SSR نیز معروف می‌باشند در حقیقت قطعات DNA کوتاهی هستند که در آنها توالی های ساده که عمدتا شامل یک تا شش باز می‌باشد بطور متوالی تکرار شده‌اند. بدلیل فراوانی و گسترش وسیع آنها در طول ژنوم و تنوع بالای آنها، به عنوان یک نشانگر قدرتمند ژنتیکی برای یوکاریوت‌ها محسوب می‌شوند (۱۳). اما استفاده کاربردی از این سیستم مارکری بدلیل شناسایی ریزماهواره‌ها، تعیین ردیف بازی آنها، طراحی و ساخت آغازگرها و تهیه نقشه ژنتیکی آنها که مقدمه کاربرد این نشانگرهاست و همچنین پیچیدگی، صرف وقت و هزینه بالا رو به کاهش است (۵). بنابراین نشانگر ISSR[2] با تغییرات اعمال‌شده در سیستم فوق الذکر ابداع گردیده که بطور گسترده‌ای در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان مورد استفاده قرار می گیرد (۱۳).

نشانگرهای ISSR از جمله نشانگرهایی مبتنی بر PCR هستند که مزایای هر کدام از نشانگرهای RAPD، AFLP و SSR را دارا و فاقد معایبی از جمله تکرارپذیری کم و هزینه بالا می‌باشند (۶). ردی و همکاران گزارش کردند که سنجش معتبر و قابل‌تکراری برای بررسی تنوع ژنتیکی در بسیاری از گیاهان بوسیله تکنیک ISSR انجام می‌شود (۲۰). جوشی و همکاران و کانتتکی و همکاران از نشانگر ISSR به عنوان یک نشانگر غالب با تعداد زیادی قطعه چندشکل بطور موفقیت‌آمیزی برای نشان‌دادن تنوع ژنتیکی استفاده نموده‌اند (۱۴ و ۱۵). وندل و همکاران سطح پایینی از تنوع ژنتیکی را با استفاده از نشانگرهای RFLP و آیزوزایم‌ها در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های پنبه گزارش کردند (۲۳). بنابراین لزوم استفاده از یک نشانگر کارا جهت بررسی تنوع ژنتیکی ارقام برای نیل به اهداف اصلاحی رو به افزایش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش تعداد ۱۸ ژنوتیپ متعلق به گونه تتراپلوئید *G. hirsutum* L.، یک ژنوتیپ متعلق به *G.barbadense L.* ، یک ژنوتیپ متعلق به نتاج حاصل از انتخاب نسل‌های در حال تفکیک تلاقی مابین گونه‌های *G.barbadense* و *G.hirsutum* و ۴ ژنوتیپ متعلق به گونه دیپلوئید *G.herbaceum* L. که نماما از ایستگاه تحقیقات پنبه شرق ایران- کاشمر تهیه شده بودند استفاده گردید (جدول۱).

استخراج DNA

برای این منظور ابتدا بذور ارقام مختلف پنبه در گلدان کشت و سپس در مرحله دوبرگی، برگ‌های تازه و جوان جدا و DNA آنها با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت فرمنتاس[3] استخراج گردید. کیفیت DNA استخراجی با استفاده از دستگاه نانودراپ و ژل الکتروفورز (۱/۵ درصد) مورد بررسی قرارگرفت.

آنالیز ISSR

در مجموع از ۱۳ آغازگر ISSR موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد که از شرکت ایزوژن هلند تهیه‌شده بودند استفاده گردید که با علائم اختصاصی (AG $5'(_8YC3'$، (AC $5'(_8YG3'$، (TC $5'(_8C3'$، (TC $5'(_8G3'$، (AG $5'(_8YT3'$، (GA $5'(_8YC3'$، (CT $5'(_8RG3'$، (TA $5'(_8C3'$، (AG $5'(_8T3'$، (AG $5'(_8G3'$، (AG $5'(_8YA3'$، (CT $5'(_8RC3'$، (CT $5'(_8RA3'$ نشان داده اند.

