مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۱، شماره ۴، سال ۱۳۷۹ (۷۰۰-۶۸۹)

# بررسی چندشکلی‌های DNA در بین تعدادی از ژنوتیپ‌های پنبه آپلند (*Gossypium hirsutum* L.) با استفاده از تکنیک RAPD - PCR

**کمال قاسمی بزدی ، سیروس عبدمیشانی ، عبدالهادی حسین‌زاده و بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی**

**به ترتیب کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی مؤسسه تحقیقات پنبه کشور (گرگان) ، استاد و استادیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.**

تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۱/۳۱

**خلاصه**

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

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

## مقدمه

گیاه پنبه به عنوان مهمترین و قدیمی‌ترین گیاه لیفی مصارف گوناگونی دارد و از نظر اقتصادی و تجاری دارای اهمیت فوق‌العاده می‌باشد. 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 دانهٔ روغنی، مقام دوّم جهان را دارا می‌باشد (۱۳).

اصلاح نباتات بر پایه اصول 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 قرار گیرند. یکی از راه‌های افزایش سریع تولید مواد غذایی و الیاف با کیفیت بهتر. استفاده از

تکنیک‌های بیوتکنولوژی گیاهی می‌باشد 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 وسیلهٔ دست ورزی گیاهان در سطح بافت، سلول و ملکول، می‌توانند تغییراتی را از لحاظ نوع و فراوانی در ریخته ارثی گیاهان امکان پذیر سازند که از طریق روشهای کلاسیک اصلاح نباتات غیرممکن و یا مشکل می‌باشد. دانش زیست شناسی ملکولی 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 (توالی های بازی DNA) بین دو یا چند موجود می‌باشند (۲). بسیاری از پیچیدگیهای گزینش بر اساس 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 مواد رادیواکتیو، هزینه و زحمت زیاد و عدم تشخیص چندشکلی کافی در بسیاری از گونه‌های زراعی بوده و لذا استفاده از آن، در بسیاری از آزمایشگاه‌ها دارای محدودیت است (۱ و ۱۹). کشف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در اواسط دههٔ ۱۹۸۰ در ژنتیک ملکولی انقلابی ایجاد کرد.

تکنیک RAPD بر مبنای PCR یکی از فن‌آوریهای جدید نشانگرهای DNA است که در سال ۱۹۹۰ ابداع گردیده است (۱۹). مزایای این روش: سهولت، سرعت و نیاز به مقدار کم DNAی 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 ژنوتیپ‌های زراعی پنبه آپلند (*Gossypium hirsutum* L.) که بیشترین سطح زیر کشت پنبه‌های دنیا و همچنین ایران را تشکیل می‌دهند (۱۳)، استفاده شد و سعی گردید دو هدف زیر بررسی شود:

۱ - تعیین چندشکلی موجود بین ژنوتیپ پنبه‌های آپلند

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 وسیلهٔ اسید سولفوریک غلیظ به مدت ۱۰-۵ ثانیه لینترگیری، با قارچ کش ضدعفونی و در داخل گلدانهایی در گلخانه کشت گردیدند.

یک الی دو هفته پس از جوانه‌زنی از اولین و تازه‌ترین برگهای کوتیلدونی شش گیاه از هر ژنوتیپ، حدود ۰/۳-۰/۱ گرم جداکرده 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. نمونه‌های استخراج شده DNA تا زمان اندازه‌گیری 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 $A_{۲۶۰}/A_{۲۸۰}$ در محدودهٔ ۲-۱/۸ می‌بود، نشان می‌داد که جذب، صرفاً توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و میزان DNA مطلوب بوده واز کیفیت خوبی برای PCR برخوردار است و از آن در کارهای بعدی استفاده می‌گردید، در غیر این صورت نمونه مورد نظر را بیرون ریخته و نمونه دیگری استخراج می شد. پس از انتخاب محلول‌هایی که نسبت جذبی آنها در محدودهٔ مورد نظر بود، از اعداد مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر جهت محاسبهٔ میزان غلظت DNA طبق فرمول زیر استفاده گردید:

غلظت DNA (میکرولیتر/نانوگرم) = $A_{۲۶۰}$ × ضریب رقت × ۵۰

ضریب رقت، میزان تعداد دفعاتی است که محلول پایه رقیق شده است. عدد ۵۰ هم ضریب تصحیح دستگاه است (۴).

