



Molecular Markers and Their Applications in Cotton Breeding: Advances and Future Perspectives

Bahman Panahi^{1*}, Rasmieh Hamid², Zahra Ghorbanzadeh³

¹ Department of Genomics, Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran, Email: panahi.lahroodi@gmail.com

² Department of Plant Breeding, Cotton Research Institute of Iran (CRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran

³ Department of Bioinformatics and Ai, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Full Paper	Background and Objectives: Cotton (<i>Gossypium spp.</i>), as the most important source of natural fibres and one of the world's strategic crops, plays a vital role in global economic security and sustainable agricultural systems. Nevertheless, genetic improvement of cotton remains challenging due to the complex inheritance of key quantitative traits such as yield, fibre quality, and resistance to biotic and abiotic stresses. These traits are typically governed by multiple loci, influenced by gene–gene and gene–environment interactions, and further complicated by the polyploid nature of the cotton genome. Consequently, conventional breeding approaches, although effective, are often slow and limited in their capacity to deliver rapid and precise genetic gains. This review aims to synthesise recent advances in molecular marker technologies and their applications in cotton breeding, with particular emphasis on QTL mapping, genome-wide association studies (GWAS), and the integration of multi-omics approaches.
Article history: Received: 2025-05-27 Accepted: 2025-12-08	
Keywords: Molecular markers Cotton breeding QTL mapping GWAS Marker-assisted selection (MAS)	Results: The development and application of molecular markers, including simple sequence repeats (SSR), amplified fragment length polymorphisms (AFLP), single nucleotide polymorphisms (SNP), and next-generation sequencing (NGS)-based platforms, have substantially transformed cotton breeding and genomics research. These marker systems have enabled high-density genotyping, accurate assessment of genetic diversity, and the construction of saturated linkage maps, thereby facilitating precise quantitative trait locus (QTL) mapping. GWAS approaches, exploiting diverse germplasm collections and dense SNP datasets, have further expanded the identification of QTLs and candidate genes associated with economically important traits such as fibre length, strength, uniformity, yield components, and tolerance to drought, salinity, and other environmental stresses. Beyond single-layer genomic analyses, the integration of multi-omics data including transcriptomics, metabolomics, and proteomics has provided a systems-level understanding of gene regulatory networks and molecular pathways underlying complex traits in cotton. Such integrative strategies have

significantly enhanced QTL resolution, improved the identification of functional candidate genes, and facilitated the dissection of polygenic trait architecture. These advances have opened new opportunities for the simultaneous improvement of yield, fibre quality, and stress tolerance through molecular breeding. Despite these achievements, the routine implementation of marker-assisted selection (MAS) and genomic selection (GS) in cotton breeding programmes remains constrained by several challenges. These include the limited availability of allele-specific markers, the presence of homoeologous gene copies in the polyploid genome, environmental instability of QTL effects, and the relatively high costs associated with large-scale genotyping and phenotyping. Addressing these constraints is essential for translating genomic discoveries into practical breeding outcomes.

Conclusion: This review provides a comprehensive and systematic overview of the progress, applications, and limitations of molecular markers in cotton breeding. It highlights the transformative potential of combining molecular marker technologies with QTL mapping, GWAS, and multi-omics approaches to accelerate the development of high-yielding, fibre-quality-enhanced, and stress-resilient cotton cultivars. The integration of these advanced genomic tools is expected to bridge the gap between gene discovery and practical breeding, offering a robust framework for precise and targeted cotton improvement. Ultimately, such strategies will contribute to sustainable cotton production and long-term global fibre security.

Cite this article: Panahi, B., Hamid, R., Ghorbanzadeh, Z. (2025). Molecular Markers and Their Applications in Cotton Breeding: Advances and Future Perspectives. *Iranian Journal Cotton Researches*, 13 (1), 101-124.



© The author(s)



10.22092/ijcr.2025.371630.1249

Publisher: Cotton Research Institute of Iran



نشانگرهای مولکولی و کاربردهای آن‌ها در اصلاح پنبه: پیشرفت‌ها و چشم‌اندازهای آینده

بهمن پناهی^{۱*}، رسمیه حمید^۲، زهرا قربانزاده^۳

^۱ گروه ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب و غرب کشور، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران، رایانامه: panahi.lahroodi@gmail.com

^۲ بخش بهنژادی، موسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.

^۳ بخش زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی-پژوهشی	سابقه و هدف: پنبه به‌عنوان مهم‌ترین منبع الیاف طبیعی و یکی از گیاهان زراعی راهبردی جهان، نقش کلیدی در امنیت اقتصادی و کشاورزی پایدار دارد. با این حال، پیچیدگی ژنتیکی صفات کمی حیاتی مانند عملکرد، کیفیت الیاف و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، ناشی از پلی‌پلوئیدی ژنوم و تعامل پیچیده چندین ژن، روند اصلاح این گیاه را دشوار کرده است.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۸	یافته‌ها: توسعه و به‌کارگیری نشانگرهای مولکولی، از جمله SNP، AFLP، SSR و سامانه‌های مبتنی بر توالی‌یابی نسل‌جدید (NGS)، امکان ژنوتایپینگ با تراکم بالا، شناسایی تنوع ژنتیکی و نقشه‌برداری QTL را فراهم کرده است. مطالعات GWAS در پنبه، با بهره‌گیری از جمعیت‌های متنوع و داده‌های ژنوتایپی با تراکم بالا، تعداد زیادی QTL و ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات کمی مهم را شناسایی کرده‌اند. همچنین، ادغام داده‌های چنداومیک شامل ترنسکریپتومیک، متابولومیک و پروتئومیک با ژنوتایپینگ، امکان تحلیل شبکه‌های ژنی و مسیرهای مولکولی مرتبط با صفات کلیدی پنبه را فراهم کرده است. این پیشرفت‌ها قدرت تفکیک QTL و شناسایی ژن‌های هدفمند برای اصلاح مولکولی را به‌طور چشمگیری افزایش داده‌اند و امکان بهبود عملکرد، کیفیت الیاف و مقاومت به تنش‌ها را همزمان فراهم کرده‌اند. با وجود این دستاوردها، کاربرد عملی MAS و انتخاب ژنومی (GS) هنوز با چالش‌هایی مانند محدودیت نشانگرهای آلل‌اختصاصی، پیچیدگی همولوگ‌ها و هزینه‌های بالای ژنوتایپینگ مواجه است.
واژه‌های کلیدی: نشانگرهای مولکولی اصلاح پنبه نقشه‌برداری QTL مطالعات ارتباطی سراسر ژنوم (GWAS) انتخاب مبتنی بر نشانگر (MAS)	نتیجه‌گیری: این مقاله با مرور نظام‌مند پیشرفت‌ها، کاربردها و محدودیت‌های نشانگرهای مولکولی در اصلاح پنبه، چشم‌انداز بهره‌گیری از ابزارهای ژنومی پیشرفته برای تسریع توسعه ارقام پربازده، پایدار و مقاوم به تنش‌ها را ارائه می‌دهد و افق‌های نوینی را برای اصلاح هدفمند و دقیق پنبه باز می‌کند.

استناد: پناهی، بهمن؛ حمید، رسمیه؛ قربانزاده، زهرا (۱۴۰۴). نشانگرهای مولکولی و کاربردهای آنها در اصلاح پنبه: پیشرفت‌ها و چشم‌اندازهای آینده. *مجله پژوهش‌های پنبه/ ایران*، ۱۳ (۱)، ۱۰۱-۱۲۴.



10.22092/ijcr.2025.371630.1249

© نویسندگان

ناشر: موسسه تحقیقات پنبه کشور



مقدمه

پنبه (*Gossypium* spp) مهم‌ترین منبع الیاف طبیعی در جهان است و نقشی راهبردی در اقتصاد کشاورزی، زنجیره تأمین الیاف و صنایع وابسته دارد (کابیش و همکاران، ۲۰۲۴). این گیاه به‌ویژه در صنعت نساجی جایگاهی برجسته دارد، زیرا الیاف آن با ویژگی‌هایی چون استحکام کششی مناسب، قابلیت تعریق‌پذیری، جذب رطوبت مطلوب و ماهیت هیپوآلرژیک، کاربرد وسیعی در تولید پوشاک و منسوجات صنعتی دارد. علاوه بر الیاف، پنبه‌دانه نیز به‌عنوان یک دانه روغنی مهم شناخته می‌شود (حمید و همکاران، ۲۰۱۸). در حال حاضر، پنبه‌دانه در رتبه پنجم تولید جهانی دانه‌های روغنی قرار دارد و با دارا بودن ۲۵ تا ۳۰ درصد روغن و سهم قابل‌توجهی از پروتئین، در صنایع غذایی، خوراک دام، فرآوری کنجاله و تولید روغن‌های خوراکی نقشی کلیدی ایفا می‌کند. این ویژگی‌ها موجب شده‌اند که پنبه به‌عنوان یک محصول چندمنظوره و راهبردی، نه تنها از لحاظ اقتصادی، بلکه از نظر امنیت صنعتی و رقابت‌پذیری زنجیره ارزش الیاف برای بسیاری از کشورهای تولیدکننده اهمیت ویژه‌ای داشته باشد (گاگاری و همکاران، ۲۰۲۵). علاوه بر اهمیت جهانی، پنبه در نظام‌های کشاورزی ملی، به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه، از جایگاه اقتصادی، اجتماعی و صنعتی برخوردار است.