1-Microsatellates
2-Inter simple sequence repeat

3 -Fermentase

جدول۱- برخی از ارقام تتراپلوئید و دیپلوئید پنبه موجود در خزانه ایستگاه تحقیقات پنبه شرق ایران-کاشمر به همراه خصوصیات ثبت شده درباره آنها

ارقام تتراپلوئید		ارقام دیپلوئید	
G. hirsutum	خصوصیات*	*G. arbareum*	خصوصیات
آوانگارد	متوسط رس، شاخه زایا و رویا، برگ نرمال	کا . دی ۰۱	خصوصیات در اختیار نبود
اولتان	زود رس، شاخه زایا، برگ نرمال	کا . دی ۰۲	خصوصیات در اختیار نبود
تابلادیلا	متوسط رس، شاخه زایا و رویا، برگ نرمال	کا . دی ۰۳	خصوصیات در اختیار نبود
چکوروا	متوسط رس، شاخه زایا و رویا، برگ نرمال	کا . دی ۰۴	خصوصیات در اختیار نبود
خرداد	زودرس، شاخه زایا و رویا، برگ نرمال، تیپ بوته بسته		
ورامین	متوسط رس، تیپ حجیم و پر شاخ و برگ، قوزه درشت		
۴۳۳۴۷	تقریبا زود رس، شاخه زایا و رویا، برگ نرمال		
۴۳۲۵۹	تقریبا زود رس، شاخه زایا و رویا، برگ نرمال		
بی-۵۵۷	تقریبا زود رس، شاخه زایا و رویا، برگ نرمال		
بختگان	متوسط رس، شاخه زایا و رویا، برگ نرمال، قوزه درشت		
برگ پهن	خصوصیات در اختیار نبود		
ان-۲۰۰	تقریبا زود رس، شاخه زایا و رویا، برگ نرمال		
نازیلیا	متوسط رس، شاخه زایا و رویا، برگ نرمال		
آ.اس.آر- ۱۴	متوسط رس، شاخه زایا و رویا، برگ نرمال		
اف-۱۰۸	متوسط رس، شاخه زایا و رویا، برگ نرمال		
لیف اکرا (رد کالر)	خصوصیات در اختیار نبود		
۴۳۳۲۷	تقریبا زود رس، شاخه زایا و رویا، برگ نرمال		
سپید	دیر رس، شاخه زایا و رویا، برگ اکرا		
سیلند	(هیبرید بین گونه *هیرسوتوم* و *باربادنس*)،		
ترموس-۱۴	دیر رس(از گونه *باربادنس*)، کیفیت الیاف بسیار بالا		

*خصوصیات ذکر شده ارقام مورد استفاده در جدول یک، برگرفته از ایستگاه تحقیقات پنبه شرق ایران-کاشمر می‌باشد.

آنزیم Taqپلی‌مراز و مخلوط نوکلئوتیدها ($dNTP_s$) به اضافه بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) از شرکت فرمنتاس تهیه شد. برای هر آمیخته واکنش، مقدار ۱ میکرولیتر از DNA تهیه شده با غلظت ۶۰ نانوگرم در لیتر به ۲۴ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل Taqپلی‌مراز (۱ واحد)، آغازگر (۱۰ pmol)، کلریدمنیزیم (۲ mM)، مخلوط نوکلئوتیدها (۰/۲mM)، بافر PCR (1X) و آب دوبار تقطیر سترون اضافه‌گردید. سپس به سرعت تحت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) قرارگرفت. واکنش PCR شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۴۹ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه و دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه در ۴۲ سیکل دمایی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر[1] (شرکت بیومترا) انجام شد. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیریافته روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ مناسب به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شد. بعد از این مرحله ژل به مدت ۸ دقیقه در محلول اتیدیوم‌بروماید رنگ‌آمیزی شد و توسط دستگاه عکسبرداری از ژل (سیستم بیوداک[2])، قطعات تکثیریافته DNA تحت نور فرابنفش مورد مشاهده قرارگرفت.