برای یکسان نمودن غلظت همه نمونه‌ها به ۵ نانوگرم، از آب استریل دوبار تقطیر شده طبق فرمول زیر استفاده می‌گردید:

$$W_۱V_۱ = W_۲V_۲$$

در این فرمول،

$W_۱$ = غلظت DNA در محلول پایه

$W_2$ = میزان DNAی مورد نظر در محلول قابل مصرف

$V_1$ = حجم محلول پایه که بایستی برداشته شود

$V_2$ = حجم کل محلولی که بایستی تهیه شود

برای انجام واکنشهای PCR، از دستورالعمل کارلوس اف کوئیروس با اندکی تغییرات، استفاده گردید. برای هر مخلوط واکنش، مقدار ۵ میکرولیتر از DNAی 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.

جدول ۱ـ 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 | بختگان* | Bakhtegan | امریکا |
| ۵ | هوپی کالا x ۳۴۹ | Hopicala x 349 | امریکا x امریکا |
| ۶ | آکالا اس جی ۲ x سی‌لند | 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 | تابلادیلا | Tabladilla | اسپانیا |
| ۱۵ | چکوروا - ۱۵۱۸ | Gukurovea-1518 | ترکیه |
| ۱۶ | بی - ۵۵۷ | B.557 | پاکستان |
| ۱۷ | ۶ - ۲۲۰۴۱ | 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 ث ۱۲۱۱ | Hopicala x C1211 | امریکا x امریکا |
| ۲۲ | ساحل x بلغار | Sahel x Bulgar | امریکا x بلغارستان |
| ۲۳ | تاشکند - ۱ | Tashkand-1 | ازبکستان |
| ۲۴ | نازیلی - 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 بختگان حاصل از گزینش Acala Sj2 است که منشأ همهٔ آنها امریکاست.

جدول ۲ـ 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 پلیمراز | ۰/۲ | ۰/۲ (۱/۱x) |
| جمع | ۲۰ | ۲۰ (۱/۱x) = ۲۲ x |

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

یک چرخه:

| | | |
|---|---|---|
| شروع واسرشت سازی DNA | ۲ دقیقه | ۹۴°C |

۴۵ چرخه:

| | | |
|---|---|---|
| تک رشته‌ای شدن DNA | ۱دقیقه | ۹۲°C |
| اتصال آغازگربهDNA | ۱دقیقه | 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 گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها ابتدا مهاجرت باندی باندهایی راکه واضح بوده و نسبت به زمینهٔ ژل دارای شدت بالایی بودند، با خط کش میلیمتری از کف چاهک به عنوان مبدأ، اندازه‌گیری نموده و سپس با استفاده از محاسبات آماری و 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 کلاستربندی ماتریس‌ها بر اساس این ضرایب تشابه، یک دندروگرام (شکل ۲) به روش UPGMA به جهت گروه بندی ژنوتیپ‌های مختلف پنبه با استفاده از نرم‌افزار SPSS رسم گردید.

