"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲
(ص ۲۴-۱۳)
مقاله پژوهشی

Iranian Journal of Seed Science and Technology
Vol.: 12, No.: 3, Autumn 2023
(pp: 13-24)
DOI: 10.22092/ijsst.2023.361051.1466
Research Article

ارزیابی خلوص ژنتیکی بذر ارقام پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگرهای ریزماهواره

مریم نجفیان فخرائی[۱]، قاسم توحیدلو[۲*]، آیدین حمیدی[۳]، فرزاد پاکنژاد[۴]، مهدی رضائی[۵]

۱. دانشجوی دکتری زراعت دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۳. دانشیار پژوهش سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کرج، ایران
۴. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۵. استادیار پژوهش سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۶)

چکیده

به منظور ارزیابی خلوص ژنتیکی و اصالت سه رقم تجاری رایج پنبه (ورامین، خرداد و بختگان) از صفات ریخت‌شناختی[1] و نشانگرهای ریزماهواره استفاده گردید. بذور این ارقام به همراه لاین‌های خالص در قالب یک طرح دوساله‌ی بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در مزرعه کشت و با صفات ریخت‌شناختی مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین از آزمون مولکولی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره برای تکمیل روش آزمون رشد مزرعه‌ای (GOT) استفاده گردید. نتایج آزمون GOT نشان داد که نمونه‌های خالص ارقام در هفت صفت ریخت‌شناختی با نمونه‌های خارج از تیپ و غیرخالص تفاوت داشته و میتوان از این صفات که تحت تاثیر محیط نمی‌باشند، به عنوان کلید شناسایی رقم و اطمینان از خلوص ژنتیکی ارقام مورد نظر استفاده کرد. در آزمایش ملکولی، از هفت نشانگر، سه جفت به دلیل قدرت تفکیک و تعداد آلل موثر (DPL431,DPL0513,CIR246) انتخاب شدند. با توجه به مشابه بودن نتایج دو روش GOT و نشانگرهای ریزماهواره، می‌توان از روش مولکولی (با توجه به هزینه بر بودن آن) تنها به عنوان روشی سریع، موردی و تکمیلی برای تعیین درصد خلوص ژنتیکی ارقام پنبه استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پنبه، آزمون خلوص ژنتیکی، صفات ریخت‌شناختی، SSR

Assessment of genetic purity of cotton cultivars (*Gossypium hirsutum* L.) using morphological characteristics and microsatellite marker (SSR)

M. Najafian Fakhraei[1], G. Tohidloo[2*], A. Hamidi[3], F. Paknezhad[4], M. Rezaei[5]

1. Ph.D student of Agriculture, Islamic Azad University, Karaj branch.
2. Assistant Professor, respectively, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj branch.
3. Associate Professor of Agriculture Research, Education and Extension Organization (ARREO), Seed and Plant Certification and Registration Institute (SPCRI), Karaj.
4. Professor, respectively, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj branch.
5. Assistant Professor of Agriculture Research, Education and Extension Organization (ARREO), Seed and Plant Certification and Registration Institute (SPCRI), Karaj.

(Received: Jan. 01, 2023 – Accepted: Feb. 25, 2023)

Abstract

In order to evaluate the genetic purity and fidelity of three commercial cotton cultivars (Varamin, Khordad and Bakhtegan), morphological characteristics and microsatellite markers were used. The seeds of these cultivars were grown in the field along with pure seeds under a two-year randomized complete block design with four replications and were assessed by morphological characteristics. In addition, molecular assay was used to complement the field grow-out test (GOT). The results of the GOT test showed that the pure samples of the cultivars were distinct from the off-type and non-pure samples in seven morphological characteristics. Therefore, they could be used as descriptors for identification of the desired cultivar, as they are not influenced by the environment conditions. In the molecular test, three microsatellite markers (DPL431, DPL0513, and CIR246) were selected (out of seven) based on their resolving power and the number of effective alleles. Given similarity of the GOT and microsatellite marker assay, one can take advantage of molecular markers (owing to their high cost) only as a fast, case-by-case and complementary method to determine the genetic purity percentage of cotton cultivars.

Keywords: Cotton, Genetic purity test, morphological characteristics, SSR.

* Email: ghtohid@gmail.com

1 Morphological characteristics

مقدمه

پنبه (*Gossypium hirsutum* L.)یکی از محصولات راهبردی صنعتی و ماده اولیه صنایع نساجی است و پس از سویا، دومین دانه روغنی جهان به شمار می‌آید (Cetin O, Basbag S, 2010). پس از روغن، الیاف سلولزی بذر، محصول ثانویه پنبه دانه می‌باشد که در صنایع نساجی به‌کار می‌رود. به‌دلیل دو خاصیت تجاری مذکور، نیاز به تحقیقات بیشتری بر روی این گیاه می‌باشد (Hamidi *et al.*, 2011). طبق آخرین آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی در سال زراعی ۱۴۰۰- ۱۳۹۹، سطح برداشت، میزان تولید و عملکرد پنبه کشور به‌ترتیب ۹۸۸۱۰ هکتار، ۲۷۷۹۸۰ تن و ۲۸۵۲۱ کیلوگرم در هکتار در زراعت آبی و ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار در زراعت دیم بود (AREEO, 2022). ژنوتیپ‌ها و ارقام گیاهی مهم‌ترین دستاورد پژوهش‌های به‌نژادی محسوب می‌شوند که طی فرآیندهای پیچیده، طولانی و پرهزینه به‌نژادی به دست آمده‌اند. ازاین‌رو حفظ خلوص ژنتیکی این ارقام به‌عنوان ذخایر ژنتیکی کشور و حمایت از حقوق به‌نژادگران اهمیت فوق‌العاده‌ای در راستای نیل به پایداری تولیدات کشاورزی دارد که تنها ازطریق فرایند شناسایی و ثبت ارقام[1]قابل دستیابی است (Mozafari *et al.*, 2010). آزمون شناسایی[2]، تعیین اصالت و[3] خلوص ژنتیکی[4]رقم ضروری‌ترین اجزای یک سیستم کنترل و گواهی بذر است. اصالت رقم به مفهوم میزان مطابقت ژنتیکی و ریخت شناختی(ریخت شناختی) رقم با تیپ ثبت شده[5]آن است (Agrawal, 1997). خلوص ژنتیکی یک نمونه بذر به معنی درصدی از نمونه است که با بذرها یا مواد ژنتیکی ارقام یا گونه‌های دیگر مخلوط نشده است (Agrawal, 1992). تنها زمانی می‌توان انتظار بیشترین بهره از نهاده‌های کشاورزی را داشت که از بذرهای با خلوص ژنتیکی کافی استفاده شود. بنابراین برای جلوگیری از زوال رقم در نسل‌های تکثیر، تضمین عملکرد مورد انتظار، حفظ خلوص ژنتیکی ارقام گیاهی، بیشترین اهمیت را دارا است (Agrawal, 2002). اولین و پر کاربردترین روش در تعیین خلوص ژنتیکی، آزمون مزرعه‌ای یا آزمون رشدی[6] می‌باشد. در فرایند کنترل کیفیت بذر تولید شده از این آزمون برای صدور گواهی خلوص ژنتیکی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی در مراحل مختلف رشد گیاه مشخص می‌شود (Rana, M *et al.*, 2007). اتحادیه بین المللی حمایت از ارقام جدید گیاهی[7]راهنمای تهیه شناسنامه ریخت‌شناختی ارقام گیاهی را از طریق دستورالعمل‌های آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری[8] مختص هر گونه گیاهی در دسترس عموم قرار داده است (UPOV, 2018). طبق قانون ثبت ارقام گیاهی کشور ایران، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال به‌عنوان تنها مرجع ملی ثبت و حمایت از ارقام جدید گیاهی می‌باشد. از مزایای آزمون رشدی استفاده از شناسنامه ریخت‌شناختی ارقام بدون نیاز به تجهیزات خاص ارزیابی و دسترسی ساده به آنها است. بررسی برخی صفات ریخت‌شناختی زمان بر و پر زحمت است و همچنین به دلیل اثر بازدارنده برهمکنش ژنتیک× محیط، کمتر قابل اعتماد هستند (Li, *et al.*, 2002). با توجه به زمان‌بر بودن و خطای نیروی انسانی آزمون رشدی مزرعه مبتنی بر