آنالیز داده‌ها

مقایسه ژنوتیپ‌ها بر اساس حضور و عدم حضور قطعه تکثیرشده بوسیله ISSR انجام شد. بدین صورت که عدد (۱) برای حضور قطعه و عدد (۰) برای عدم حضور قطعه تکثیرشده در نظر گرفته‌شد. تجزیه

1-Thermocycler (Biometra co.)

2- Bio Doc-system

و تحلیل داده های مولکولی و رسم دندروگرام با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc 2.2 براساس الگوریتم UPGMA انجام‌گرفت. تشابه ژنتیکی با استفاده از ضریب تشابه ژنتیکی جاکارد[1] و ضریب تشابه ژنتیکی نی[2](۱۹۷۲) محاسبه گردید.

نتایج و بحث

در این بررسی ۱۱ آغازگر از ۱۳ آغازگر مربوط به نشانگر ISSR توانست در مجموع تعداد ۱۲۸ باند را تکثیرنماید که ۱۰۹ باند آن چندشکلی را به نمایش گذاشتند. بطور متوسط ۱۱/۶ باند برای هر آغازگر محاسبه گردید. بیشترین تعداد باند مربوط به آغازگر $(AC)_8YG3'5'$ با ۱۷ باند و کمترین تعداد باند مربوط به آغازگر $(TC)_8G3'5'$ با ۴ باند بدست‌آمد. میانگین درصد چندشکلی بدست‌آمده در نشانگرهای مورد استفاده ۷۶/۵۴ درصد محاسبه گردید.

باندهای تولید شده توسط آغازگر $(AC)_8YG3'5'$ وضوح بهتری را نشان دادند (شکل۱). بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر $(CT)_8RC3'5'$ (۱۰۰ درصد)و کمترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگرهای $(AG)_8YA3'5'$ و $(TC)_8G3'5'$ بود که هر کدام از آنها ۲۵ درصد چندشکلی را به نمایش گذاشتند (جدول۲). گروه بندی ارقام پس از محاسبه ضریب تشابه داده‌های مولکولی انجام شد (شکل۲). با توجه به شکل۲ ضریب جاکارد و نی گروه بندی تقریبا مشابه‌ای ارائه دادند و در بین ارقام تتراپلوئید رقم اف–۱۰۸ بطور مختصر جابجا شده‌است و گویای این مطلب است که گروه‌بندی صحیح و قابل اعتماد است.