## نتایج و بحث

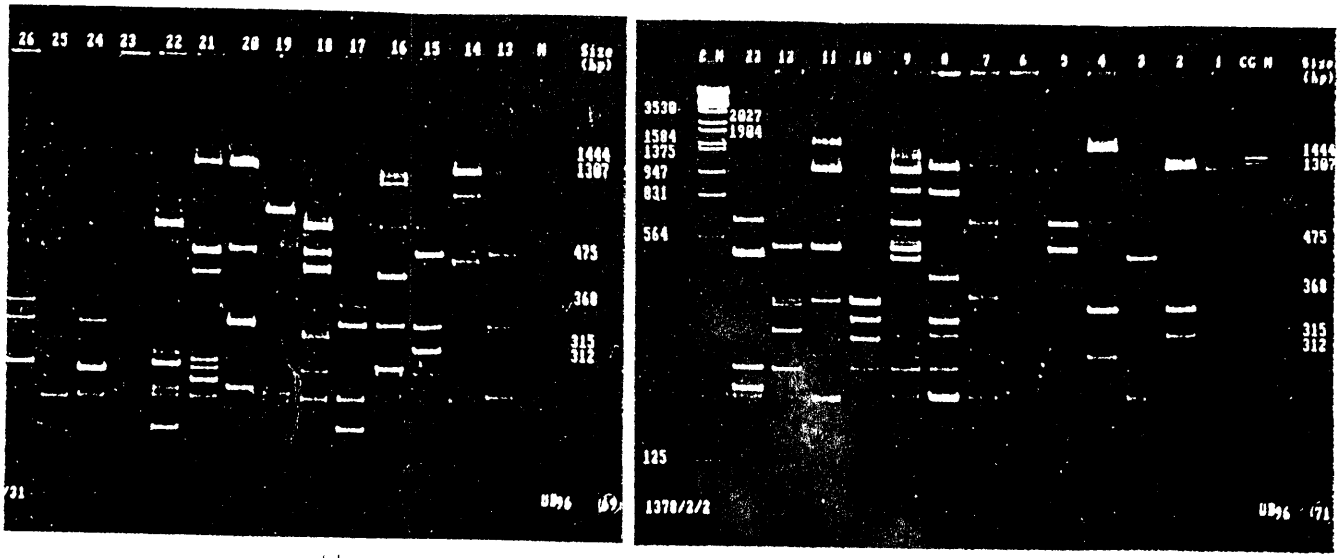
از ۹۰ آغازگر مورد استفاده (آغازگرهای $UB_{11}$ تا $UB_{100}$)، ۶۹ آغازگر یا هیچ گونه باندی تولید نکردند و یا اینکه محصولات تکثیر شده آنها وضوح و قابلیت تکرار کافی را نداشته و بنابراین حذف گردیدند. بیست و یک آغازگر باقیمانده‌در ۲۶ ژنوتیپ پنبه، تولید پروفیل‌های تکثیر چندشکل، نمودند و مجموعاً ۲۳۷ قطعه (لوکوس) DNA را تکثیر کردند که از بین آنها، ۱۸ قطعه (۷/۶٪) دربین تمام ژنوتیپ‌هاتک‌شکل بودند وبقیه قطعات(۹۲/۴٪)، در یک یا چند تا از ۲۶ ژنوتیپ پنبه تولید پروفیل‌های چندشکل نمودند که این نشان دهندهٔ درصد بالای چند شکلی بود. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف، متفاوت بود. بیشترین قطعه تکثیر

شده، ۱۹ عدد و مربوط به آغازگر $UB_{96}$ و کمترین آن دو عدد و مربوط به آغازگر $UB_{78}$ بود. اندازهٔ 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 از ۱۳ آغازگر که چندشکلی بیشتر، وضوح بهتر و قابلیت تکرارپذیری بالاتری داشتند، در محاسبات آماری استفاده گردید. این آغازگرها عبارت بودند از: $UB_{16}$ ، $UB_{17}$ ، $UB_{18}$، $UB_{23}$ ، $UB_{25}$ ، $UB_{29}$ ، $UB_{30}$ ، $UB_{74}$، $UB_{76}$ ، $UB_{79}$ ، $UB_{91}$ ، $UB_{95}$ و $UB_{96}$.

الگوهای باندی به دست آمده توسط آغازگر $UB_{96}$ در شکل یک نشان داده شده است. این آغازگر نسبت به بقیه آغازگرها، تعداد