1 Variety registratin
2 Identification
3 Fidelity
4 Genetic purity
5 Registered type
6 GOT:Grow-Out Test
7 International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV)
8 Distinctness, Uniformity And Stability (DUS) test guidelines

صفات ریخت‌شناختی، می‌توان از روش مولکولی، به علت سریع بودن، تکرار پذیر بودن و قابل اعتماد بودن آن برای تعیین خلوص ژنتیکی ارقام پنبه استفاده کرد (Santosh, H.B *et al.*, 2022& Silvanacristae, *et al.*, 2002). از مهم‌ترین مزایای دیگر این نشانگرها می‌توان به غیر وابسته بودن به مرحله رشدی گیاه و قابلیت ارزیابی در هر مرحله در آزمایشگاه اشاره نمود. استفاده از نشانگرهای مولکولی در آزمون تیپ با توجه به مزیت‌های آن‌ها، در کارگروه روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی و تهیه پروفایل DNA (BMT)[1] که زیر نظر کمیته فنی اتحاد یه UPOV فعالیت می‌نماید، مد نظر قرار گرفته است. استفاده از این نشانگرها در ثبت ارقام، در قالب سه مدل نشانگرهای مولکولی اختصاصی صفت، ترکیب نشانگرهای ریخت‌شناختی و مولکولی به منظور مدیریت مجموعه ارقام و معرفی یک سیستم جدید مورد ارزیابی قرار گرفته است (UPOV, 2018). کارگروه BMT اتحادیه بین‌المللی حمایت از ارقام جدید گیاهی دستورالعمل استفاده از نشانگر های مولکولی DNA را در آزمون های تمایز، یکنواختی و پایداری و ثبت ارقام به عنوان صفات تکمیلی تدوین کرده است. در این دستورالعمل ریزماهواره‌ها به عنوان نشانگر های اصلی مورد تأکید قرار گرفته‌اند (Mozafari *et al.*, 2010). این نشانگرها به دلیل دارا بودن مزایایی چون مقدار تنوع آللی و چند شکلی بسیار بالا و مشخص بودن محل کروموزومی و امتیازدهی نسبتاً آسان به عنوان ابزار تکمیلی در آزمون های DUS مورد توجه قرار گرفته‌اند. تاتینی و همکاران تنوع ژنتیکی۱۶ ژنوتیپ هوموزیگوس مشتق شده از هیبریداسیون بین گونه‌ای را با استفاده از دو روش GOT و نشانگر های ریز ماهواره (RAPD)، با همبستگی نتایج ۰/۶۳ مورد بررسی قرار دادند (Tatineni *et al.*, 1996). در آزمایشی، ارقام هیبرید پنبه را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره SSR، ISSR و RAPD مورد مطالعه قرار دادند که بیشترین تنوع بین ارقام را نشانگر ملکولی ISSR نشان داد (Noormohammadi *et al.*, 2013).۱۳۲ ژنوتیپ پنبه با استفاده از نشانگر ملکولی SSR انگشت نگاری شدند و به ۱۰ گروه مجزا تفکیک شدند (Zhang *et al.*, 2013). تیاگی و همکاران طی آزمایشی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت در پنبه تتراپلوییید را به وسیله نشانگر ملکولی SSR مورد مطالعه قرار دادند (Tyagi *et al.*, 2014). به منظور بررسی ژرم پلاسم و بهبود ژنتیکی پنبه ۴۴ رقم در پاکستان برای آنالیز ملکولی انتخاب شدند و نتایج نشان داد که با وجود تنوع ژنتیکی بسیار پایین در ارقام رایج پنبه در پاکستان، تعداد زیادی از نشانگرها توانستند با مقدار ۰/۲۸PIC تا ۰/۹۴، ارقام را از یکدیگر تفکیک کنند (Saleem *et al.*, 2020). تکنیک‌های نشانگر ملکولی مبتنی بر PCR توسط رانا و همکاران در سال ۲۰۰۶ برای ارزیابی تنوع ژنتیکی هشت هیبرید تجاری پنبه از جمله لاین های والدین آنها و همچنین برای شناسایی نشانگر مناسب برای تعیین خلوص ژنتیکی استفاده شد (Rana *et al.*, 2007).

در سال‌های اخیر، اختلاط برخی از ارقام پنبه با بذور خارج از تیپ، اعم از کرک سبز و بدون کرک گزارش گردید. از این رو، مجوز تولید بذر آنها توسط کارشناسان کنترل گواهی بذر موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، طبق دستورالعمل فنی کنترل و گواهی بذر پنبه صادر نشد. این پژوهش در جهت بررسی ادعای «نژادگر مبنی بر این که «ظهور صفت کرک سبز بودن، ژنتیکی نیست و تغییر رنگ کرک می‌تواند متاثر از محیط باشد»، پایه‌ریزی شده است.