در ایران، پنبه به‌عنوان یک محصول صنعتی و استراتژیک، سهم مهمی در اقتصاد کشاورزی، صنایع نساجی و اشتغال روستایی دارد (حمید و همکاران، ۲۰۲۲). استان‌های گلستان، خراسان رضوی، خراسان جنوبی، فارس و سمنان از جمله مناطق اصلی تولید پنبه در کشور هستند (وزارت جهاد کشاورزی، ۱۴۰۲). با وجود نقش تاریخی ایران در تأمین مواد اولیه صنایع داخلی، عواملی همچون تغییر الگوی کاشت، محدودیت منابع آب، رقابت با محصولات با ارزش اقتصادی بالاتر و نوسانات بازار جهانی، منجر به کاهش سطح زیرکشت پنبه در دهه‌های اخیر شده است (حمیدی و همکاران، ۲۰۲۵). با این حال، اجرای برنامه‌های احیای کشت،

توسعه ارقام متحمل به خشکی و شوری، بهبود مدیریت زراعی و گسترش کشاورزی قراردادی، در سال‌های اخیر روندی نسبتاً افزایشی در تولید پنبه ایجاد کرده است (فغانی و همکاران، ۲۰۲۵). با وجود این تلاش‌های مدیریتی و زراعی، پایداری و افزایش تولید پنبه در بلندمدت، بدون اتکا به ظرفیت‌های ژنتیکی این گیاه امکان‌پذیر نخواهد بود.

جنس *Gossypium* شامل ۵۲ گونه شناخته‌شده است که ۷ گونه تتراپلوئید (AD) و ۴۵ گونه دیپلوئید را در قالب هشت ژنوم مستقل A تا K در بر می‌گیرد (شکل ۱). گونه‌های جدید شناسایی‌شده مانند *G. anapoides*، *Gossypium ekmanianum* و *G. stephensii* دارای تنوع ژنتیکی چشمگیر و آلل‌های منحصربه‌فرد هستند که می‌توانند فرصت‌های ارزشمندی برای شناسایی ژن‌ها و نواحی ژنومی مرتبط با صفات کمی پیچیده، به‌ویژه کیفیت الیاف و تحمل به تنش‌ها فراهم کنند (گراور و همکاران، ۲۰۱۵). استفاده هدفمند از این منابع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی، نقش مهمی در غنی‌سازی ژرم‌پلاس، کاهش فرسایش ژنتیکی و افزایش پایداری تولید پنبه ایفا می‌کند. درک ساختار ژنومی و تاریخچه تکاملی گونه‌های زراعی، پیش‌نیاز بهره‌برداری مؤثر از این تنوع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی است.

گونه‌های زراعی پنبه عمدتاً شامل دو گونه دیپلوئید *G. arboreum* و *G. herbaceum* با ژنوم A و دو گونه آلوتتراپلوئید *G. hirsutum* و *G. barbadense* با ژنوم AD هستند. تتراپلوئیدهای زراعی امروزی پنبه حدود ۱ تا ۲ میلیون سال پیش در نتیجه دورگ‌گیری طبیعی بین گونه‌های اجدادی با ژنوم‌های A و D شکل گرفته‌اند (شکل ۱). این رویداد آلوپلی‌پلوئیدی منجر به ادغام دو ژنوم متمایز و ایجاد پیچیدگی ژنتیکی بالا در سطوح ساختاری، عملکردی و تنظیمی شد. پنبه آپلند (*G. hirsutum*) حدود ۹۵٪ از تولید جهانی پنبه را به خود اختصاص می‌دهد و به‌دلیل گستره وسیع تنوع فنوتیپی و سازگاری اکولوژیک، به‌عنوان یک سیستم مدل برای شناسایی QTL‌های مرتبط با عملکرد، کیفیت الیاف و مقاومت به تنش‌های زیستی و

غیرزیستی شناخته می‌شود. با این حال، فشار انتخابی ناشی از اهلی‌سازی و اصلاح کلاسیک موجب کاهش قابل توجه تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاس‌های زراعی شده است؛ از این رو، بهره‌گیری از گونه‌های وحشی و دیپلوئید به‌عنوان مخزن آلل‌های مطلوب، ضرورتی اجتناب‌ناپذیر در اصلاح مولکولی پنبه محسوب می‌شود (شاهین و همکاران، ۲۰۱۲). این کاهش تنوع ژنتیکی، چالش اصلی در بهبود صفات کمی بوده و مستقیماً ضرورت به‌کارگیری ابزارهای مولکولی پیشرفته را برجسته می‌سازد.

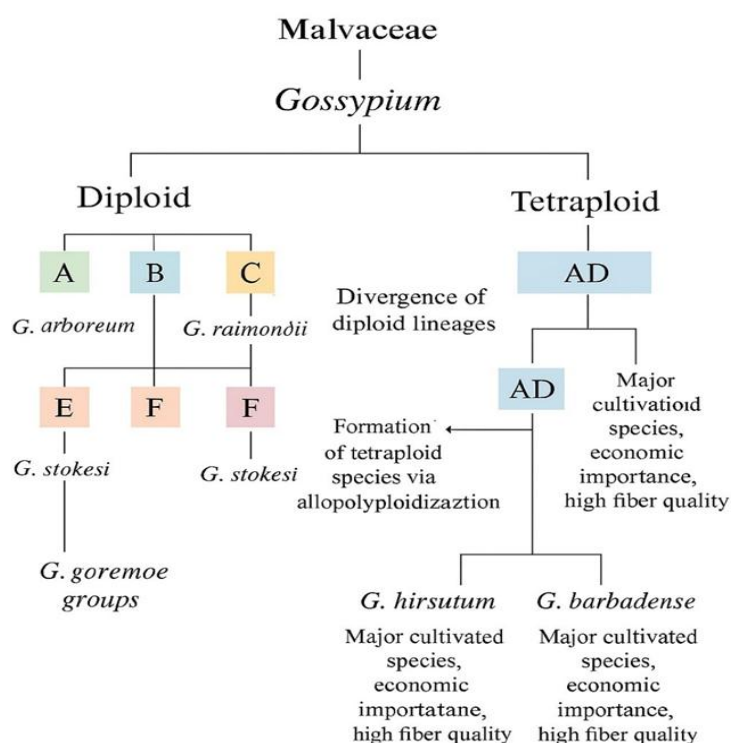
با توجه به ماهیت پلی‌ژنیک و کمی صفاتی نظیر عملکرد، کیفیت الیاف و مقاومت به تنش‌های محیطی، استفاده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی پنبه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (شه‌بازی و همکاران، ۲۰۲۵). فناوری‌های ژنوتایپینگ با تراکم بالا مانند SNP-array و GBS امکان شناسایی هزاران نشانگر در سراسر ژنوم را فراهم کرده و بستر مناسبی برای برقراری ارتباط دقیق‌تر میان ژنوتیپ و فنوتیپ ایجاد می‌کنند (جیکوب و همکاران، ۲۰۲۲). مطالعات نقشه‌برداری QTL و مطالعات ارتباط ژنومی گسترده (GWAS) با تکیه بر این نشانگرها، امکان شناسایی نواحی ژنومی پایدار، آلل‌های مطلوب و ژن‌های کلندید مؤثر بر صفات پیچیده را فراهم می‌سازند (الطف و همکاران، ۲۰۲۴). افزون بر این، رویکردهای نوین نظیر انتخاب ژنومی (Genomic Selection) با بهره‌گیری از مدل‌های پیش‌بینی مبتنی بر کل ژنوم، امکان افزایش سرعت پیشرفت ژنتیکی، کاهش چرخه اصلاح و بهینه‌سازی تصمیم‌گیری اصلاحی را فراهم می‌کنند. اهمیت این رویکردهای نوین زمانی برجسته‌تر می‌شود که چالش‌های آینده تولید پنبه در مقیاس جهانی مدنظر قرار گیرد.

افزایش تقاضای جهانی برای محصولات پنبه تا سال ۲۰۳۰ حدود ۱۰۲٪ پیش‌بینی شده است؛ موضوعی که در کنار محدودیت اراضی قابل کشت، کاهش منابع آب و تشدید اثرات تغییرات اقلیمی،

چالش‌های جدی برای تولید پایدار این محصول ایجاد می‌کند (ژانگ و همکاران، ۲۰۲۳). نرخ پیشرفت ژنتیکی عملکرد پنبه در تراکم‌های متداول کاشت، بین ۷/۱ تا ۸/۷ کیلوگرم در هکتار در سال برآورد شده است که عمدتاً حاصل روش‌های اصلاح کلاسیک و به‌کارگیری فناوری‌های زیستی است (قربانزاده و همکاران، ۲۰۲۵). با این حال، برای حفظ و تسریع این روند پیشرفت ژنتیکی و مقابله با کاهش تنوع ژنتیکی، بهره‌گیری از رویکردهای نوین ژنومی، ادغام داده‌های چندآمیکس و استراتژی‌های اصلاح ژنومی پیشرفته ضروری به نظر می‌رسد (رحمانوف و همکاران، ۲۰۲۴). حمید و همکاران، ۲۰۲۶). هدف این مطالعه، ارائه تحلیلی جامع از وضعیت ژنتیکی و اصلاحی پنبه در ایران و جهان است. در این راستا، نقش نشانگرهای DNA، مطالعات QTL، GWAS و رویکردهای ژنومیک در شناسایی فرصت‌ها و محدودیت‌های بهبود عملکرد، کیفیت الیاف و مقاومت به تنش‌های محیطی بررسی شده و چشم‌اندازی برای توسعه برنامه‌های اصلاحی کارآمد و پایدار ارائه می‌شود.

نشانگرهای مولکولی و نقش آن‌ها در اصلاح پنبه:

در دو دهه اخیر، پیشرفت‌های شگرف در فناوری‌های توالی‌یابی و ژنومیکس، افق‌های جدیدی در شناسایی ژن‌ها و نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات اقتصادی پنبه گشوده است (حمید و همکاران، ۲۰۲۵). پناهی و همکاران، ۲۰۲۵). نشانگرهای ژنتیکی، قطعات خاصی از DNA هستند که به مکان‌های مشخصی در کروموزوم‌ها یا ژن‌ها متصل می‌شوند و تفاوت‌های ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها یا گونه‌های گیاهی را با دقت بالا آشکار می‌کنند (تولسانی و همکاران، ۲۰۲۰). این نشانگرها ابزارهای قدرتمندی برای به‌نژادگران فراهم می‌آورند تا فرآیند انتخاب را از سطح فنوتیپ به سطح ژنوتیپ ارتقا داده و بدین‌ترتیب بسیاری از محدودیت‌های اصلاح کلاسیک، از جمله تأثیرپذیری از محیط و طولانی بودن چرخه اصلاح، را برطرف کنند.