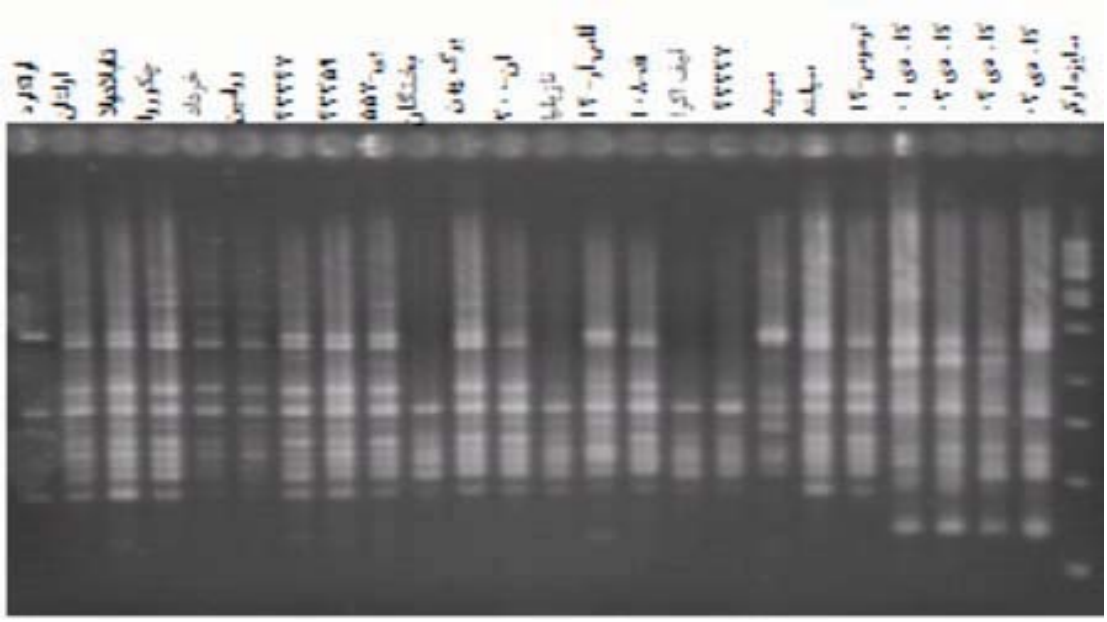
گروه‌بندی بدست‌آمده بیانگر سطح تنوع بالایی در ارقام پنبه مورد مطالعه بود. همچنین این گروه‌بندی بطور واضح حاکی از وجود دو گروه اصلی با شباهت ژنتیکی ۷۰ درصد است که ارقام پنبه را به دو گروه تتراپلوئید و دیپلوئید تفکیک می‌نمود. این نتیجه بطور کامل با نتایج دونگره و همکاران که نشانگر ISSR را برای بررسی تنوع ارقام پنبه بکار بردند مطابقت‌دارد و دلیل این امر می‌تواند ناشی از متفاوت بودن دو گونه و همچنین بزرگتربودن ژنوم ارقام تتراپلوئید نسبت به ارقام دیپلوئید باشد (۹). همچنین لیو و همکاران تنوع بالایی را در بین گونه‌های پنبه با استفاده از نشانگر ISSR مشاهده کردند (۱۳). بوداک و همکاران با بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ گیاه علفی بوفالوگراس (*Buchloe dactyloides*) با سطوح کروموزومی مختلف و جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف با کمک نشانگرهای ISSR، SRAP ، SSR و RAPD در ژنوم هسته و بررسی همین نشانگرها در ژنوم میتوکندری و کلروپلاست دریافتند که ارتباط معنی‌داری بین سطوح پلوئیدی و تعداد آلل‌های حاصل از نشانگرهای ISSR، SRAP و SSR وجود دارد، ولی در بررسی داده‌های بدست‌آمده از این نشانگرها در ژنوم میتوکندری و کلروپلاست، چنین ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (۸). بطور کلی با توجه به گروه‌بندی بدست‌آمده (شکل۲)، ارقام پنبه به چهار گروه ۱، ۲ و ۳ (ارقام تتراپلوئید) و گروه ۴ (ارقام دیپلوئید) تفکیک شدند. ۶۰ درصد ارقام تتراپلوئید در گروه ۲ تجمع یافتند که نسبت به بقیه ارقام از شباهت ژنتیکی بیشتری (۷۷درصد) برخوردار بودند که این امر احتمالا حاکی از یکسان‌بودن منشاء آنها باشد.

با توجه به شکل۲ رقم آوانگارد با شباهت ژنتیکی ۷۲/۸ درصد (براساس ضریب تشابه جاکارد) در بین ارقام تتراپلوئید از بقیه ارقام متمایز شدند. رقم بختگان نیز تفکیکی مشابه رقم آوانگارد داشت و با شباهت ژنتیکی ۷۵ درصد از بقیه ارقام تتراپلوئید تفکیک گردید. بنابراین با توجه به دوربودن ارقام آوانگارد و بختگان از بقیه ارقام، می‌توانند در انتخاب لاین‌ها برای دورگ‌گیری بعنوان یکی از والدین استفاده‌شوند. بدیهی است که هر چه والدین مناسب از یکدیگر دورتر باشند هتروزیس بیشتری در نتاج قابل مشاهده خواهد بود.