مواد روش‌ها

این پژوهش به منظور بررسی خلوص ژنتیکی سه رقم پنبه (خرداد، ورامین و بختگان) به دو روش ریخت شناختی (در مزرعه تحقیقاتی موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر

1 Working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA Profiling in Particular (BMT)

و نهال) و ملکولی (در آزمایشگاه مارکرهای مولکولی) انجام شد. آزمون شناسایی بذر سایر ارقام، برای نمونه کاری دو کیلوگرمی بر اساس دستورالعمل انجمن بین‌المللی آزمون بذر[1] انجام شد و بذور خارج از تیپ به بدون کرک و کرک سبز تفکیک و برای دقت بیشتر با دستگاه استریومیکروسکپ شرکت Nikon مدل SMZ-1 و با بزرگنمایی چهار برابر بررسی شدند.

آزمون رشد مزرعه‌ای (GOT)

این پژوهش شامل ۱۲تیمار (سه نمونه از بذر اصیل ارقام خرداد، ورامین و بختگان، به عنوان نمونه شاهد (کرک سفید)، سه نمونه بذر خارج از تیپ که از نمونه کاری ارقام خرداد، ورامین و بختگان در آزمایشگاه جداسازی شده بود (کرک سبز و بدون کرک)، سه نمونه توده مخلوط از ارقام خرداد، ورامین و بختگان (نمونه ای که جداسازی ارقام خارج تیپ برای آن‌ها انجام نشده بود)، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار اجرا شد. هر کرت دارای چهار خط کشت به طول شش متر با فاصله پشته ۷۵ سانتی‌متر و فاصله بوته روی ردیف ۱۵ سانتی‌متر و با تراکم بوته مناسب توصیه شده بود. در طول اجرای آزمایش ارزیابی صفات ریخت‌شناختی شامل ۱- تیپ گلدهی، ۲- موقعیت کلاله نسبت به پرچم در گل آذین، ۳- شکل بوته، ۴- برجستگی نوک غوزه، ۵- شکل غوزه در برش طولی، ۶- درجه شکفتگی غوزه و ۷- رنگ کرک بذر طبق دستورالعمل ملی آزمون‌های تمایز یکنواختی و پایداری (DUS) ارقام پنبه صورت گرفت. بر این اساس در هر مرحله رشدی بوته‌های خارج از تیپ علامت گذاری و شمارش شدند و در نهایت درصد خلوص ژنتیکی با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد.

$$\text{خلوص ژنتیکی بذر (درصد)} = (1 - \frac{n}{N}) \times 100 \quad \text{رابطه (۱)}$$

در این رابطه n تعداد بوته‌های خارج از تیپ و N تعداد کل بوته‌های مورد ارزیابی است.

آزمون ملکولی

استخراج DNA از بافت برگ جوان با روش سقایی معروف با اعمال تغییرات جزئی انجام شد. این تغییرات شامل دو برابر کردن غلظت بافر استخراج و استفاده از دی تیوتریتول (DTT) به غلظت ۳۰ میلی‌مولار به جای مرکاپتواتانول به مقدار ۰/۲ درصد بود (Saghai Maroof *et al*., 1984). تعیین غلظت DNA استخراج شده، یک میکرولیتر از آن مستقیماً روی حسگر اسپکترومتر نانودراپ مدل ND-1000 بارگذاری شد. همچنین برای بررسی خلوص DNA از دو نسبت جذب A260/A280 و A260/A230 استفاده شد. برای ارزیابی کیفی DNA استخراج شده، پنج میکرولیتر از DNA استخراج شده با حجم مناسب از بافر بارگذاری مخلوط و به چاهک‌های ژل آگارز یک درصد اضافه شد. ولتاژی به اندازه ۸۰ و به مدت ۳۰ دقیقه اعمال گردید. پس از اتمام زمان لازم، ژل آگارز برای مشاهده باندها به دستگاه آشکارساز ترانسلومینومتر UV انتقال داده شد و توسط دستگاه تصویربردار ژل Gel-Scan 3000™ عکسبرداری انجام شد. هفت جفت آغازگر ملکولی SSR مطابق جدول ۱ استفاده شد. این آغازگرها با در نظر گرفتن جایگاه کروموزومی و بیشترین مقدار چند شکلی از سایت www.cottongen.org گزینش و از بین این آغازگرها، سه جفت آغازگر (DPL431,DPL0513 and CIR246) بر اساس تکرار پذیری و قابلیت تفکیک برای تعیین خلوص ژنتیکی تیمارها انتخاب شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به حجم ۱۵ میکرولیتر با Master Mix (شرکت سیناژن) با غلظت 2X، حاوی ۰/۰۸ واحد آنزیم Taq پلیمراز، ۳ میلی‌مولار MgCl2 و ۰/۴ میلی مولار dNTPs انجام شد. برای تهیه حجم ۱۵میکرولیتر واکنش PCR به میزان ۷/۵ میکرولیتر Master Mix، ۰/۲۵میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای پیشرو و پسرو و ۲ میکرولیتر DNA الگو به غلظت ۵۰ نانو

1 ISTA :International Seed Testing Association

گرم استفاده شد. به منظور بهینه نمودن دمای اتصال هر جفت آغازگر ابتدا از یک شیب دمایی زیر دمای ذوب (Tm) آغازگرها استفاده شد. محصولات تکثیرشده در دماهای مختلف در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و بهترین دمای اتصال تعیین شد. برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز از دستگاه ترمال سایکلر ساخت شرکت Eppendorf مدل Master cycler Gradient استفاده گردید. چرخه های حرارتی برای تکثیر با آغازگر های مورد استفاده مطابق با جدول ۲ انجام شد. محصول PCR روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۰٪ با دستگاه الکتروفورز شرکت C.B.S به مدت دو ساعت و ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۱۵۰ بارگذاری و سپس رنگ آمیزی شد. سپس با دستگاه ژل داک عکس تهیه گردید. غربالگری بر اساس باندهای واضح صورت گرفت و اندازه باندها با توجه به خط کش ژنومی مورد استفاده (۵۰ bp, Fermentas)، با استفاده از فرمول لگاریتمی استخراج شده برای هرجفت آغازگر مشخص شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای ریز ماهواره مورد بررسی

Table 1- Primer sequences of tested microsatellite

نشانگر Marker	نوع Type	پیشرو Forward	پسرو Reverse	دمای اتصال Annealing Temp.	تعداد آلل No. of alleles
BNL 1317	Genomic	AAAAATCAGCCAAATTGGGA	CGTCAACAATTGTCCCAAGA	55	3
BNL 4108	Genomic	TCCACCATTCCCGTAAATGT	TGGCCAAGTCATTAGGCTTT	55	4
CIR 246	Genomic	TTAGGGTTTAGTTGAATGG	ATGAACACACGCACG	55	5
DPL 0431	Genomic	CTATCACCCTTCTCTAGTTGCGTT	ATCGGGCTCACAAACATCA	55	4
DPL 0513	Genomic	AGACCCGGCTACTACATGTTATCTT	ACATACAGATGCTTCACACAAACAC	55	4
NAU 5434	EST	AAAAGAACTTACGGCACAGG	AAATCACTGGCACTGGAATC	57	3
NAU 3735	EST	AATACCCGGTTTCAGTTTCA	CTCAGCTCACATTCACCAAG	57	5