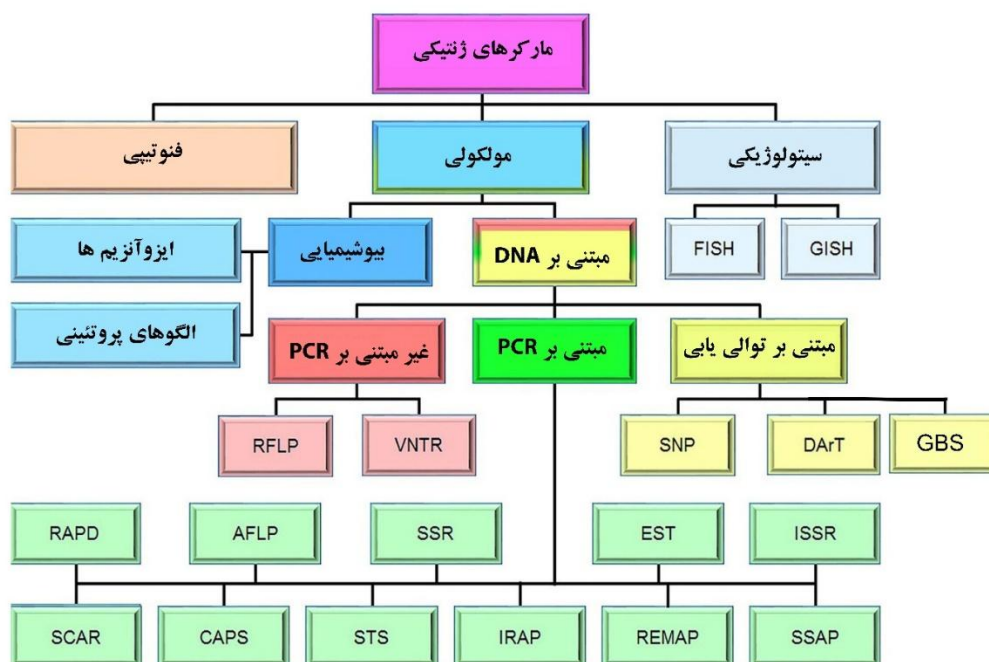
شکل ۱. روابط تکاملی جنس *Gossypium* و تفکیک گونه‌های دیپلوئید ژنوم‌های A-G و K و تتراپلوئید (AD)، و منشأ آلپولی‌پلوئیدی گونه‌های زراعی *G. hirsutum* و *G. barbadense*.

مولکولی مدرن پنبه شناخته می‌شوند. نشانگرهایی مانند AFLP، SSR و به‌ویژه SNP، به دلیل دقت بالا، فراوانی زیاد در ژنوم، استقلال از شرایط محیطی و قابلیت اتوماسیون، کاربرد گسترده‌ای در برنامه‌های اصلاحی دارند (شکل ۲) (دزی و همکاران، ۲۰۲۱).

برتری نشانگرهای DNA، زمینه را برای استفاده گسترده آنها در شناسایی پایه ژنتیکی صفات کمی پیچیده فراهم کرده است. کاربرد نشانگرهای مولکولی در اصلاح پنبه عمدتاً به شناسایی QTL‌های مرتبط با صفات کلیدی مانند کیفیت الیاف، عملکرد و مقاومت به تنش‌های محیطی معطوف است. صفات پیچیده‌ای نظیر طول، استحکام و یکنواختی الیاف یا مقاومت به بیماری‌ها معمولاً تحت کنترل چندین ژن با اثرات کوچک و برهم‌کنش‌های پیچیده با محیط قرار دارند (بوپائی و همکاران، ۲۰۲۵). از این‌رو، روش‌های اصلاحی سنتی مبتنی بر ارزیابی فنوتیپی، زمان‌بر، پرهزینه و دارای دقت محدود هستند. در مقابل، نشانگرهای مولکولی پیوسته با QTL‌ها به به‌زادگران

نشانگرهای ژنتیکی به‌طور کلی به سه دسته اصلی تقسیم می‌شوند: الف) نشانگرهای مورفولوژیکی: این نشانگرها ویژگی‌های فنوتیپی قابل مشاهده‌ای هستند که بدون نیاز به تکنیک‌های مولکولی ارزیابی می‌شوند. با این حال، نشانگرهای مورفولوژیکی معمولاً به‌شدت تحت تأثیر شرایط محیطی و برهم‌کنش ژنوتیپ × محیط قرار دارند و به دلیل دقت پایین در تفکیک تفاوت‌های ژنتیکی، کاربرد آنها در برنامه‌های اصلاحی مدرن بسیار محدود است. ب) نشانگرهای بیوشیمیایی: این دسته شامل پروتئین‌ها و ایزوزیم‌ها است که از طریق روش‌هایی مانند الکتروفورز، تفاوت‌های ژنتیکی را شناسایی می‌کنند. ایزوزیم‌ها واریانت‌های آنزیمی هستند که می‌توانند اطلاعاتی درباره تنوع ژنتیکی فراهم کنند، اما تعداد محدود جایگاه‌ها، پوشش ژنومی کم و وابستگی نسبی به مرحله رشد از محدودیت‌های اساسی آنها به‌شمار می‌رود. ج) نشانگرهای مولکولی DNA: این نشانگرها تنوع ژنتیکی را مستقیماً در سطح ژنوم شناسایی می‌کنند و به‌عنوان ستون فقرات اصلاح

این امکان را می‌دهند که ژنوتیپ‌های مطلوب را در مراحل اولیه رشد و حتی پیش از بروز کامل فنوتیپ شناسایی و انتخاب کنند (عبدارحمانوف، ۲۰۱۱).



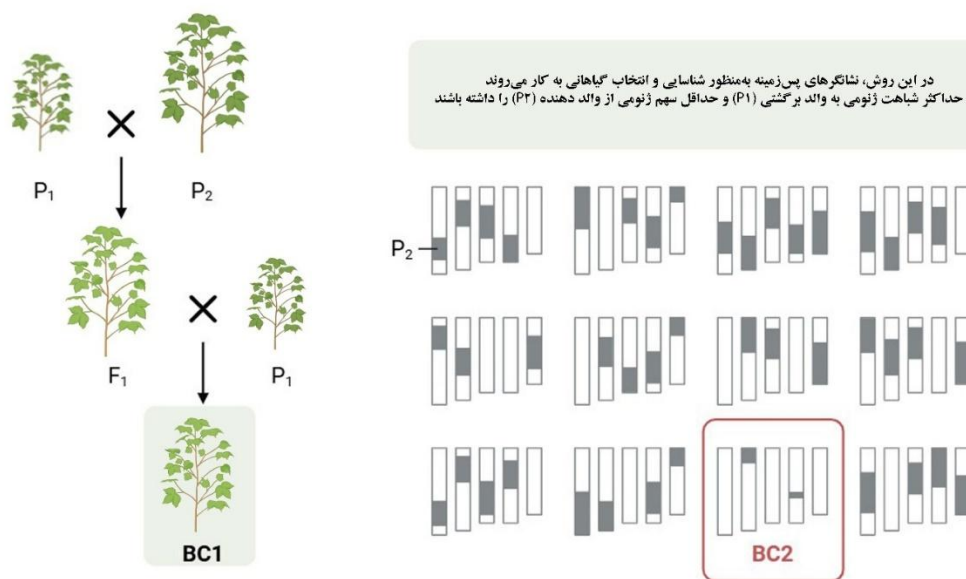
شکل ۲. طبقه‌بندی نشانگرهای ژنتیکی و مولکولی مورد استفاده در اصلاح پنبه و جایگاه نشانگرهای مبتنی بر DNA و توالی‌یابی.

در این چارچوب، MAS و انتخاب ژنومی به‌عنوان دو راهبرد مکمل در اصلاح مولکولی پنبه مطرح می‌شوند. انتخاب مبتنی بر نشانگر (MAS) و انتخاب ژنومی (Genomic Selection) مزایای متعددی برای به‌نژادگران پنبه فراهم می‌کنند. نخست، این رویکردها امکان انتخاب صفات مطلوب بدون نیاز به ارزیابی کامل فنوتیپی را فراهم می‌آورند که منجر به کاهش زمان، هزینه و افزایش کارایی چرخه اصلاح می‌شود. دوم، MAS امکان بهبود هم‌زمان صفات چندگانه و پیچیده‌ای مانند عملکرد، کیفیت الیاف و مقاومت به تنش‌ها را فراهم می‌سازد. سوم، استفاده از داده‌های ژنومی این امکان را فراهم می‌کند که آلل‌های مطلوب موجود در گونه‌های دیپلوئید و وحشی به‌طور هدفمند به ژرم‌پلاسما زراعی منتقل شوند و بدین ترتیب تنوع ژنتیکی حفظ و تقویت گردد (وسانتارو و همکاران، ۲۰۲۳). کاربرد عملی این رویکردها در مطالعات ژنومی پنبه، نتایج قابل توجهی داشته است. برای مثال، استفاده از نشانگرهای SNP در مطالعات GWAS

پیشرفت‌های فناوریانه در ژنوتایپینگ، قدرت تفکیک و مقیاس این مطالعات را به‌طور چشمگیری افزایش داده است. ظهور فناوری‌های پیشرفته توالی‌یابی نسل جدید، مانند SNP-array و Genotyping-by-Sequencing (GBS)، امکان آنالیز هم‌زمان هزاران تا میلیون‌ها نشانگر را در سراسر ژنوم فراهم کرده و انجام مطالعات دقیق QTL-mapping و مطالعات ارتباط ژنومی گسترده (GWAS) را ممکن ساخته است (گائو و همکاران، ۲۰۲۵). این فناوری‌ها به شناسایی نواحی ژنومی پایدار مرتبط با صفات کمی کمک کرده و داده‌های با وضوح بالا برای انتخاب به‌کمک نشانگر (MAS) و انتخاب ژنومی فراهم می‌کنند. برخلاف رویکردهای کلاسیک ژنتیک کمی که اثر تجمعی جایگاه‌ها را بدون شناسایی دقیق آن‌ها مدل‌سازی می‌کنند، این روش‌ها امکان ردیابی مستقیم جایگاه‌های ژنومی و آلل‌های مطلوب را فراهم می‌سازند (تارون و همکاران، ۲۰۲۴).