براساس ماتریس تشابه دو ضریب تشابه جاکارد و نی، بیشترین شباهت ژنتیکی مربوط به ارقام ورامین و خرداد می‌باشد که اولی بیشترین سطح زیر کشت را در ایران داراست و دومی اولین رقم زودرس ایران است که در سال ۸۶ توسط ایستگاه تحقیقات پنبه شرق کشور در کاشمر آزادسازی شده‌است (۴). کمترین شباهت ژنتیکی مربوط به ارقام آوانگارد و بختگان بدست‌آمد. ارقام گروه ۱ ارقام زراعی با عملکرد بالا می‌باشند. نکته جالب در نتایج قرارگرفتن رقم ترموس–۱۴ در بین گونه‌های هیرسوتوم است. در حالی که یک گونه باربادنس می‌باشد. به نظر می رسد دلیل این امر استفاده از آغازگرهای دونوکلئوتیدی باشد چراکه نواحی هتروکروماتینی کروموزوم‌ها در بین گونه‌ها نیز دونوکلئوتیدی می‌باشد. بنابراین در صورت استفاده از آغازگرهای سه نوکلئوتیدی، بدلیل اختصاصی شدن جایگاه توالی امکان جداشدن دو گونه فراهم می‌شود. رقم سیلند که یک هیبرید بین دو گونه هیرسوتوم و باربادنس می‌باشد نیز تفکیکی مشابه رقم ترموس–۱۴ نشان داده است. همچنین ارقام با ریخت ظاهری مشابه نیز در گروه‌های مختلف قرار گرفته‌اند که می‌تواند ناشی از تصادفی بودن نشانگرهای ISSR باشد. لذا قرارگرفتن ارقام متفاوت از لحاظ مورفولوژی در کنار هم، شاید به علت تکثیر مناطق غیر رمزکننده توسط آغازگرهای مورد استفاده باشد. البته تاثیر عوامل محیطی در بروز صفات مورفولوژی را نباید فراموش کرد (۲۱). نشانگرهای ISSR تنوع بالایی در بین ارقام دیپلوئید نشان‌داده‌اند، در صورتیکه نشانگرهای مورفولوژیک فاقد این مزیت هستند، بطوریکه رمضانی‌مقدم (۱۳۸۱) با بررسی تنوع مورفولوژیک ۴۲ توده بومی دیپلوئید *G. herbaceum L.* و ۲ توده بومی دیپلوئید *G. arbareum L.* طی دو سال زراعی گزارش کرد که اغلب توده های بومی پنبه