جدول ۲- زمان و دمای استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Table 2- Time and temperature used in PCR

ردیف Number	مراحل Steps	دما Temperature(^{0}c)	زمان Time	تعداد چرخه‌ها Number of cycles
1	واسرشته‌سازی اولیه First denaturation	94	سه دقیقه 3 minute	1
	واسرشته‌سازی Denaturation	94	۳۰ ثانیه 30 sec	40
2	اتصال Annaeling	55-57	۳۰ ثانیه 30 sec	1
3	گسترش Extension	72	یک دقیقه 1minute	1
	گسترش نهایی Final extention	72	۱۰ دقیقه 10 minute	1

نتایج و بحث

نتایج آزمون رشدی مزرعه (GOT)

به منظور تعیین خلوص ژنتیکی در این آزمون حدود ۱۰۰ بوته به صورت تک به تک با استفاده از شناسنامه ریخت‌شناختی موجود برای هر رقم (که پیشتر توسط موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال تهیه شده) ارزیابی و تعداد بوته‌های خارج از تیپ بر اساس صفات مذکور شمارش و ثبت گردید. درصد خلوص

ژنتیکی نمونه های مخلوط (غیر یکنواخت شامل بذور کرک سفید، کرک سبز و بدون کرک) خرداد، ورامین و بختگان به ترتیب ۶۲/۲٪، ۵۳/۳٪ و ۴۹٪ بود. در حالی که درصد خلوص نمونه‌های شاهد (بذر اصیل) این ارقام ۱۰۰٪ بود (جدول ۳).

نمونه خالص(تیپ-کرک سفید) و خارج از تیپ رقم خرداد در صفت تیپ گلدهی از یکدیگر متفاوت بود، به طوریکه این صفت در نمونه خالص (تیپ- کرک سفید) و خارج از تیپ (کرک سبز)، به صورت باز، و در نمونه خارج از تیپ (بدون کرک) نیمه بسته تظاهر پیدا کردند. موقعیت کلاله نسبت به پرچم در نمونه خالص (تیپ- کرک سفید) بالاتر و در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز و بدون کرک) همتراز بود. شکل بوته نیز در نمونه خالص خرداد (تیپ- کرک سفید) و نمونه خارج از تیپ (کرک سبز)، به صورت کروی و در نمونه خارج از تیپ (بدون کرک)، به صورت مخروطی بود. برجستگی نوک بوته نیز در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز)، تیزتر از نمونه خالص و نمونه خارج از تیپ (کرک سبز) بود. در برش طولی غوزه هیچ تفاوتی با هم نداشتند و به صورت تخم مرغی ظاهر شدند. همچنین درجه شکفتگی غوزه در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز) بیشتر از نمونه خالص(تیپ-کرک سفید) و خارج از تیپ (بدون کرک) بود. در رنگ کرک نیز این تفاوت کاملا مشهود بود.

نمونه‌های خالص (تیپ- کرک سفید) و خارج از تیپ رقم ورامین در صفت تیپ گلدهی از یکدیگر متفاوت نبوده و به صورت نیمه بسته بودند. موقعیت کلاله نسبت به پرچم در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز) بالاتر و در دو نمونه خالص و خارج از تیپ (بدون کرک) همتراز ظاهر شد. شکل بوته نیز در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز) کروی و در نمونه خالص و خارج از تیپ (بدون کرک) مخروطی بود. برجستگی نوک غوزه در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز و بدون کرک) ورامین بیشتر از نمونه خالص ورامین (کرک سفید) بود و شکل برش طولی غوزه در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز و بدون کرک) ورامین تخم مرغی و در نمونه خالص (تیپ-کرک سفید) گرد بود. درجه شکفتگی غوزه نیز در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز) بیشتر بود و تفاوت در رنگ کرک نیز بین تیمارها کاملا مشهود بود.

نمونه‌های خالص (تیپ- کرک سفید) و خارج از تیپ رقم بختگان در این صفات از یکدیگر متفاوت بود به طوری که در صفت تیپ گلدهی نمونه خالص بختگان (کرک سفید) به صورت بسته و نمونه خارج از تیپ (کرک سبز و بدون کرک) نیمه بسته ظاهر شدند. موقعیت کلاله نسبت به پرچم در نمونه خالص بختگان (کرک سفید) و خارج از تیپ (بدون کرک) بالاتر و در خارج از تیپ (کرک سبز) همتراز ظاهر شد. از نظر شکل بوته تفاوتی با یکدیگر نداشتند و همه تیمارهای بختگان به صورت مخروطی بودند. برجستگی نوک غوزه در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز) بختگان بیشتر، شکل برش طولی غوزه نیز تفاوتی نشان نداد و همگی تخم مرغی بودند. در جه شکفتگی غوزه در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز) بختگان بیشتر و تفاوت رنگ کرک نیز به صورت واضح قابل مشاهده بود. کومار و همکارانش نیز در سال ۲۰۲۱ با استفاده از ۱۱ صفت موجود در دستورالعمل تمایز، یکنواختی و پایداری(DUS) ارقام پنبه، ۹۶ ژنوتیپ مختلف پنبه آپلند در کشور هند را از یکدیگر تفکیک کردند (Kumar, P *et al.*, 2020). همچنین تمایز دو ژنوتیپ در دست معرفی برای درج در فهرست ملی ارقام از نظر ۱۷ صفت ریخت‌شناختی در مقایسه با ارقام شاهد ورامین وگلستان گزارش شد (Hamidi, A *et al.*, 2022).

نتایج آزمون ملکولی

نمونه‌های پنبه خالص (تیپ- کرک سفید) به عنوان شاهد و خارج از تیپ با سه آغازگر CIR246, DPL431, DPL513 در باندهای واضح مورد غربالگری قرار گرفت. اندازه آلل های[1] تولیدی هر یک از آغازگر با توجه به