شفاف تثبیت می‌کنند. این ویژگی در آنالیزهای DUS (تفاوت، یکنواختی و ثبات) اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا نشانگرهای مولکولی قادرند این سه مؤلفه را با دقتی به‌مراتب بالاتر از روش‌های فنوتیپی ارزیابی کنند (اکبری و همکاران، ۲۰۲۵). چنین رویکردی تضمین می‌کند که رقم جدید، ویژگی‌های منحصر به فرد خود را در نسل‌های متوالی حفظ کرده و از نظر ژنتیکی با ارقام موجود متمایز باشد. در مجموع، نشانگرهای مولکولی و فناوری‌های ژنوتایپینگ با تراکم بالا، شالوده اصلاح ژنومی پنبه را تشکیل می‌دهند (شکل ۳). این ابزارها همراه با رویکردهای MAS و انتخاب ژنومی، امکان طراحی برنامه‌های اصلاحی هدفمند، سریع و مبتنی بر داده‌های ژنومی را فراهم کرده و نقش کلیدی در توسعه ارقام پرمحصول، با کیفیت الیاف برتر و مقاوم به تنش‌های محیطی، به‌ویژه در شرایط تغییرات اقلیمی، ایفا می‌کنند.

روی *G. hirsutum* به شناسایی ژن‌ها و نواحی ژنومی مرتبط با طول، استحکام و یکنواختی الیاف منجر شده است (یانگ و همکاران، ۲۰۲۵)، در حالی که نقشه‌برداری QTL در جمعیت‌های دیپلوئید و تتراپلوئید، مناطقی از ژنوم مرتبط با تحمل خشکی، شوری و تنش‌های دمایی را آشکار ساخته است (ردی و همکاران، ۲۰۲۰). این اطلاعات زمینه توسعه مدل‌های انتخاب ژنومی و برنامه‌های MAS را فراهم می‌کنند و امکان دستیابی به پیشرفت ژنتیکی سریع‌تر و دقیق‌تر نسبت به اصلاح کلاسیک را مهیا می‌سازند. فراتر از اصلاح صفات زراعی، نشانگرهای مولکولی نقش مهمی در شناسایی و ثبت ارقام پنبه نیز ایفا می‌کنند. در فرآیند ثبت ارقام جدید و استقرار حقوق مالکیت معنوی، نشانگرهای مولکولی به‌ویژه SNP و SSR امکان شناسایی دقیق تفاوت‌های ژنتیکی میان ارقام را فراهم کرده و هویت ژنتیکی هر رقم را به‌طور



شکل ۳- شماتیک انتخاب به کمک نشانگر (MAS) در برنامه‌های اصلاح پنبه، شامل تلاقی، بک‌کراس‌های متوالی و گزینش ژنوتیپ‌های برتر بر اساس نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات هدف.

نشانگرهای DNA در پنبه: نمایه‌سازی DNA در گیاهان، به‌ویژه در پنبه، به‌عنوان یکی از ابزارهای پایه‌ای ژنتیک مولکولی، نقشی محوری در تحلیل ساختار ژنتیکی، مدیریت تنوع ژرم‌پلاسمی و شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات کمی پیچیده ایفا می‌کند. این نشانگرها در مقایسه با نشانگرهای مورفولوژیک، که به‌شدت تحت تأثیر شرایط محیطی و مرحله رشد قرار می‌گیرند، اطلاعاتی دقیق، پایدار و مستقل از محیط در سطح مولکولی ارائه می‌کنند. همین ویژگی سبب شده است که نشانگرهای DNA در برنامه‌های اصلاحی پنبه، به‌ویژه در شناسایی ژن‌های بازگرداننده باروری، ردیابی آلل‌های مطلوب و تفکیک لاین‌های اصلاحی، کارایی و دقت به‌مراتب بالاتری داشته باشند (کوشانوف و همکاران، ۲۰۲۱).

در این چارچوب، بهره‌برداری مؤثر از نشانگرهای DNA مستلزم شناخت دقیق الگوی تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم پنبه است. برای استفاده بهینه از تنوع ژنتیکی موجود، داشتن تصویری روشن و جامع از گستره این تنوع میان ژنوتیپ‌ها ضروری است. نشانگرهای مولکولی امکان شناسایی، مقایسه و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها را با دقت بالا فراهم می‌کنند و به‌عنوان ابزارهای کلیدی برای مهار پیچیدگی صفات پلی‌ژنی و افزایش نرخ پیشرفت ژنتیکی شناخته می‌شوند. گسترش سریع پایگاه‌های داده ژنومی در گونه‌های مختلف *Gossypium*، به‌ویژه پس از انتشار ژنوم‌های مرجع گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید، مسیر توسعه و کاربرد نشانگرهای DNA را هموار کرده است. این داده‌ها نه تنها دقت انتخاب مبتنی بر نشانگر (MAS) را افزایش می‌دهند، بلکه امکان ردیابی الگوهای وراثتی، شبیه‌سازی معماری ژنتیکی صفات کمی و طراحی برنامه‌های اصلاح ژنوم‌پایه را برای پژوهشگران فراهم می‌سازند (زو و همکاران، ۲۰۲۵، Zhang et al., 2015; Hu et al., 2019).

با توجه به تنوع گسترده فناوری‌های مولکولی، کارایی نشانگرهای DNA تا حد زیادی به ویژگی‌های ذاتی آن‌ها وابسته است. بر اساس گزارش مدهاماتی و

همکاران (۲۰۱۴)، یک نشانگر DNA ایده‌آل باید دارای ویژگی‌هایی از جمله پلی‌مورفیسم بالا، توان تفکیک دقیق هموزیگوت‌ها و هتروزیگوت‌ها، قابلیت شناسایی آلل‌های متعدد در لوکوس‌های مختلف، خنثی بودن نسبت به بیان فنوتیپی، هزینه و زمان اجرای مناسب، و تکرارپذیری بالا در شرایط آزمایشگاهی متفاوت باشد. برخورداری از این ویژگی‌ها موجب می‌شود که نشانگرهای DNA ابزارهایی قابل اعتماد و تعیین‌کننده در اصلاح مولکولی پنبه محسوب شوند، به‌ویژه در شرایطی که صفات هدف تحت کنترل چندین ژن با اثرات کوچک قرار دارند. در عمل، تحقق این ویژگی‌ها به انتخاب آگاهانه فناوری مناسب برای تولید و تحلیل نشانگرها وابسته است. انتخاب فناوری مناسب برای توسعه و به‌کارگیری نشانگرهای مولکولی به عواملی مانند هزینه، توان تفکیک، دقت ژنوتایپینگ، سطح پلی‌مورفیسم و مقیاس مطالعه بستگی دارد. بر این اساس، نشانگرهای DNA معمولاً بر پایه روش شناسایی به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند: الف) نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون، ب) نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و ج) نشانگرهای مبتنی بر تعیین توالی DNA. این طبقه‌بندی چارچوبی نظام‌مند برای انتخاب فناوری مناسب در مطالعات تنوع ژنتیکی، نقشه‌برداری QTL، مطالعات GWAS و برنامه‌های اصلاح ژنومی پنبه فراهم می‌آورد (کومار و همکاران، ۲۰۲۴).

نشانگرهای DNA مبتنی بر هیبریداسیون

چندشکلی طول قطعه حاصل از هضم آنزیمی DNA (RFLP): نشانگر چندشکلی طولی قطعات حاصل از هضم آنزیمی DNA (RFLP) از نخستین ابزارهای مولکولی مورد استفاده در بررسی تنوع گیاهان به‌شمار می‌آید و از سال ۱۹۷۵ برای شناسایی پلی‌مورفیسم توالی‌های DNA و نقشه‌برداری ژنی به‌کار رفته است. این نشانگر در گروه نشانگرهای DNA مبتنی بر هیبریداسیون قرار دارد و با استفاده از توالی‌های DNA کلون‌شده، تفاوت‌های موجود در نواحی مشخصی از ژنوم را بر اساس اختلاف در طول

قطعات DNA حاصل از هضم با اندونوکلازهای محدودکننده آشکار می‌کند (ست و همکاران، ۲۰۲۵). تفاوت در توالی‌های DNA می‌تواند منجر به ایجاد، حذف یا جابه‌جایی جایگاه‌های برش آنزیمی شود؛ در نتیجه، هضم DNA ژنومی با آنزیم‌های محدودکننده، قطعاتی با تعداد و اندازه متفاوت در ژنوتیپ‌های مختلف تولید می‌کند. این تفاوت‌ها مبنای شناسایی پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در روش RFLP را تشکیل می‌دهند. مراحل اصلی این روش شامل استخراج DNA، هضم با آنزیم‌های محدودکننده کم‌برش یا پربرش، جداسازی قطعات محدودشده از طریق الکتروفورز ژل آگاروز، انتقال قطعات به غشای نایلونی، هیبریداسیون با پروب‌های gDNA یا cDNA و در نهایت امتیازدهی پلی‌مورفیسم‌ها از طریق اتورادیوگرافی است. بین سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۵، نشانگر RFLP نقش مهمی در مطالعات ژنتیک پنبه ایفا کرد و به‌طور گسترده در تحلیل تنوع ژنتیکی، شناسایی واریته‌ها، توسعه نقشه‌های ژنتیکی، تجزیه QTL و انتخاب مبتنی بر نشانگر برای مقاومت به بیماری بلایت باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت (مالیک و همکاران، ۲۰۱۴). در این دوره، RFLP یکی از ابزارهای اصلی برای مطالعه ساختار ژنتیکی پنبه و شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با صفات هدف محسوب می‌شد. با وجود این کاربردها، روش RFLP به دلیل ماهیت زمان‌بر و پرهزینه خود، به‌تدریج با محدودیت‌های عملی مواجه شد. این روش نیازمند مقادیر زیاد DNA با کیفیت بالا است و اجرای مراحل متوالی شامل هضم DNA، الکتروفورز، بلاتینگ، نشاندارسازی پروب، هیبریداسیون، شست‌وشو و اتورادیوگرافی می‌تواند چندین هفته زمان ببرد. به همین دلیل، در سال‌های اخیر کاربرد RFLP کاهش یافته و این نشانگر به‌تدریج جای خود را به نشانگرهای سریع‌تر، مقرون‌به‌صرفه‌تر و مبتنی بر PCR داده است.