1 -Jaccard
2 -Nee

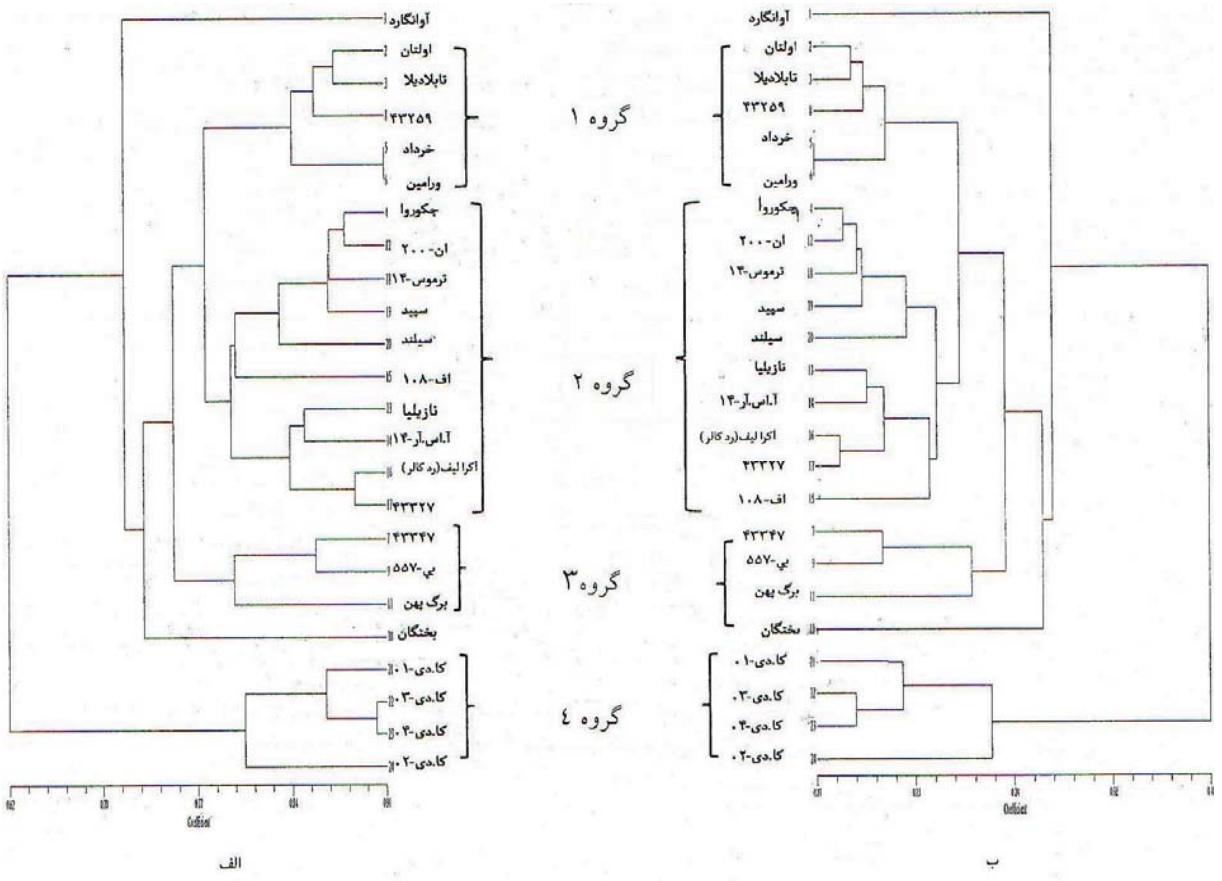
موجود در ایران دارای منشاء واحد بوده و اختلاف زیادی با هم ندارند و در تجزیه خوشه‌ای در کنار هم قرار می‌گیرند. با این وجود نشانگر ISSR توانست ارقام دیپلوئید را به دو زیرگروه با شباهت ژنتیکی ۸۰ درصد تفکیک نماید و رقم کا.دی-۰۲ را از نظر ژنتیکی متفاوت از بقیه، مورد تفکیک قراردهد. البته مولتان و لیون در یک مقایسه جفتی در میان ارقام *G. hirsutum L.* اظهار داشتند که احتمال دارد حتی میان ارقام خویشاوند خیلی نزدیک نیز با استفاده از نشانگرهای مولکولی فرق گذاشته شود (۱۸).



شکل۱- قطعات تکثیر یافته با آغازگر(AC) $5'_{(8}YG3'$

جدول۲- ویژگی‌های آغازگرهای ISSR مورد استفاده برای ارزیابی تفاوت‌های بین ارقام تتراپلوئید و دیپلوئید پنبه

توالی آغازگر	تعداد قطعات تکثیرشده	تعدادقطعات چندشکل	درصد چندشکلی
$5'_{(8}YG3'$ (AC	۱۷	۱۶	۹۴
$5'_{(8}C3'$ (TC	۱۲	۱۱	۹۱
$5'_{(8}T3'$ (AG	۱۰	۹	۹۰
$5'_{(8}G3'$ (AG	۱۲	۹	۷۵
$5'_{(8}YA3'$ (AG	۱۲	۳	۲۵
$5'_{(8}RC3'$ (CT	۱۱	۱۱	۱۰۰
$5'_{(8}RA3'$ (CT	۱۶	۱۳	۸۱
$5'_{(8}RG3'$ (CT	۱۵	۱۴	۹۴
$5'_{(8}G3'$ (TC	۴	۱	۲۵
$5'_{(8}YC3'$ (AG	۹	۶	۶۶
$5'_{(8}YC3'$ (GA	۱۰	۸	۸۰