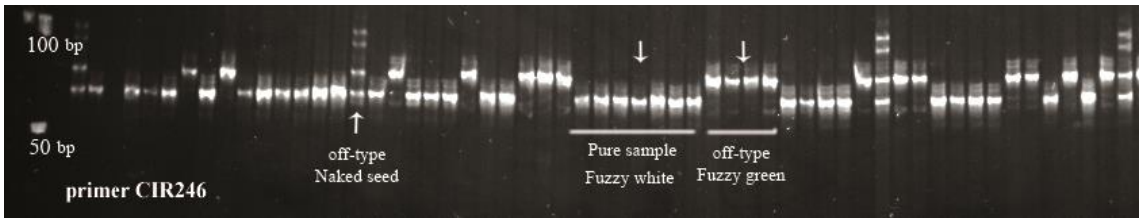
1 Allele

خط کش ژنومی استخراج گردید. آغازگر CIR246 طبق فرمول لگاریتمی y = 438.63e-0.598x, چهار آلل به اندازه‌های ۶۲/۸۱، ۶۸/۷، ۸۲/۲۰، ۹۲/۶۵، آغازگر DPL431 طبق فرمول لگاریتمی y = 405.14e-0.366x، هفت آلل به اندازه‌های ۷۱/۲۱، ۸۷/۰۹، ۱۰۰/۸، ۱۰۸/۴۸، ۱۱۶/۷۲، ۱۴۰/۱۶، ۱۴۸/۰۷، آغازگر DPL513 طبق فرمول لگاریتمی y = 450.7e-0.621x، هفت آلل به اندازه‌های ۸۹/۶۷، ۹۵/۴۲، ۱۰۱/۵۳، ۱۳۰/۱۶، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶، ۱۸۸/۹۳، تولید کردند.

آغازگر CIR246 برای رقم ورامین (تیپ- کرک سفید) یک آلل به اندازه ۶۲/۸۱، در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز) از ۱۲ نمونه، هشت نمونه با یک آلل به اندازه ۶۲/۸۱ و سه نمونه با یک آلل به اندازه ۶۸/۷ و یک نمونه با چهار آلل به اندازه‌های ۶۲/۸۱، ۶۸/۷، ۸۲/۲۰، ۹۲/۶۵، در نمونه خارج از تیپ (بدون کرک) از چهار نمونه، سه نمونه با یک آلل به اندازه ۶۲/۸۱ و یک نمونه با چهار آلل به اندازه‌های ۶۲/۸۱، ۶۸/۷، ۸۲/۲۰، ۹۲/۶۵، در نمونه مخلوط، از نه نمونه، هشت نمونه با یک آلل به اندازه ۶۲/۸۱ و یک نمونه با یک آلل به اندازه ۶۸/۷ مشخص نموده است.

آغازگر CIR246 برای رقم بختگان (تیپ- کرک سفید) یک آلل به اندازه ۶۸/۷، در نمونه خارج از (تیپ کرک) سبز از چهار نمونه، چهار نمونه با یک آلل به اندازه ۶۲/۸۱، در نمونه خارج از تیپ (بدون کرک) از چهار نمونه، یک نمونه با یک آلل به اندازه ۶۲/۸۱ و یک نمونه با چهار آلل به اندازه‌های ۶۲/۸۱، ۶۸/۷، ۸۲/۲۰، ۹۲/۶۵و دو نمونه با یک آلل به اندازه ۶۸/۷، در نمونه مخلوط، از چهار نمونه، سه نمونه با یک آلل به اندازه ۶۸/۷ و یک نمونه با یک آلل به اندازه ۶۲/۸۱ مشخص نموده است.

آغازگر CIR246 برای رقم خرداد (تیپ- کرک سفید) یک آلل به اندازه ۶۸/۷، در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز) از هشت نمونه، هفت نمونه با یک آلل به اندازه ۶۲/۸۱ و یک نمونه با یک آلل به اندازه ۶۸/۷، در نمونه خارج از تیپ (بدون کرک) از ده نمونه، یک نمونه با یک آلل به اندازه ۶۲/۸۱ و هشت نمونه با یک آلل به اندازه ۶۸/۷ و یک نمونه با چهار آلل به اندازه‌های ۶۲/۸۱، ۶۸/۷، ۸۲/۲۰، ۹۲/۶۵، در نمونه مخلوط، از ۱۲ نمونه، هفت نمونه با یک آلل به اندازه ۶۸/۷ و پنج نمونه با یک آلل به اندازه ۶۲/۸۱ مشخص نموده است (شکل ۱). پژوهشی در سال ۲۰۱۸ در کشور ترکیه روی ۴۹ رقم تجاری با استفاده از نشانگرهای SSR مشخص کرد در بین ۳۳ نشانگر مورد ارزیابی، نشانگر بر اساس کیفیت فیبر CIR246 چند شکلی نشان داده و میزان محتوای چند شکلی[1] نشان دهنده رابطه آن با کیفیت الیاف و اجزای عملکرد در پنبه می باشد (Saeed, A. and E. Elci., 2018).



شکل ۱- بررسی خلوص ژنتیکی نمونه خالص(تیپ) و خارج از تیپ (کرک سبز و بدون کرک) با استفاده از آغازگر CIR-246.لدر ۵۰ جفت بازی (فرمنتاز).

Figure 1- Genetic purity analysis of Pure (type) sample and off-type (fuzzy green and naked seed) samples using SSR primer DPL-513. 50 bp DNA ladder (Fermentas).

1 PIC: Polymorphism Information Content

جدول ۳- ارزیابی صفات ریخت‌شناختی: ۱- تیپ گدهی ۲- موقعیت کلاله نسبت به پرچم۳- شکل بوته۴- برجستگی نوک غوزه ۵- شکل غوزه در برش طولی ۶- درجه شکفتگی غوزه ۷- رنگ کرک، بر اساس دستورالعمل ملی تمایز، یکنواختی و پایداری ارقام پنبه و تعیین درصد خلوص ژنتیکی با استفاده از آزمون رشدی مزرعه (GOT)

Table3- Evaluation of morphological characteristics:1- type of flowering 2- position of stigma relative to anthers 3- shape of plant 4- prominence of tip of boll 5- shape in longitudinal section of boll 6- degree of opening of boll 7- color of fuzz based on national guidelines for distinctness, uniformity and stability of cotton varieties and determining percentage of genetic purity using growth out test (GOT)