نشانگرهای DNA مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

نشانگرهای چندشکلی قطعات تصادفی تکثیر شده (RAPD): نشانگرهای چندشکلی قطعات

تصادفی تکثیر شده (RAPD) به‌عنوان یکی از نخستین و ساده‌ترین ابزارهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای تصادفی دنوکلوئیدی، نواحی مختلفی از ژنوم را بدون نیاز به اطلاعات پیشین از توالی DNA تکثیر می‌کنند. این ویژگی موجب شده است که RAPD در مطالعات مختلف مربوط به پنبه کاربرد گسترده‌ای داشته باشد؛ از جمله در تحلیل‌های فیلوژنتیک، ارزیابی تنوع ژنتیکی، شناسایی و تمایز ارقام (قادهاری و همکاران، ۲۰۱۰)، بررسی تنوع درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای و در برخی موارد، تحلیل نواحی ژنومی مرتبط با QTL ها. افزون بر این، لن و همکاران (۱۹۹۹) یک نشانگر RAPD با کد R-6592 را گزارش کردند که با ژن نرعیمی در پنبه ارتباط نشان می‌دهد.

در مقایسه با روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون مانند RFLP، نشانگر RAPD دارای مزایایی از جمله عدم نیاز به طراحی پروب یا اطلاعات توالی، عدم استفاده از مواد رادیواکتیو، نیاز به مقادیر اندک DNA ژنومی، سهولت اجرا و وابستگی کمتر به تجهیزات پیچیده و پرهزینه است. همین مزایا باعث شد که RAPD در سال‌های اولیه توسعه اصلاح مولکولی پنبه، به‌ویژه در آزمایشگاه‌هایی با امکانات محدود، به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، مهم‌ترین محدودیت نشانگرهای RAPD، تکرارپذیری پایین آن‌ها است. عواملی نظیر غلظت و کیفیت DNA قالب، شرایط واکنش PCR، نوع و غلظت آنزیم DNA پلیمرز و حتی تغییرات جزئی در دمای واکنش می‌توانند الگوهای تکثیر را به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار دهند. به همین دلیل، نتایج حاصل از RAPD به‌شدت وابسته به یکنواختی شرایط آزمایشگاهی بوده و تنها در صورت استانداردسازی دقیق مراحل آزمایش و تکرار آزمایش‌ها می‌توان به تکرارپذیری قابل قبول دست یافت. ماهیت غالب بیشتر نشانگرهای RAPD یکی دیگر از محدودیت‌های اساسی این روش محسوب می‌شود، زیرا این ویژگی امکان تفکیک ژنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت را محدود می‌کند. نشانگرهای همپارز در RAPD به‌ندرت گزارش شده‌اند و معمولاً

ناشی از حذف یا اضافه‌های کوچک در یک جایگاه ژنی خاص هستند. این محدودیت، کاربرد RAPD را در برنامه‌های اصلاحی پیشرفته، به‌ویژه در مطالعات دقیق QTL و انتخاب به‌کمک نشانگر، با چالش مواجه ساخته است (بابو و همکاران، ۲۰۲۰)

ناحیه تکثیرشده با توصیف توالی (SCAR): ناحیه تکثیرشده با توصیف توالی (SCAR)، مخفف (Sequence Characterized Amplified Region) یکی از نشانگرهای مولکولی مشتق‌شده از قطعات RAPD است که پس از تعیین توالی قطعات پلی‌مورف RAPD توسعه می‌یابد و به‌عنوان نسخه‌ای اختصاصی‌تر و پایدارتر از این نشانگر شناخته می‌شود. در این روش، با طراحی آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی قطعه RAPD هدف، تنها یک جایگاه ژنی مشخص در واکنش PCR تکثیر می‌شود و بدین ترتیب حساسیت واکنش نسبت به تغییرات جزئی شرایط آزمایشگاهی به‌طور محسوسه‌ای کاهش می‌یابد (کای و همکاران، ۲۰۲۲). این ویژگی نه‌تنها موجب افزایش پایداری و تکرارپذیری نتایج می‌شود، بلکه امکان تبدیل نشانگرهای غالب RAPD به نشانگرهای هم‌باز را نیز فراهم می‌کند. چنین قابلیت‌هایی برای نقشه‌برداری ژنومی و مطالعات پیوستگی ژنتیکی در گونه‌های خویشاوند نزدیک اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا تفکیک دقیق‌تر ژنوتیپ‌ها و غربالگری مؤثر جمعیت‌های بزرگ اصلاحی را ممکن می‌سازد.

در پنبه، نشانگر SCAR1920 به‌عنوان یکی از نشانگرهای معتبر مرتبط با QTL استحکام الیاف معرفی شده است (گائو و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج حاصل از کاربرد این نشانگر در برنامه‌های به‌نژادی الیاف نشان داده است که SCAR می‌تواند رفتار پلی‌ژنیک صفات کمی را با دقت مناسبی بازتاب دهد و به‌عنوان ابزاری مکمل در کنار سایر نشانگرهای مولکولی مورد استفاده قرار گیرد. این موضوع جایگاه SCAR را به‌عنوان پلی میان نشانگرهای ساده-PCR محور و مطالعات QTL تقویت می‌کند. از مهم‌ترین مزایای نشانگرهای SCAR می‌توان به سرعت و سادگی اجرا، اختصاصیت بالا نسبت به لوکوس هدف،

تکرارپذیری مناسب و قابلیت اعتماد نتایج اشاره کرد. با این حال، توسعه نشانگر SCAR مستلزم تعیین توالی قطعه اولیه RAPD و طراحی دقیق آغازگرهای PCR است و از سوی دیگر، تنها بخش محدودی از نشانگرهای RAPD قابلیت تبدیل شدن به SCAR را دارند. این محدودیت‌ها موجب می‌شود که کاربرد SCAR عمدتاً به مواردی معطوف شود که شناسایی یک جایگاه ژنی مشخص یا یک QTL با اهمیت اصلاحی بالا مدنظر باشد. کاربردهای نشانگر SCAR طیف گسترده‌ای از شناسایی ژن‌های مقاوم به بیماری‌ها و آفات، تعیین ژن‌های احیاکننده باروری، غربالگری کتابخانه‌های ژنومی برای کلون‌سازی مبتنی بر نقشه، تا تفکیک ژنوتیپ‌ها در جمعیت‌های اصلاحی را در بر می‌گیرد. این فناوری، با وجود هزینه نسبتاً پایین، توان تولید نشانگرهای اختصاصی و چندشکل را دارد و از این رو، ابزاری کارآمد برای مطالعه تنوع ژنتیکی و انتخاب ژنوتیپ‌های برتر در برنامه‌های اصلاح مولکولی پنبه محسوب می‌شود (کایران و همکاران، ۲۰۱۰)

نشانگرهای توالی چندشکلی تکثیرشده و برش‌یافته (CAPS): نشانگرهای توالی چندشکلی تکثیرشده و برش‌یافته CAPS؛ مخفف *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* به‌عنوان نسخه‌ای-PCR محور و توسعه‌یافته از نشانگرهای RFLP مطرح شده‌اند و امکان شناسایی سریع‌تر و دقیق‌تر چندشکلی‌های ژنتیکی را فراهم می‌کنند. در این روش، ابتدا یک قطعه اختصاصی از DNA ژنومی به‌وسیله PCR تکثیر می‌شود و سپس محصول PCR با آنزیم‌های محدودکننده مناسب هضم می‌گردد. تغییرات ژنتیکی مانند جهش‌های نقطه‌ای یا حذف اضافه‌های کوچک می‌توانند باعث ایجاد یا حذف جایگاه‌های برش آنزیمی شوند و در نتیجه الگوهای متفاوتی از قطعات هضم‌شده در میان ژنوتیپ‌ها تولید گردد. بدین ترتیب، CAPS اصول RFLP را با سرعت، حساسیت و سهولت PCR ترکیب کرده و روشی قابل اعتماد برای آشکارسازی چندشکلی‌های DNA ارائه می‌دهد (کالکرانی و همکاران، ۲۰۲۴).

قطعات تکثیرشده از طریق الکتروفورز تفکیک و مورد تحلیل قرار می‌گیرند. این توالی مرحله‌به‌مرحله، امکان آشکارسازی مجموعه‌ای گسترده از قطعات DNA پراکنده در سراسر ژنوم را فراهم می‌کند. یکی از ویژگی‌های برجسته AFLP، توانایی آن در نمایه‌سازی بخش عمده‌ای از ژنوم بدون نیاز به اطلاعات پیشین از توالی DNA است. به دلیل ماهیت حضور-عدم حضور باندها، این روش عمدتاً یک سیستم نشانگری غالب محسوب می‌شود، هرچند در شرایط خاص امکان مشاهده الگوهای هم‌بارز نیز گزارش شده است. AFLP از قابلیت اتوماسیون‌پذیری بالایی برخوردار است و می‌تواند تعداد زیادی لوکوس چندشکل را تنها با یک ترکیب آغازگری تولید کند. این ویژگی، در مقایسه با RFLP، RAPD و SSR، AFLP را به روشی بسیار کارآمد برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در مقیاس ژنومی تبدیل کرده است (شیجا و همکاران، ۲۰۲۰).