شکل۲- گروه‌بندی ۲٤ رقم از ارقام دیپلوئید و تتراپلوئید پنبه با استفاده از نشانگرهای ISSR (الف. گروه‌بندی براساس ضریب تشابه جاکارد و ب. گروه‌بندی براساس ضریب تشابه نی (۱۹۷۲))

در این پروژه ضمن بررسی تنوع ژنتیکی بین ارقام پنبه موجود با بررسی آغازگرهای مختلف ISSR، آغازگر GA) $_8$YC3')5' توانست باندی را آشکار نماید که بطور اختصاصی تفکیک‌کننده ارقام تتراپلوئید از دیپلوئید بود. با توجه به اینکه در اصلاح نباتات کلاسیک، برنامه‌های اصلاحی طولانی مدت و پرزحمت می‌باشد لذا نشانگرهای مولکولی به عنوان یک قطعه از یک توالی DNA که با حضور یک باند مشخص توام است می‌تواند با شناسایی ارقام دیپلوئید و تتراپلوئید و همچنین هیبریدهای مابین آنها، باعث تسریع و کوتاه‌کردن برنامه‌های اصلاحی علی‌الخصوص در اوایل دوره رشد گیاهان باشد. دونگره و همکاران باندهایی را تحت عنوان نشانگرهای نادر گزارش کردند که بطور اختصاصی برای تمایز ارقام مقاوم به بعضی از آفات و بیماری‌ها در پنبه کاربرد داشتند (۹). با توجه به نتایج بدست‌آمده و همچنین بررسی‌های انجام شده توسط سایرین استنباط می‌شود که در استفاده از نشانگرهای ISSR، نتایج دور از انتظار قابل پیش بینی است و ممکن است نتایج آن همسو و گاهی متضاد با مشاهدات مورفولوژیکی باشد. در توجیه این مطلب می توان به ارتباط میان نشانگرهای ISSR و نواحی رمزکننده و غیر رمزکننده ژنوم اشاره کرد در حالیکه نشانگرهای مورفولوژیکی فقط به نواحی رمزکننده ژنوم مرتبط می‌باشد.

قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشکده به منظور تخصیص اعتبارات لازم و همچنین از ایستگاه تحقیقات پنبه شرق کشور- کاشمر به‌خاطر تامین مواد گیاهی کمال تشکر و قدردانی را می‌نمائیم.

منابع

۱- برزعلی، م.، ز. طهماسبی، ا. قلاوند، و ر. توکل افشاری. ۱۳۸۳. ارزیابی خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک مرتبط با توان رشد اولیه در

چهار رقم پنبه. مجله علوم زراعی، ۹۸ -۸۰ :۶.

۲- عبد میشانی، س. و ع. ا. شاه نجات بوشهری. ۱۳۷۷. اصلاح نباتات تکمیلی. انتشارات دانشگاه تهران. جلد دوم.

۳- رمضانی‌مقدم، م. ر.، اس. مجیدی هروان، ح. ر. زمانی‌مقدم، س. ا. محمدی، و م. عزیزی. ۱۳۸۵. بررسی تنوع ژنتیکی در پنبه های دیپلوئید (*Gossypium herbaceum, G.arboreum*) با استفاده از صفات مورفولوژیک. مجله علمی-پژوهشی علوم کشاورزی، ۸۳۱-۸۲۱ :۴.

۴- رمضانی‌مقدم، م. ر . ۱۳۸۶ . گزارش معرفی رقم جدید پنبه خرداد. انتشارات مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی. ۳۳ صفحه.

۵- نقوی، م. ر.، ب. قره‌یاضی، و ق. سالکده حسینی، ۱۳۸۸. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران.