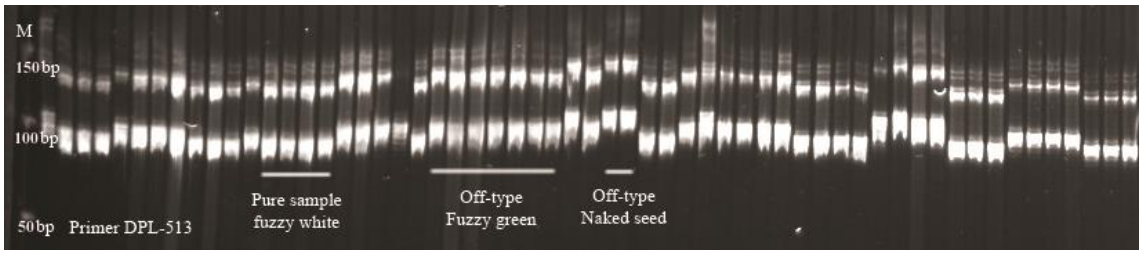
ردیف No.	تیمار Treatment	تیپ گلدهی type of flowering	موقعیت کلاله به پرچم position of stigma relative to anthers	شکل بوته shape of plant	برجستگی نوک غوزه prominence of tip of boll	شکل غوزه در برش طولی shape in longitudinal section of boll	درجه شکفتگی غوزه degree of opening of boll	رنگ کرک Color of fuzz	تعداد کل بوته‌های مورد آزمون Total plants tested	تعداد بوته‌های خارج از تیپ Number of off types	درصد خلوص ژنتیکی در آزمون رشدی مزرعه Genetic purity (GOT)
		TF	PSRA	SP	PTP	SLSB	DOB	CF			%
1	نمونه اصیل رقم خرداد (شاهد) Khordad authentic sample (check)	باز non-clustered	بالاتر clearly above	کروی globose	متوسط medium	تخم مرغی ovate	متوسط medium	سفید white	100	0	100
2	نمونه خارج از تیپ کرک سبز رقم خرداد Khordad (fuzzy green seed)	باز non-clustered	همتراز same level	کروی globose	زیاد strong	تخم مرغی ovate	زیاد strong	سبز green	108	98	9.25
3	نمونه خارج از تیپ بدون کرک رقم خرداد Khordad (naked seed)	نیمه بسته semi-clustered	همتراز same level	مخروطی conical	متوسط medium	تخم مرغی ovate	متوسط medium	بدون کرک naked seed	100	100	0
4	نمونه مخلوط تیپ و خارج تیپ رقم خرداد Khordad (mix of fuzzy green and naked seed)	غیر یکنواخت Non-uniform							98	37	62.2
5	نمونه اصیل رقم ورامین (شاهد) Varamin authentic sample (check)	نیمه بسته semi-clustered	همتراز same level	مخروطی conical	کم weak	گرد circular	متوسط medium	سفید white	100	0	100
6	نمونه خارج از تیپ کرک سبز رقم ورامین Varamin (fuzzy green seed)	نیمه بسته semi-clustered	بالاتر clearly above	کروی globose	زیاد strong	تخم مرغی ovate	زیاد strong	سبز green	100	94	6
7	نمونه خارج از تیپ بدون کرک رقم ورامین Varamin (naked seed)	نیمه بسته semi-clustered	همتراز same level	مخروطی conical	زیاد strong	تخم مرغی ovate	متوسط medium	بدون کرک naked seed	99	99	0
8	نمونه مخلوط تیپ و خارج تیپ رقم ورامین Varamin (mix of fuzzy green and naked seed)	غیر یکنواخت Non-uniform							103	48	53.3
9	نمونه اصیل رقم بختگان (شاهد) Bakhtegan authentic sample (check)	بسته clustered	همتراز clearly above	مخروطی conical	متوسط medium	تخم مرغی ovate	متوسط medium	سفید white	100	0	100
10	نمونه خارج از تیپ کرک سبز رقم بختگان Bakhtegan (fuzzy green seed)	نیمه بسته semi-clustered	همتراز same level	مخروطی conical	زیاد strong	تخم مرغی ovate	زیاد strong	سبز green	105	97	7.6
11	نمونه خارج از تیپ بدون کرک رقم بختگان Bakhtegan (naked seed)	نیمه بسته semi-clustered	بالاتر clearly above	مخروطی conical	متوسط medium	تخم مرغی ovate	متوسط medium	بدون کرک naked seed	98	98	0
12	نمونه مخلوط تیپ و خارج تیپ رقم بختگان Bakhtegan (mix of fuzzy green and naked seed)	غیر یکنواخت Non-uniform							100	51	49

آغازگر DPL513 برای رقم ورامین (تیپ- کرک سفید) سه آلل به اندازه‌های ۹۵/۴۲، ۱۳۰/۱۶، ۱۵۱/۰۸، در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز) از هشت نمونه، سه نمونه با سه آلل به اندازه‌های ۹۵/۴۲، ۱۳۰/۱۶، ۱۵۱/۰۸و۵ نمونه با سه آلل به ۱۰۱/۵۳، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶، در نمونه خارج از تیپ (بدون کرک) از چهار نمونه، چهار نمونه با سه آلل

۱۰۱/۵۳، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶، در نمونه مخلوط، از ۱۱نمونه، چهار نمونه با سه آلل به اندازه‌های ۹۵/۴۲، ۱۳۰/۱۶، ۱۵۱/۰۸و ۷ نمونه با سه آلل به اندازه های ۱۰۱/۵۳، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶، مشخص نموده است.

آغازگر DPL513 برای رقم بختگان (تیپ- کرک سفید) سه آلل به اندازه‌های۹۵/۴۲، ۱۳۰/۱۶، ۱۵۱/۰۸، در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز) از چهار نمونه، سه نمونه با سه آلل به اندازه‌های۱۰۱/۵۳، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶ و یک نمونه با سه آلل به اندازه‌های ۱۳۰/۱۶، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶، در نمونه خارج از تیپ (بدون کرک) از سه نمونه، دو نمونه با سه آلل ۱۰۱/۵۳، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶ و یک نمونه با سه آلل به اندازه‌های ۱۳۰/۱۶، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶، در نمونه مخلوط، از چهار نمونه، سه نمونه با سه آلل به اندازه‌های ۱۳۰/۱۶، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶ و یک نمونه با سه آلل به اندازه های ۱۰۱/۵۳، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶، مشخص نموده است.

آغازگر DPL513 برای رقم خرداد (تیپ- کرک سفید) سه آلل به اندازه‌های۵۳ /۱۰۱، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶، در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز) از هشت نمونه، یک نمونه با سه آلل به اندازه‌های۱۰۱/۵۳، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶ وهفت نمونه با سه آلل به اندازه‌های ۹۵/۴۲، ۱۳۰/۱۶، ۱۵۱/۰۸، در نمونه خارج از تیپ (بدون کرک) از ۱۰ نمونه، هشت نمونه با سه آلل ۱۰۱/۵۳، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶ و یک نمونه با سه آلل به اندازه های، ۹۵/۴۲، ۱۳۰/۱۶، ۱۵۱/۰۸و یک نمونه با سه آلل به اندازه های۱۳۰/۱۶، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶، در نمونه مخلوط، از ۱۲ نمونه، هشت نمونه با سه آلل به اندازه‌های ۱۰۱/۵۳، ۱۵۱/۰۸، ۱۷۵/۳۶ و چهار نمونه با سه آلل به اندازه های ۱۱۰، ۱۵۵/۰۸، ۱۸۰/۳۶، مشخص نموده است (شکل ۲).



شکل ۲- بررسی خلوص ژنتیکی نمونه خالص(تیپ) و خارج از تیپ (کرک سبز و بدون کرک) با استفاده از آغازگر DPL-513. لدر ۵۰ جفت بازی (فرمنتاز).