توزیع تصادفی و فراوانی بالای نشانگرهای AFLP، دامنه کاربرد این روش را به‌طور قابل توجهی گسترش داده است. این نشانگرها به‌طور گسترده در انگشت‌نگاری ژنتیکی، تحلیل روابط فیلوژنتیکی، برچسب‌گذاری صفات زراعی و مطالعه صفات مرتبط با کیفیت دانه و الیاف در پنبه مورد استفاده قرار گرفته‌اند. افزون بر این، AFLP جایگاه تثبیت‌شده‌ای در ساخت نقشه‌های پیوستگی ژنی و تحلیل QTL دارد و اغلب در کنار سایر سیستم‌های نشانگری به کار می‌رود تا دقت و پوشش نقشه‌های ژنتیکی افزایش یابد (اسماعیل و همکاران، ۲۰۱۵).

با وجود مزایای متعدد، فناوری AFLP با برخی محدودیت‌های ذاتی نیز همراه است. از جمله این محدودیت‌ها می‌توان به دشواری تفکیک ژنوتیپ‌های هتروزیگوت از هموزیگوت‌های غالب، پیچیدگی توسعه نشانگرهای اختصاصی لوکوس از قطعات منفرد AFLP، و نیاز به تجهیزات و کیت‌های تخصصی متناسب با اندازه و پیچیدگی ژنوم اشاره کرد. با این حال، پروفایل‌های بسیار تکرارپذیر، حساسیت بالا و توانایی شناسایی تعداد زیادی جایگاه چندشکل موجب شده است AFLP همچنان یکی از کارآمدترین و جامع‌ترین

بیشتر نشانگرهای CAPS ماهیت هم‌بارز دارند و به همین دلیل تمایز میان ژنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت با دقت و شفافیت بالا امکان‌پذیر است. اختصاصیت بالا نسبت به لوکوس هدف و قابلیت استانداردسازی مناسب پروتکل‌ها سبب شده است داده‌های حاصل از این نشانگرها تکرارپذیری مطلوبی داشته و به راحتی میان آزمایشگاه‌های مختلف قابل مقایسه باشند. در پنبه، نشانگرهای CAPS به عنوان ابزارهای مؤثر در شناسایی ژرم‌پلاسم، تحلیل تنوع ژنتیکی، نقشه‌برداری ژنی و تأیید نشانگرهای مرتبط با QTL گزارش شده‌اند (کرارکا همکاران، ۲۰۱۱).

با وجود این مزایا، توسعه و کاربرد نشانگرهای CAPS با محدودیت‌هایی نیز همراه است. یافتن چندشکلی‌هایی که منجر به تغییر جایگاه‌های برش آنزیمی شوند همواره آسان نیست، زیرا قطعات تکثیرشده معمولاً طول محدودی دارند و این موضوع دامنه تغییرات قابل شناسایی را محدود می‌کند. افزون بر این، طراحی آغازگرهای مناسب مستلزم دسترسی به داده‌های توالی‌یابی دقیق و قابل اعتماد است. با این حال، دقت بالا، سهولت اجرا، هزینه نسبتاً مناسب و تکرارپذیری مطلوب موجب شده است که CAPS همچنان جایگاه مهمی در ژنتیک مولکولی و برنامه‌های به‌نژادی پنبه داشته باشد و در کنار سایر سیستم‌های نشانگری، نقش قابل توجهی در تحلیل ساختار ژنومی و پیشبرد اصلاح صفات کمی ایفا کند (کشو و همکاران، ۲۰۲۱).

چندشکلی طول قطعات تکثیرشده (AFLP):

فناوری AFLP مخفف Amplified Fragment Length Polymorphism یکی از قدرتمندترین روش‌های نشانگری در ژنتیک مولکولی محسوب می‌شود که دقت و تکرارپذیری RFLP را با سرعت و کارایی PCR ترکیب می‌کند. در این روش، DNA ژنومی ابتدا توسط آنزیم‌های محدودکننده هضم می‌شود و سپس آدلپتورهای لیگونوکلئوتیدی به انتهاهای قطعات هضم‌شده متصل می‌گردند. در ادامه، تکثیر پیش‌انتخابی و پس از آن تکثیر انتخابی با استفاده از آغازگرهای دارای بازهای انتخابی انجام می‌شود و

ابزارها برای تحلیل ساختار ژنومی و به‌نژادی پنبه باشد، به‌ویژه در پروژه‌هایی که هدف آن‌ها شناسایی گسترده نشانگرها یا بررسی تنوع ژنتیکی در مقیاس وسیع است.

چند شکلی تکثیرشده مرتبط با توالی (SRAP: Sequence-Related Amplified Polymorphism):

فناوری چندشکلی تکثیرشده مرتبط با توالی (SRAP) که نخستین بار توسط Quiros و Li در سال ۲۰۰۱ معرفی شد، یکی از روش‌های مبتنی بر PCR است که با هدف افزایش کارایی شناسایی چندشکلی‌ها، به‌طور ترجیحی چارچوب‌های باز خوانش (ORFs) و نواحی کدکننده ژن‌ها را هدف قرار می‌دهد. این روش بر پایه استفاده از دو آغازگر با ساختار و ترکیب نوکلئوتیدی متفاوت طراحی شده است که هر یک نقش مکملی در تکثیر نواحی متمایز ژنومی ایفا می‌کنند (لی و همکاران، ۲۰۰۱). آغازگر پیشرو (forward primer) ۱۷ نوکلئوتید است که در انتهای ۵' دارای ۱۴ نوکلئوتید غنی از G و C بوده و در انتهای ۳' سه نوکلئوتید انتخابی (selective nucleotides) قرار دارد. این معماری نوکلئوتیدی امکان اتصال ترجیحی به نواحی اگزونی و بخش‌های کدکننده ژن‌ها را فراهم می‌سازد. در مقابل، آغازگر پسرو (reverse primer) دارای ۱۹ نوکلئوتید است که ۱۶ نوکلئوتید ابتدایی آن در انتهای ۵' غنی از A و T بوده و سه نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳' قرار دارند. این آغازگر عمدتاً نواحی اینترونی، پروموتوری و فواصل بین‌ژنی را هدف قرار می‌دهد. ترکیب هدفمند این دو نوع آغازگر سبب می‌شود الگوهای تکثیر حاصل، به‌طور هم‌زمان اطلاعاتی از نواحی کدکننده و نواحی تنظیمی یا غیرکدکننده ژنوم فراهم کنند. چندشکلی‌های حاصل از SRAP عمدتاً ناشی از تفاوت در طول اینترون‌ها، ساختار پروموتورها و نواحی فاصله‌ای میان ژن‌ها در ژنوتیپ‌ها یا گونه‌های مختلف هستند. از مهم‌ترین مزیت‌های این روش می‌توان به سادگی اجرا، قابلیت اطمینان بالا، تولید الگوهای تکثیر تکرارپذیر و امکان استخراج و تعیین توالی باندهای منتخب اشاره کرد. برخلاف بسیاری از نشانگرهای غالب، SRAP به دلیل

هدف‌گیری نواحی عملکردی ژنوم، قادر به تولید تعداد قابل توجهی نشانگرهای هم‌باز است که این ویژگی در تحلیل‌های ژنتیکی دقیق، نقشه‌برداری QTL و مطالعات ارتباطی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. افزون بر این، این روش به دانش اولیه از توالی ژنومی نیاز ندارد و از این رو به‌عنوان یک رویکرد ژنوم‌گسترده و بدون پیش‌زمینه اطلاعاتی شناخته می‌شود که حتی در گونه‌ها یا ژرم‌پلاسم‌های فاقد ژنوم مرجع نیز کارایی بالایی دارد.

در گیاه پنبه (*Gossypium spp.*)، نشانگرهای SRAP در کنار سایر سیستم‌های نشانگری مولکولی به‌طور گسترده در اشیاع نقشه‌های ژنومی، ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم، شناسایی نواحی ژنومی و ژن‌های مرتبط با صفات کمی مهم نظیر عملکرد، اجزای عملکرد و کیفیت الیاف، و توسعه نقشه‌های پیوستگی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (لین و همکاران، ۲۰۰۵). سهولت اجرا، توان تفکیک مناسب، تکرارپذیری بالا و قابلیت هدف‌گیری نواحی عملکردی ژنوم از جمله ویژگی‌هایی هستند که SRAP را به ابزاری کارآمد و قابل اعتماد در مطالعات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی مبتنی بر ژنوم در پنبه تبدیل کرده‌اند. با این حال، در عصر ژنومیک پیشرفته، کاربرد SRAP عمدتاً به‌عنوان یک ابزار مکمل در کنار نشانگرهای مبتنی بر توالی و داده‌های NGS تعریف می‌شود.

نشانگرهای STS (Sequence Tagged Site):

نشانگر STS به توالی کوتاهی از DNA، معمولاً کمتر از ۵۰۰ جفت‌باز، اطلاق می‌شود که به‌طور منحصربه‌فرد در ژنوم یک فرد شناسایی و قابل ردیابی است. این نواحی ممکن است در ژنوم تکرار شوند، اما به دلیل ویژگی‌های یکتای توالی در دو انتهای خود، امکان طراحی آغازگرهای اختصاصی و تکثیر انتخابی از طریق PCR فراهم می‌شود. تفاوت‌های ژنتیکی یا چندشکلی‌های موجود در این نواحی، STS را به ابزاری قابل اعتماد برای شناسایی و ردیابی ژن‌ها و لوکوس‌ها در مطالعات ژنتیکی و نقشه‌برداری ژنومی تبدیل کرده است. تکثیر STS‌ها از طریق PCR انجام می‌شود و اعتبار واکنش از طریق الکتروفورز ژل قابل تأیید است.