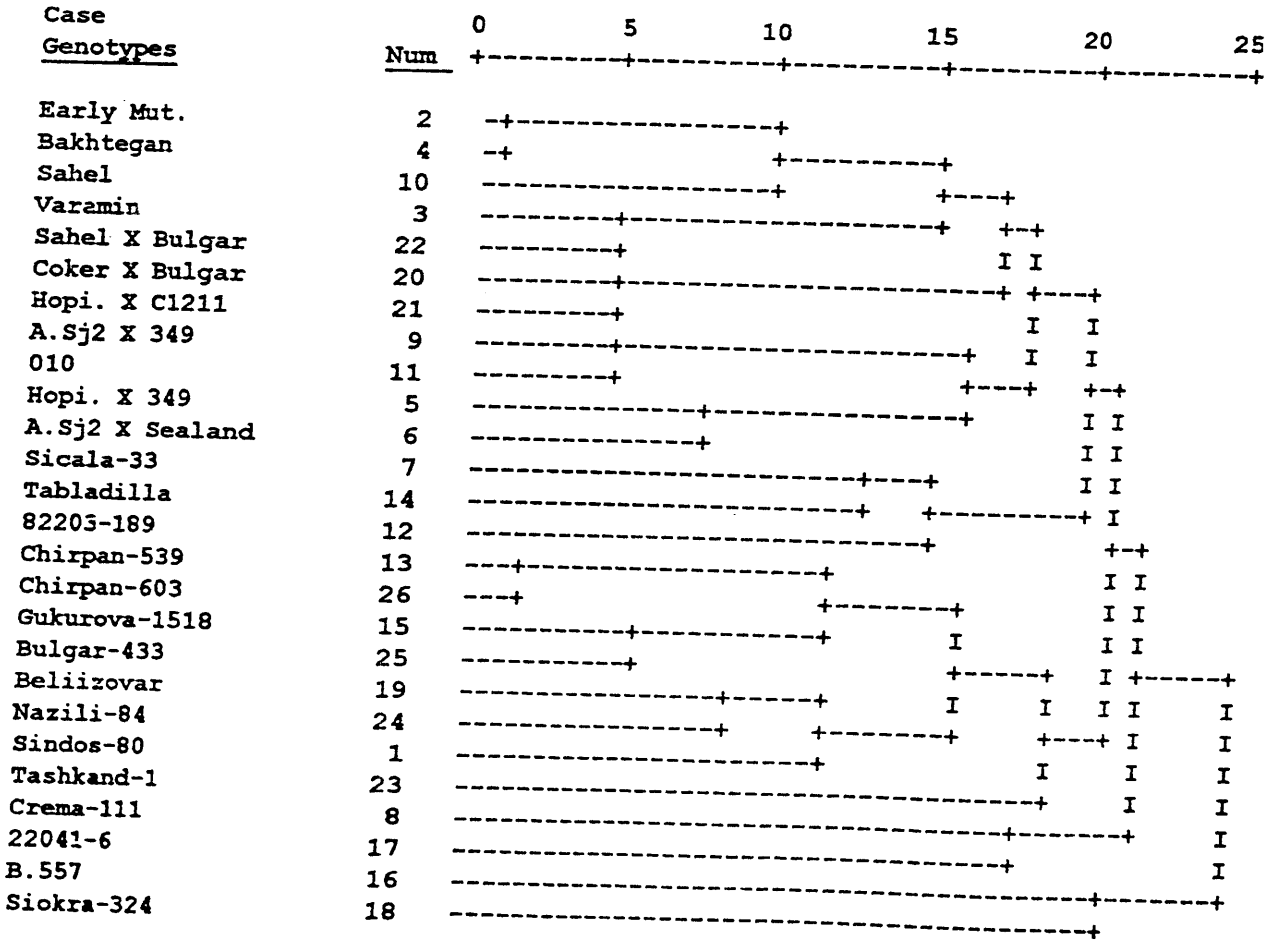
جدول ۳ - لیست آغازگرهای تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی مورد استفاده

| آغازگر | توالی بازی ۳ ⇒ ۵ | تعداد کل قطعات تکثیرشده | تعدادقطعات چندشکل (b) | درصدچندشکلی (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 |



ب الف

شکل ۱ـ الگوهای باندی به دست آمده بر اساس آغازگر UB96. CG-M و M= نشانگر pBR، $M-^{£}$= نشانگر $\lambda$ DNA-Hind*III*، شماره‌های ۱ تا ۲۶ = ژنوتیپ‌های پنبه مورد بررسی که در جدول ۱ـ 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.




شکل ۲ـ 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 می‌دهند. در نمودار یک، هیستوگرام فراوانی مطلق مجموع تمام باندهای ۱۳ آغازگر در محدوده اندازه‌های ۲۰۰ جفت بازی نشان داده شده است. این نمودار نشان می‌دهد که با افزایش اندازهٔ باندها، فراوانی آنها کاهش می‌یابد. بیشترین تعداد قطعات تکثیر شده در محدودهٔ ۵۰۰-۳۰۰ جفت باز و کمترین تعداد در محدودهٔ 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 می‌دهد. 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.