2- Genetic purity analysis of Pure (type) sample and off-type (fuzzy green and naked seed) Figure samples using SSR primer DPL-513. 50 bp DNA ladder (Fermentas).

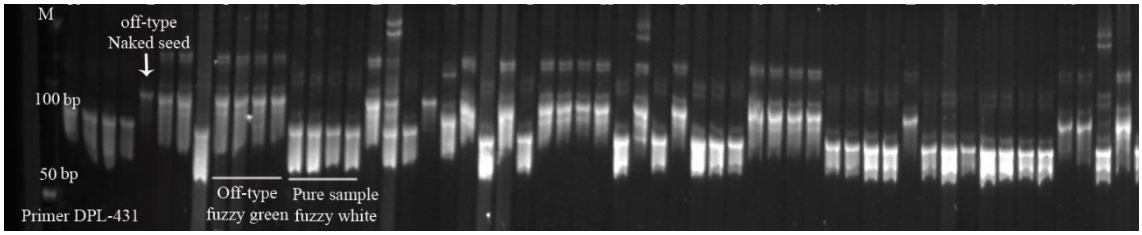
ایلچی و همکارانش به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط بین گونه‌های تجاری پنبه در ترکیه بین سال‌های ۱۹۶۴ تا ۲۰۱۴، ۹۶ رقم پنبه را با استفاده از نشانگرهای ملکولی از قبیل نشانگرهای DPL513, CIR246 و DPL431 با توجه به چند شکلی و قدرت تفکیک بین ارقام بررسی کردند و میانگین تنوع ژنتیکی و محتوای اطلاعات چند شکلی را به ترتیب ۰/۷۲۴، ۰/۷۴۹و ۰/۶۶۳ اعلام نمودند (Elci, E., *et al*., 2014).

آغازگر DPL431 برای رقم ورامین (تیپ- کرک سفید) دو آلل به اندازه های ۷۱/۲۱، ۱۰۰/۸، در نمونه خارج از تیپ (کرک سبز) از ۱۲ نمونه، پنج نمونه با دو آلل به اندازه‌های ۷۱/۲۱، ۱۰۰/۸ وچهار نمونه با دو آلل به اندازه های ۸۷/۰۹، ۱۴۰/۱۶و یک نمونه با چهار آلل ۱۰۰/۸، ۱۱۶/۷۲، ۱۴۰/۱۶، ۱۴۸/۰۷، در نمونه خارج از تیپ (بدون کرک) از چهار نمونه، سه نمونه با دو آلل به اندازه‌های ۷۱/۲۱، ۱۰۰/۸ و ۱ نمونه با چهار آلل به

انـدازه‌هـای، ۱۰۰/۴۲۸، ۱۱۶/۷۲، ۱۴۰/۱۶، ۱۴۸/۰۷، در نمونه مخلوط، از هشـــت نمونه، هشـــت نمونه با دو آلل به اندازه‌های ۷۱/۲۱، ۱۰۰/۸، مشخص نموده است.

آ غازگر DPL431 برای رقم بختگان (تیپ- کرک ســـفید) دو آ لل به ا ندازه های ۷۱/۲۱، ۱۰۰/۸، در نمو نه خارج از تیپ (کرک ســبز) از چهار نمونه، دو نمونه با دو آلل به اندازه‌های ۷۱/۲۱، ۱۰۰/۸ ودو نمونه با چهار آلل به انـدازه‌هـای ۱۰۰/۴۲۸، ۱۱۶/۷۲، ۱۴۰/۱۶، ۱۴۸/۰۷، در نمونه خارج از تیپ (بدون کرک) از چهار نمونه، سه نمونه با دو آلل به اندازه‌های ۷۱/۲۱، ۱۰۰/۸ و یک نمونه با چهار آلل به اندازه‌های، ۱۰۰/۴۲۸، ۱۱۶/۷۲، ۱۴۰/۱۶، ۱۴۸/۰۷، در مخلوط، از چهار نمونه، دو نمونه با دو آلل به اندازه‌های ۷۱/۲۱، ۱۰۰/۸، دو نمو نه با دو آ لل به ا ندازه های ۶۵/۵، ۱۰۰/۸مشخص نموده است.

آغازگر DPL431 برای رقم خرداد(تیپ- کرک سفید) دو آلل به اندازه‌های ۷۱/۲۱، ۱۰۰/۸، در نمونه خارج از تیپ (کرک ســـبز) از ۱۲ نمونـه، پنج نمونـه بـا دو آلـل بـه اندازه‌های ۷۱/۲۱، ۱۰۰/۸ وچهار نمونه با دو آلل به اندازه‌های ۸۷/۰۹، ۱۴۰/۱۶و یک نمونه با چهار آلل ۱۰۰/۸، ۱۱۶/۷۲، ۱۴۰/۱۶، ۱۴۸/۰۷، در نمونه خارج از تیپ (بدون کرک) از چهار نمونه، سه نمونه با دو آلل به اندازه‌های ۷۱/۲۱، ۱۰۰/۸ و یک نمونه با چهار آلل به اندازه‌های، ۱۰۰/۴۲۸، ۱۱۶/۷۲، ۱۴۰/۱۶، ۱۴۸/۰۷، در نمونه مخلوط، از هشت نمونه، هشت نمونه با دو آلل به اندازه‌های ۷۱/۲۱، ۱۰۰/۸، مشخص نموده است (شکل ۳).



شکل ۳- بررسی خلوص ژنتیکی نمونه خالص (تیپ) و خارج از تیپ (کرک سبز و بدون کرک) با استفاده از آغازگر DPL-431. لدر ۵۰ جفت بازی (فرمنتاز).

Figure 3- Genetic purity analysis of Pure (type) sample and off-type (fuzzy green and naked seed) samples using SSR primer DPL-431. 50 bp DNA ladder (Fermentas).

نتیجه‌گیری کلی

بـه طور کلی نتـایج این تحقیق مشـــخص کرد کـه نمونه‌های خارج از تیپ (کرک سبز و بدون کرک) از نظر صـــفات ریخت‌شـــناختی، با نمونه خالص (تیپ –کرک سفید) متمایز بوده و میتوان از صفت کیفی موقعیت کلاله به پرچم در تشـــخیص تیپ از خارج از تیپ قبل از بســـتن غوزه‌ها برای خالص ســـازی مزرعه اســـتفاده کرد. همچنین صـفات درجه شـکفتگی غوزه نیز صـفت بسـیار مشـهودی برای تشـخیص کرک سـبز از کرک سـفید می‌باشـد. کلید شناسایی رقم ورامین، خرداد و بختگان با استفاده از نشانگر ملکولی SSR مشخص شد و با توجه به آلل‌های تولید شده در نمونه‌های مشـکوک به اختلاط مشـخص شـد که بذور خارج از تیپ کرک سبز و بدون کرک در مقایسـه با رقم خالص، از نظر ژنتیکی متفاوت بوده و ادعای مالک رقم باطل می‌با شد. با توجه به گران بودن روش ملکولی، روش تعیین خلوص ژنتیکی بر اســـاس آزمون رشـــدی مزرعه (GOT) بر اساس صفات ریخت‌شناسی و روش ملکولی به عنوان روش تکمیلی تو صیه می شود. به منظور د ستیابی به خلوص ژنتیکی علاوه بر خارج کردن بو ته های خارج از

تیپ در مزرعه، شناسایی چشمی توده بذر برداشت شده از مزرعه و جداسازی بذرهای خارج از تیپ در هسته‌های اولیه رقم پیشنهاد می‌شود.