این نشانگرها از مزایایی مانند سادگی کاربرد، چندشکلی بالا، رفتار همپارز، قابلیت تولید داده‌های تکرارپذیر و سازگاری با سیستم‌های توالی‌یابی با توان بالا برخوردارند. طول مناسب آغازگرهای PCR نیز به افزایش دقت و قابلیت تکرارپذیری نتایج کمک می‌کند (رامش و همکاران، ۲۰۲۰).

در پنبه، STS‌ها برای توسعه ولدین بازگرداننده باروری در برنامه‌های تلاقی هیبرید به کار گرفته شده‌اند. با وجود مزایا، توسعه STS نیازمند اطلاعات اولیه از توالی هدف و طراحی آغازگر اختصاصی برای هر جایگاه است که فرآیندی زمان‌بر و پرهزینه محسوب می‌شود. به دلیل قابلیت نقشه‌گذاری STS‌ها در موقعیت‌های مشخص ژنوم، تعیین موقعیت دقیق آن‌ها معمولاً با استفاده از مجموعه‌ای از قطعات همپوشان DNA انجام می‌شود. در عمل، PCR برای تولید این قطعات ژنومی به کار گرفته شده و با تحلیل ارتباط و همپوشانی آن‌ها، فاصله نقشه‌ای بین دو جایگاه STS بر اساس فراوانی بازآرایی یا شکست تعیین می‌شود. استفاده از STS‌های پیوسته با صفات مطلوب، امکان ردیابی ژن‌های هدف را فراهم می‌کند و در مقایسه با آغازگرهای دلخواه، به دلیل استفاده از اطلاعات توالی موجود، دقت و اختصاصیت بالاتری ارائه می‌دهد. حتی در مواردی که بخشی از توالی STS شامل عناصر تکراری باشد، تا زمانی که دو انتهای توالی یکتا باشند، امکان طراحی آغازگر اختصاصی و تکثیر انتخابی حفظ می‌شود. (فنگ و همکاران، ۲۰۰۵).

نشانگرهای SSR (Simple Sequence Repeats) یا میکروستلایت: نشانگرهای SSR، توالی‌های کوتاه تکرارشونده DNA هستند که از واحدهای ۱ تا ۶ جفت‌بازی تشکیل شده و به صورت پشت سر هم در ژنوم قرار می‌گیرند. افزایش تعداد این تکرارها، به‌ویژه زمانی که از ده واحد فراتر رود، سطح بالایی از چندشکلی درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای ایجاد می‌کند. این توالی‌ها به‌طور گسترده در سراسر ژنوم پراکنده‌اند و هم در نواحی کدکننده و هم غیرکدکننده حضور دارند، که این ویژگی باعث شده SSRها به یکی از

دقیق‌ترین و کارآمدترین نشانگرهای مولکولی در مطالعات ژنتیکی و ژنومیک گیاهان زراعی از جمله پنبه تبدیل شوند. ویژگی‌های چندآللی و همپارز بودن SSRها، به همراه میزان بالای چندشکلی، قدرت تفکیک بسیار مناسبی را فراهم می‌کند و آن‌ها را قادر می‌سازد تا حتی تفاوت‌های ژنتیکی کوچک میان ژنوتیپ‌ها را شناسایی کنند. همچنین، آغازگرهای PCR طراحی شده برای این نشانگرها دارای طول بهینه و ثبات تکثیر بالایی هستند که قابلیت تکرارپذیری و انتقال‌پذیری داده‌ها میان گونه‌های نزدیک را تضمین می‌کند (ارسلان و همکاران، ۲۰۲۵).

تکثیر SSRها از طریق PCR انجام می‌شود؛ آغازگرها به نواحی جانبی واحدهای تکراری متصل می‌شوند و تفاوت در تعداد تکرارها عمدتاً ناشی از لغزش DNA پلیمراز، بازترکیبی نامتعادل یا تغییرات تکثیری است. این تفاوت‌ها منجر به شکل‌گیری آلل‌های متعدد در یک لوکوس شده و امکان استفاده از SSRها در تحلیل تنوع ژنتیکی، انگشت‌نگاری ژنتیکی، تعیین خلوص ژنتیکی، تحلیل ساختار جمعیتی، نقشه‌برداری ژنتیکی و شناسایی QTL‌های مرتبط با صفات کمی و کیفی را فراهم می‌آورد. در پنبه، توسعه و به کارگیری SSRها از طریق رویکردهای متنوعی مانند تهیه کتابخانه‌های ژنومی غنی‌شده از SSR، استخراج SSR از توالی‌های EST و استفاده از BAC‌های ژنومی انجام شده است. پایگاه‌های داده‌ای مانند CottonGEN و Cotton Microsatellite Database منابع گسترده‌ای از SSRهای معتبر و نقشه‌گذاری‌شده را در اختیار پژوهشگران قرار می‌دهند و امکان تحلیل‌های مقایسه‌ای میان گونه‌های مختلف و ژرم‌پلاسماهای متنوع را فراهم می‌کنند (دیوندی و همکاران، ۲۰۲۵). SSRها در پنبه کاربرد گسترده‌ای دارند؛ آن‌ها توانایی تمایز ژنوتیپ‌ها، تحلیل فیلوژنتیک، بررسی ساختار جمعیت و شناسایی ژن‌های مرتبط با صفات اقتصادی از جمله کیفیت و استحکام الیاف را دارند. علاوه بر این، این نشانگرها در شناسایی ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها و آفات نظیر ویروس پیچیدگی برگ، بلایت باکتریایی، نماتد ریشه‌گره و پژمردگی ورتیسیلیومی

نقش مؤثری دارند که اهمیت آن‌ها را در برنامه‌های اصلاحی مبتنی بر ژنوم دوچندان می‌کند. به دلیل دقت بالا، تکرارپذیری مناسب، چندشکلی گسترده و رفتار هم‌باز، SSRها همچنان به‌عنوان یکی از استلنداردترین و مؤثرترین نشانگرهای مولکولی در مطالعات ژنومی و برنامه‌های اصلاحی پنبه مورد استفاده قرار می‌گیرند.

نشانگرهای EST-SSR (Expressed Sequence

Tag-Simple Sequence Repeats): توالی‌های رونوشت‌یافته (Expressed Sequence Tags; ESTs) منابع کوتاه‌DNA، معمولاً در بازه ۲۰۰ تا ۸۰۰ جفت‌باز، هستند که از کتابخانه‌های cDNA استخراج می‌شوند و نمایانگر ژن‌های فعال در بافت‌ها یا مراحل رشدی مشخص گیاه می‌باشند. این ویژگی، ESTها را به منبعی ارزشمند برای توسعه نشانگرهای SSRتبدیل کرده است؛ زیرا نشانگرهای EST-SSR نه تنها دارای موقعیت ژنومی مشخص هستند، بلکه به دلیل منشأ عملکردی خود، احتمال ارتباط آن‌ها با تغییرات فنوتیپی و مولکولی به مراتب بیشتر از SSRهای ژنومی است که عمدتاً از نواحی غیرکدکننده و غیرترجمه‌ای مشتق می‌شوند. (الطف و همکاران، ۲۰۲۴). فرآیند توسعه نشانگرهای EST-SSR شامل شناسایی توالی‌های دارای تکرارهای تاندیمی (microsatellites) در پایگاه‌های داده عمومی EST پنبه، طراحی آغازگرهای اختصاصی PCR برای نواحی جانبی SSR و اعتبارسنجی محصولات تکثیرشده از طریق تعیین توالی یا الکتروفورز با وضوح بالا است. به‌طور میانگین، تنها حدود ۱ تا ۵ درصد از توالی‌های EST واجد تکرارهای مناسب برای توسعه نشانگر SSR هستند، با این حال امکان استخراج سریع این نشانگرها از پایگاه‌های داده موجود و قابلیت غربالگری کارآمد در جمعیت‌های بزرگ، EST-SSRها را به ابزاری توانمند در ژنومیکس عملکردی تبدیل کرده است.

در گیاه پنبه (*Gossypium* spp.)، نشانگرهای EST-SSR به‌طور گسترده در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاس، توسعه نقشه‌های پیوستگی با تراکم متوسط تا بالا و شناسایی نواحی QTL مرتبط با صفات کمی

مهم به‌کار گرفته شده‌اند. مطالعات ژانگ و همکاران (۲۰۱۱) و لین و همکاران (۲۰۰۹)، کاربرد موفق این نشانگرها را در توسعه نقشه‌های پیوستگی و تحلیل ساختار تنوع ژنتیکی در پنبه‌های زراعی و وحشی گزارش کرده‌اند، در حالی که لیو و همکاران (۲۰۱۲) از EST-SSRها در برنامه‌های اصلاحی مبتنی بر انتخاب به‌کمک نشانگر (MAS) بهره برده‌اند. منشأ ژنی این نشانگرها امکان همبستگی مستقیم با صفات فنوتیپی کلیدی، به‌ویژه ویژگی‌های مرتبط با کیفیت، طول و استحکام الیاف پنبه را فراهم می‌کند.

با وجود مزایای یادشده، EST-SSRها معمولاً سطح چندشکلی کمتری نسبت به SSRهای ژنومی نشان می‌دهند؛ امری که ناشی از محافظه‌کاری تکاملی نواحی کدکننده ژنوم است. با این حال، مطالعه ونگ و همکاران (۲۰۱۵) نشان داده است که EST-SSRها به‌ویژه در اشیاع نقشه‌های ژنتیکی پنبه آلوتراپلوئید، تحلیل تکامل ژنومی و مطالعات ژنتیک مقایسه‌ای میان گونه‌های مختلف جنس *Gossypium*، کارایی بالایی دارند و امکان شناسایی ژن‌های عملکردی و حفظ سیننتی ژنومی را فراهم می‌آورند. در مجموع، EST-SSRها به دلیل منشأ عملکردی، قابلیت توسعه سریع، تکرارپذیری بالا و ارزش تحلیلی در ارتباط ژن-صفت، از اجزای کلیدی مجموعه نشانگرهای مولکولی در مطالعات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی پیشرفته پنبه محسوب می‌شوند و نقش مهمی در پیوند ژنومیکس عملکردی با به‌نژادی مبتنی بر نشانگر ایفا می‌کنند.