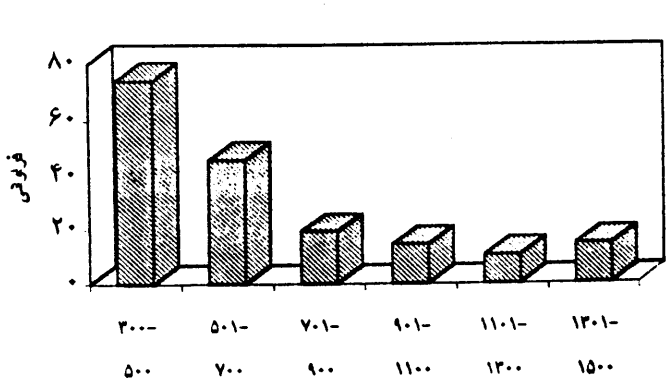
بر اساس ماتریس تشابه، کمترین شباهت بین واریته‌ای ۱۰/۴% و مربوط به دو ژنوتیپ ۱۸۹-۸۲۲۰۳ و سای‌اکرا-۳۲۴ است. همچنین ژنوتیپ‌های ۱۸۹-۸۲۲۰۳ و بی-۵۵۷ با تشابه ۱۱/۸% و شیریان-۵۳۹ و بی-۵۵۷ با ۱۲/۳% شباهت کمی نسبت به یکدیگر دارند. دو ژنوتیپ زودرس موتاژنز و بختگان نیز با ۴۳/۶% بیشترین شباهت بین واریته‌ای را به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

دردندروگرام شکل ۲، محور متشابه درفاصلهٔ ژنتیکی ۲۰ بریده شد، زیرا در این حالت براساس خصوصیات مورفولوژیکی ژنوتیپ‌ها نیز تفسیر بهتری خواهیم داشت. در این حالت گروه‌های زیر را خواهیم داشت:

در گروه اول ۱۱ ژنوتیپ قرار گرفته‌اند که با توجه به اطلاعات موجود، در ۱۰ ژنوتیپ آن، یک یا هر دو والد، امریکایی‌اند و منشأ ۰۱۰ ازبکستان است. رقم تجاری ساحل که در این تحقیق به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود، در این گروه قرار گرفته‌است. این رقم به عنوان یک رقم متحمل به بیماری ورتیسیلیوم (بوته‌میری) اصلاح گردیده است. در جدول تشابه جاکارد شباهت زیادی بین ژنوتیپ‌های ساحل، ورامین، بختگان و زودرس موتاژنز مشاهده می‌شود و از لحاظ مورفولوژیکی نیز به عنوان ارقام دارای خصوصیات زودرسی، عملکرد مناسب، کیفیت نسبتاً خوب الیاف و درصد کیل زیاد می‌باشند. بقیه ژنوتیپ‌ها، خصوصاً آنهایی که از آکالا و هوپی‌کالا منشأ گرفته‌اند نیز چنین خصوصیاتی را دارا می‌باشند. Sjها منشأ ترکیبی دارند و حاصل یک سری تلاقی هستند که بازدهی، مقاومت در برابر پژمردگی و زودرسی را در سطح بالایی در پنبه ایجاد کرده‌اند. اغلب ژنوتیپ‌هایی که در این گروه قرار گرفته‌اند، تا حدودی مقاومت به بیماری را دارا می‌باشند 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 می‌باشد، در این گروه قرار گرفته است.

در گروه دوم، ۳ ژنوتیپ قرار گرفته‌اند که منشأ سی‌کالا-۳۳ و ۱۸۹-۸۲۲۰۳ از استرالیا و تابلادیلا از اسپانیاست.

در گروه سوم، ۸ ژنوتیپ قرار گرفته‌اند که منشأ ۴ ژنوتیپ




شکل ۳ - هیستوگرام فراوانی مطلق مجموع باندهای ۱۳ آغازگر مورد بررسی در محدوده‌های اندازهٔ ۲۰۰ جفت‌بازی.