منابع Reference

Agrawal, P.K.1992. Cultivar purity. Pp170-178. In: Seed Sci. Technol., South Asian Pub. PVT. LTD. New Delhi, India.

Agrawal, R.L. 1997. Determination of genuiness of varieties, In: Seed technol. (2 nd. Ed.), pp: 499-513. Oxford & IBH Pub. Co. Pvt. Ltd., India.

Agrawal, P.K. 2002. Cultivar purity test, In: Principles of seed technol, pp: 96-104. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, India.

ELÇİ, E., Y. AKIŞCAN, and B. AKGÖL. 2014. "Genetic diversity of Turkish commercial cotton varieties revealed by molecular markers and fiber quality traits." Turk. J. Bot. 38(6): 1274-1286. Doi: 10.3906/bot-1405-78

Hamidi, A., J. Rezazadeh, V. Askari, F. Hassanpour, F. Moghimian, M. Jazaeri Noosh Abadi, and E. Baniani. 2011. Identification and registration of Cotton (Gossypium hirsutum L.) cultivars by using morphological charactristics. Research project final report. Ministry of Jihad–e Agriculture Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Seed and Plant Certification and Registration Institute (SPCRI), Registration No.: 89/1761. Doi: 10.22092/IJCR.2017.115571. (In Persian, with English Abstract)

Hamidi, A., O. Alishah, M.R. Rahemi, A. Mohajer Abbasi, Y. Jafari, J. Hoseinpoor, K. Ghasemi Bezdi, M. Jazaeri Noosh Abadi, and M. Najafian. 2022. Evaluation of some quantitative and qualitative characteristics of six newly introduced genotypes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Iranian J. Cotton Res. 9(2): 179-201. Doi: 10.22092/ijcr.2022.359154.1184. (In Persian, with English Abstract)

Jeevan Kumar, S.P., C. Susmita, D. K. Agarwal, G. Pal., A. Kumar Rai, and J. Simal-Gandara. 2021. Assessment of genetic purity in rice using polymorphic SSR markers and its economic analysis with grow-out-test. Food Anal. Methods. 14(5): 856-864. Doi: 10.1007/s12161-020-01927-9

Kumar, P., S. Nimbal, N. Budhlakoti, V. Singh, and R.S. Sangwan. 2022. Genetic diversity and population structure analysis for morphological traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). J. Appl. Genet. 63(1):.87-101. Doi: 10.1007/s13353-021-00667-8

Li, YC., A.B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Mol. Ecol. 11(12):2453–2465. Doi: 10.1046/j.1365-294x.2002.01643.x

Ministry of Jihad-e-Agriculture, 2022. Crops area, production and yield report in 2020-21 crop year. Information and Communication Technology Center of Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran. (In Persian)

Mozafari, J., S.Y. Sadeghian, S. Mobasser, H. Khademi, and S.A. Mohammadi. 2010. Principles of plant variety protection. Ministry of Jihad-e-Agriculture Agricultural Research Education and Extensions Organization (AREEO), Seed and Plant Certification and Registration Institute (SPCRI), Tehran, Iran. (In Persian)

Noormohammadi, Z., Y. Hasheminejad-Ahangarani Farahani, M. Sheidai, S. Ghasemzadeh-Baraki, and O. Alishah. 2013. Genetic diversity analysis in Opal cotton hybrids based on SSR, ISSR, and RAPD markers. Genet. Mol. Res. 12(1): 256-269. Doi: 10.4238/2013.January.30.12

Rana M. K., S. Singh, K.V. Bhat. 2007. RAPD, STMS and ISSR markers for genetic diversity and hybrid seed purity testing in cotton. Seed Sci. Technol. 35(3):709–721. Doi: 10.15258/sst.2007.35.3.17

Saeed, A., and E. Elçi., 2018. "Microsatellite-based characterization of cotton genotypes for verticillium wilt and fiber quality traits." Turkish J. Biochem. 43(3): 277-288. Doi: 10.1515/tjb-2017-0169

Saghai-Maroof, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen, and R.W.L. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. 81(24): 8014-8018.

Saleem MA, M.W. Amjid, M.Q. Ahmad, H. Riaz, S.F. Arshad, Z.U. Zia. 2020. EST-SSR based analysis revealed narrow genetic base of in-use cotton varieties of pakistan. Pakistan J. Bot. 52(5): 1667-1672. Doi: 10.30848/PJB2020-5(32)

Santosh, H.B., A. Bargat, V. Santhy, K.P. Raghavendra, K.R. Kranthi, and V.N. Waghmare. 2022. Microsatellite marker based DNA fingerprinting of cotton (Gossypium spp.) hybrids and their parents. Electron. J. Plant Breed. 13(3): 780-789. Doi: 10.37992/2022.1303.136

Silvanacristae, S.M., J.F.M. Moistsai, M.A. Valls, A. Marcos, and C.R. Lopes. 2005. Genetic characterization of Brazilian annual Arachis species from selections Arachis and heteranthae using RAPD markers. Genet. Resour. Crop. Ev. 52(8): 1079-1086. Doi: 10.1007/s10722-004-6098-9

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(1):186-192. Doi: 10.2135/cropsci1996.0011183X003600010033x

Tyagi P, M.A. Gore, D.T. Bowman, B.T. Campbell, J.A. Udall, and V. Kuraparthy. 2014. Genetic diversity and population structure in the US Upland cotton (Gossypium hirsutum L.). Theor. Appl. Genet. 127(2): 283-295. Doi: 10.1007/s00122-013-2217-3

UPOV (International Union for the Protection of new Varieties of Plants). 2018. Guidelines for the conduct of tests for Distinctness, Uniformity and Stability in Cotton. TG/88/7. Geneva, Switzerland.

Zhang YC, M. Kuang, W.H. Yang, H.X. Xu, D.Y. Zhou, Y.Q. Wang, X.A. Feng, C. Su, and F. Wang. 2013. Construction of a primary DNA fingerprint database for cotton cultivars. Genet. Mol. Res. 12(2):1897-1906. Doi: 10.4238/2013.January.30.3