۶- محمدی‌فارسانی، ط.، ن. اعتمادی، و ب. ا. سیدطباطبایی. ۱۳۸۷. ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه چمنی مرغ (*Cynodon dacyulon*) با استفاده از صفات ریخت شناسی و نشانگر مولکولی ISSR. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. ۹۹۶-۸۳ :۲.

7- Anderson, C. G. 1999. Cotton marketing. In: Smith, C.W, Cothren, J.T. (eds) Cotton: Origin, History, Technology and Production. Wiley, New York. pp: 659-679.

8- Budak, H., R. Shearman, C. Gulsen, I. Dweikat. 2005. Understanding ploidy complex and geographic origin of the *Buchloe dactyloides* genome using cytoplasmic and under marker systems. Theorical Applied Genetics. 11:1545-1552.

9- Dongre, A. B., M. Bhandarkar, and Sh. Banerjee. 2007. Genetic diversity in tetraploid and diploid cotton (*Gossypium spp*.) using ISSR and microsatellite DNA markers. Indian Journal of Biotechnology. 6: 349-353.

10- Frelichowski, J., M. B. Palmer, D. Main, J. p. Tomkins, R. G. Cantrell, D. M. Stelly, J. Yu, R. J. Kohel, and M. Uloa. 2006. Cotton genome mapping with new microsatellites from Acala "Maxxa" BAC-ends. Mol. Gen. 275: 479-491.

11- Hossein, E. H. A., M. H. A. Osman, M. H. Hossein, and S. S. Adawy. 2007. Molecular characterization of cotton genotypes using PCR-based markers. Journal of Applied Sciences Research. 3 (10):1156-1169.

12- Lewis. H. 2001. A review of yield and fiber quality trends and components in American upland cotton. In: Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. January 9–13. Anaheim. CA. National Cotton Council of America. Memphis. TN. USA. pp: 1447-1453.

13- Liu, B., and J. F. Wendel. 2001. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. Molecular Ecology Notes. 1:205-208.

14- Joshi, S. P., V. S. Gupta, R. K. Aggarwal, P. K. Ranjekar, and D. S. Brar. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. Theorical Applied Genetics. 100:1311–1320.

15- Kantetky, R. V., X. Zhang, J. L. Bennetzen, and B. Z. Zehr. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays L*.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Molecular Breeding. 1:365–372.

16- May, O. L., D. T. Bowman, and D. S. Calhoun. 1995. Genetic diversity of U.S. Upland cotton cultivars released between 1980 and 1990. Crop Science. 35: 1570–1574.

17- Meredith, W. R. J. 2000. Cotton yield progress why has it reached a plateau. Better Crops. 84: 6-9.

18- Multan, D. S. and B. R. Luon. 1995. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. Genome. 38: 1005-1008.

19- Prashanth, G. B., P. D. Antony Herold Prabhu1, K. Raghavendra, Pramod. G. Bagali, S. Hittalmani, and J. S. Vadivelu. 2010. Application of molecular markers in plant tissue culture. AsPac Journal Molecular Biology and Biotechnology. 18 (1): 85-87.

20- Reddy, P. M., N. Sarla, and E.A. Siddiq. 2000. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica. 128:9–17.

21- Roldan Ruiz, F. A., T. J. Gilliland, P. Dubreuil, C. Dillmann, J. Lallemand. 2001. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. Theorical Applied Genetics. 103:1138-1150.

22- Wendel, J. F. and R. C. Cronn. 2003. Polyploidy and the evolutionary history of cotton. Advance Agronomy.78: 139-186.

23- Wendel, J. F., C. L. Brubaker, and A. E. Percival. 1992. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of upland cotton. American Journal of Botany. 79:1291-1310.

24- Tohidfar, M., B. Ghareyazie, M. Mosavi, Sh.Yazdani, and R. Gholabchin. 2008. Agrobacterium mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a synthetic cry1 Ab gene for enhanced resistance against *Heliothis armigera*. Iranian Journal of Biotechnology. 6 (3):164-173.