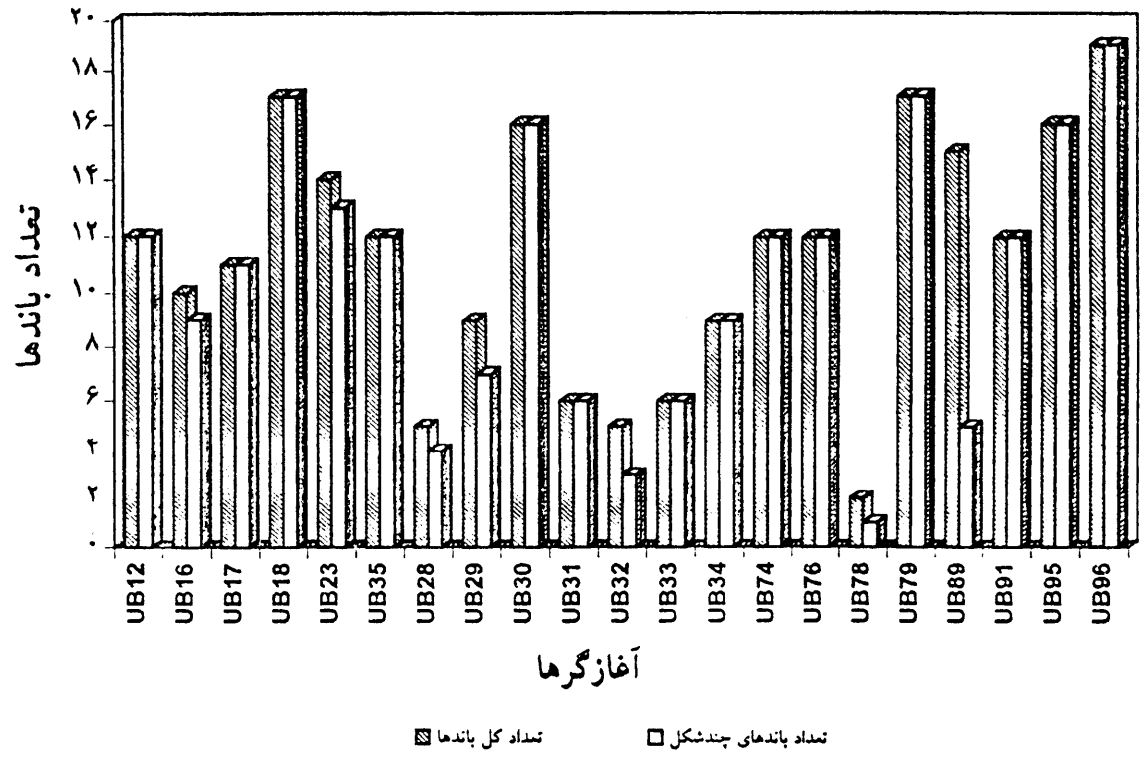
شیرپان-۵۳۹ ، شیرپان-۶۰۳ ، بلغار-۴۳۳ و بلی‌آیزوار از بلغارستان، دو ژنوتیپ چکوروا-۱۵۱۸ و نازیلی-۸۴ از ترکیه، سیندوز-۸۰ از یونان و تاشکند-۱ از ازبکستان است. مشخصه اصلی این گروه زودرسی است، خصوصاً ژنوتیپ‌های شیرپان که خیلی زودرسند و فرم بوته کوچکی دارند. در مجموع ژنوتیپ‌های موجود در این گروه از ژنوتیپ‌های گروه اول زودرس‌ترند.

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 پایین‌تری 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 ورتیسیلیومی 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 کلاستربندی 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.

مختلف قرار گرفته‌اند. این سه ژنوتیپ از لحاظ مورفولوژیکی نیز خصوصیات متمایزی از یکدیگر دارند. مولتانی و لیون (۱۱) نیز در یک مقایسه جفتی در میان ارقام پنبه هیرسوتوم نشان دادند که احتمال دارد حتی بین ارقام خویشاوند خیلی نزدیک نظیر سی‌کالا وی-۱ و سی‌کالا وی-۲ و همچنین سای‌اکرا ال-۲۲ و سای‌اکرا ال-۲۳ نیز با استفاده از نشانگرهای ملکولی فرق گذاشته شود.

از بررسیهای انجام شده برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های پنبه آپلند، می‌توان استنباط کرد که تکنیک RAPD به همراه روشهای آماری چند متغیره مثل تجزیه کلاستر، پتانسیل قابل توجهی جهت بررسی روابط خویشاوندی تکاملی، تنوع ژنتیکی و جغرافیایی این گیاه دارد. به عنوان مثال، در گروه اول، ژنوتیپ‌هایی قرار گرفته‌اند که اکثرشان منشأ امریکایی دارند، نسبت به بیماری ورتیسیلیوم تحمل مناسبی داشته و پرمحصول و زودرسند. در گروه دوم ، دو ژنوتیپ استرالیایی و یک ژنوتیپ از اسپانیا قرار گرفته‌اند که تقریباً مشخصات مشابهی دارند و تحمل به بیماری آنها کمتر از ساحل است. در گروه سوم، ژنوتیپ‌هایی با منشأهای مختلف قرار گرفته‌اند، ولی خصوصیت اصلی همه آنها زودرسی است، خصوصاً ژنوتیپ‌های با منشأ بلغارستان که خیلی زودرسند. گروه‌های پنج و شش به دلیل داشتن خصوصیات مورفولوژیکی کاملاً متفاوت در دو گروه جداگانه و متمایز از تمام گروه‌های دیگر قرار گرفته‌اند. بنابراین می‌توان به نتایج به دست آمده از دندروگرام اطمینان کرد.

از آنجایی که شجره اغلب ژنوتیپ‌های مورد استفاده شناخته شده است، می‌توان تأیید نمود که خویشاوندی‌های به دست آمده بین ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های RAPD به طور زیادی واقعی‌اند. بنابراین می‌توان فرض کرد که اگر چنین آنالیزی به ژرم‌پلاسم‌های دیگر پنبه با اطلاعات شجره‌ای ناشناخته یا از منشأهای مختلف تعمیم داده شود، احتمال دارد که تصویری از خویشاوندی‌های ژنتیکی آنها فراهم‌کند.

با توجه به مطالب بحث شده در بالا می‌توان چنین بیان داشت که تکنیک RAPD به دلیل داشتن ویژگی‌های خاص خود در بررسی چند شکلی و مطالعات ژنتیکی گیاه پنبه، که معمولاً اطلاعات قبلی کمی در مورد آن وجود دارد، می‌تواند نقش مهمی داشته باشد. سطح چند شکلی نمایان شده به وسیله این ژنوتیپ‌ها می‌تواند در نقشه‌یابی ژنتیکی جمعیت‌ها برای نشانمند نمودن صفات مهم اقتصادی نظیر کیفیت الیاف به کار رود و همچنین در گزینش والدین برای اهداف اصلاحی کمک خواهد کرد. تاتینی و همکاران (۱۶) نیز نشان دادند که آنالیز RAPD به طور واقعی می‌تواند خویشاوندی‌های ژنتیکی درون تعداد گوناگونی از ژرم‌پلاسم پنبه را تعیین کند.

بهترین نوع بررسی خویشاوندی در میان ژنوتیپ‌ها زمانی خواهد بود که هم از اطلاعات مورفولوژیکی و هم از RAPD استفاده شود (۱۶). ژنوتیپ‌هایی که در این تحقیق، بر اساس تمام داده‌ها بیشترین تنوع را ارائه دادند، سای‌اکرا-۳۲۴ (از استرالیا) و بی-۵۵۷ (از پاکستان) بودند. انتقال صفات مطلوب این ژنوتیپ‌ها نظیر مقاومت به بلایت باکتریایی و پژمردگی ورتیسیلیومی، عملکرد زیاد، زودرسی و کرکدار بودن برگها در سای‌اکرا-۳۲۴ و مطلوب بودن ژنوتیپ بی-۵۵۷ برای کشت در دشتهای مکانیزه به ارقام ساحل و ورامین و یا ارقام زراعی مناسب دیگر اهمیت زیادی دارد و خصوصیات منحصر به فرد این ژنوتیپ‌ها، ممکن است آنها را والدین مناسبی برای نقشه‌یابی جمعیت‌ها به خاطر نشانمند نمودن صفات مربوط به کیفیت الیاف نماید.

به دلیل اینکه هتروزیس در تلاقیهای بین گونه‌ای و درون گونه‌ای پنبه کاملاً به اثبات رسیده است (مصاحبه شخصی با دکتر جاناگودار از هندوستان ، شهریور ۱۳۷۸)، در پروژه‌های اصلاح نباتات، بر اساس فاصله‌های ژنتیکی به دست آمده از این تحقیق، می‌توان ژنوتیپ‌هایی را که دارای عدم تشابه بالایی هستند، با یکدیگر تلاقی داده و از هتروزیس موجود استفاده نمود.

طبق دندروگرام شکل ۴، ژنوتیپ‌های سای‌اکرا-۳۲۴، بی-۵۵۷ و ۱۸۹-۸۲۲۰۳ چنین شرایطی را خواهند داشت تا به عنوان والدین تلاقی در برنامه‌های دورگ‌گیری با ارقام استاندارد ساحل، ورامین، بختگان و زودرس موتاژنز مورد استفاده قرار گیرند.

## مراجع مورد استفاده REFERENCES

۱. عبدمیشانی،س و ع.ا.شاه‌نجات 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. Apll. 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