نشانگرهای ISSR (Inter Simple Sequence

Repeat): ISSRها نواحی ژنومی بین دو ریزماهواره متوالی را هدف قرار می‌دهند و با پرایمرهای مکمل دو ریزماهواره، ناحیه میان آن‌ها از طریق PCR تکثیر می‌شود (شارما و همکاران، ۲۰۱۲). طول قطعات تکثیرشده معمولاً محدود است، اما قدرت تفکیک و توان تفکیک ژنتیکی بالایی دارند. در پنبه، ISSRها برای بررسی تنوع درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای، انگشت‌نگاری ژرم پلاس و ارزیابی جمعیت‌های اصلاحی کاربرد گسترده داشته‌اند. به‌عنوان نمونه، سستی و

(نظیر تغییر در توالی و عملکرد پروتئین) یا غیرمستقیم از طریق تأثیر بر پیرایش RNA، پایداری رونوشت یا تنظیم بیان ژن ایجاد کنند. SNPها به دلیل فراوانی بسیار بالا در ژنوم، دوالی بودن، توزیع نسبتاً یکنواخت و قابلیت تمایز دقیق ژنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت، به عنوان نشانگرهای ایده‌آل برای تحلیل تنوع ژنتیکی، ساخت نقشه‌های پیوستگی با وضوح بالا، شناسایی QTLها، کلون‌سازی مبتنی بر نقشه و برنامه‌های اصلاحی مبتنی بر نشانگر (MAS) شناخته می‌شوند. افزون بر این، ماهیت دیجیتال داده‌های SNP و امکان ادغام آنها در پایگاه‌های داده ژنومی بزرگ، مدیریت جمعیت‌های وسیع و ژنوتیپ‌برداری دقیق و تکرارپذیر را تسهیل می‌کند؛ ویژگی‌ای که در مطالعات GWAS و اصلاح ژنومی از اهمیت بنیادی برخوردار است (پناهی و همکاران، ۲۰۲۴).

یکی از فناوری‌های کلیدی در توسعه و بهره‌برداری از SNPها، ژنوتیپ‌برداری مبتنی بر توالی‌یابی (Genotyping-by-Sequencing; GBS) است که نخستین بار توسط الشایر و همکاران (۲۰۱۱) معرفی شد. این رویکرد با ساده‌سازی مراحل آماده‌سازی کتابخانه و کاهش پیچیدگی ژنوم از طریق آنزیم‌های محدودکننده، امکان شناسایی و ژنوتیپ‌برداری هم‌زمان هزاران تا میلیون‌ها SNP را در جمعیت‌های بزرگ فراهم می‌سازد. در پنبه، به دلیل ماهیت آلوتتراپلوئید ژنوم، وجود زیرژنوم‌های A و D و فراوانی بالای توالی‌های تکراری، استفاده از GBS و سایر روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی اهمیت ویژه‌ای یافته است (لی و همکاران، ۲۰۱۴).

SNPها در جنس *Gossypium* به‌طور گسترده در مطالعات فیلوژنتیکی، تحلیل تنوع ژنتیکی، نقشه‌سازی پیوستگی و شناسایی QTLهای مرتبط با صفات کمی پیچیده مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به عنوان نمونه، شیرین و همکاران، ۲۰۱۰، با بررسی ۳۰ ناحیه حفاظت‌شده در ESTهای دو ژنوتیپ *G. arboreum*، تعداد ۲۷ SNP را در ۷۸۰۴ جفت‌باز شناسایی کردند. همچنین، به کارگیری فناوری پايروسیکوئسنسینگ Roche 454 امکان تولید مجموعه‌های بزرگ SNP در

همکاران (۲۰۱۵) با استفاده از ۱۰۰ نشانگر ISSR، ۹۵ ژنوتیپ از *Gossypium arboreum* را تحلیل کردند. مجموعاً ۳۹۷ باند تولید شد که ۳۶۸ باند پلی‌مورفیک بودند، نشان‌دهنده توان تفکیک بالای این نشانگرها و اهمیت ژرمپلاسما در برنامه‌های به‌نژادی پنبه تتراپلوئید بود. پرایمرهای ISSR معمولاً ۱۶-۲۵ نوکلئوتید طول دارند و مکمل توالی‌های تکراری دی، تری، تترا- یا پنتانوکلئوتیدی هستند. بسیاری از مزایای AFLP و SSR را با سادگی و گسترده‌گی RAPD ترکیب می‌کند و قادر است الگوهای پلی‌مورفیک قابل تکرار در جمعیت‌های بزرگ ایجاد کند. مطالعه نورمحمدی و همکاران (۲۰۱۳) بر روی جمعیت F_2 حاصل از تلاقی *G. hirsutum* رقم Opal × پنج رقم دیگر، نشان داد که ترکیب بیست ISSR، چهار SSR و RAPD۴۰، اطلاعات دقیقی درباره تنوع ژنتیکی و همبستگی با صفات زراعی ارائه می‌دهد. نشانگر-ISSR UBC807-1500bp با طول الیاف همبستگی مثبت و معنادار داشت و تلاقی Bulgar 539 × Opal طول الیاف بیشتری نسبت به والدین نشان داد. با وجود مزایا، ISSR محدودیت‌هایی نیز دارد. نواحی تکراری ژنوم، به‌ویژه در تحلیل با توالی‌یابی نسل جدید، دشوار است و تحلیل طول باندها عمدتاً از طریق PCR و ژل الکتروفورز انجام می‌شود. حساسیت روش به کیفیت DNA و شرایط واکنش نیز باید در طراحی مطالعه مدنظر قرار گیرد. در مجموع، ISSR با قابلیت تولید الگوهای پلی‌مورفیک قابل تکرار و سادگی اجرا، ابزاری مؤثر برای ارزیابی ژرمپلاسما و پشتیبانی از برنامه‌های به‌نژادی پنبه محسوب می‌شود.

چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism; SNP): چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) به تغییر یک نوکلئوتید منفرد A، T، G یا C در یک موقعیت مشخص از ژنوم اطلاق می‌شود. این تغییرات می‌توانند در نواحی کدکننده، غیرکدکننده یا میان‌ژنی رخ دهند و عمدتاً حاصل جهش‌هایی از نوع انتقال (transition)، ترانسورژن (transversion)، حذف یا اضافه نوکلئوتیدی هستند. بسته به موقعیت ژنومی و ماهیت تغییر، SNPها می‌توانند اثرات فنوتیپی مستقیم

پنبه آلوتراپلوئید را فراهم ساخت (بیر و همکاران، ۲۰۱۲). در مطالعه‌ای جامع‌تر، ونگ و همکاران (۲۰۱۳)، با استفاده از ۱۸,۵۹۷ نشانگر شامل gSSR، EST-SSR و SRAP-SNP، نقشه پیوستگی درون‌گونه‌ای *G. raimondii* را ترسیم کرده و QTL‌های مرتبط با عملکرد و کیفیت الیاف را شناسایی نمودند.

پیشرفت‌های اخیر در فناوری SNP-chip منجر به توسعه پلتفرم‌های پرچگالی با توان تفکیک بسیار بالا شده است. برای مثال، هالوس و همکاران (۲۰۱۵)، یک نقشه ژنتیکی بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای پنبه را با استفاده از آرایه CottonSNP63K ایجاد کردند. متعاقباً، چیپ ۷۰ K SNP مبتنی بر فناوری *Illumina Infinium* طراحی شد که در برنامه‌های اصلاحی، مونتاژ ژنوم و شناسایی SNP‌های مرتبط با تحمل شوری در پنبه کاربرد دارد. در ادامه، چیپ هشتماد SNP توسعه یافت که کارایی بالای آن در ژنوتیپ‌برداری دقیق، تحلیل ژنومی و مطالعات GWAS در *G. hirsutum* گزارش شده است (کای و همکاران، ۲۰۱۷). توسعه شتابان فناوری‌های مبتنی بر SNP و تولید داده‌های پرچگالی، مسیرهای نوینی برای شناسایی ژن‌های عملکردی، نقشه‌سازی دقیق QTL، تحلیل معماری ژنتیکی صفات کمی و پیاده‌سازی اصلاح مبتنی بر ژنوم فراهم کرده و SNP‌ها را به یکی از ارکان اصلی به‌نژادی نوین پنبه تبدیل نموده است.

نقشه‌برداری مبتنی بر همبستگی ژنوتیپ- فنوتیپ

Genotype-Phenotype Association (Mapping): نقشه‌برداری مبتنی بر همبستگی ژنوتیپ- فنوتیپ رویکردی پیشرفته و مبتنی بر ژنوم در ژنتیک کمی و ژنومیکس گیاهی است که هدف آن شناسایی ژن‌ها، آلل‌ها و QTL‌های مؤثر بر صفات کمی و کیفی می‌باشد. این روش بر پایه تنوع ژنتیکی طبیعی موجود در جمعیت‌های متنوع ژرم‌پلاسما و الگوی عدم تعادل پیوستگی (Linkage Disequilibrium; LD) بنا شده و برخلاف نقشه‌برداری کلاسیک مبتنی بر جمعیت‌های تفکیکی دووالدی، قادر به شناسایی QTL‌های با اثر کوچک و ارائه قدرت تفکیک ژنومی به‌مراتب بالاتر است (خان و همکاران، ۲۰۲۵). اساس این

رویکرد بر این فرض استوار است که آلل‌های مؤثر بر یک صفت، در جمعیت‌های طبیعی همچنان با نشانگرهای ژنتیکی مجاور خود در حالت LD باقی مانده‌اند؛ از این‌رو، تحلیل آماری همبستگی میان ژنوتیپ و فنوتیپ در مقیاس ژنوم، امکان شناسایی نواحی ژنومی، ژن‌ها یا حتی تغییرات تک‌نوکلئوتیدی علی را فراهم می‌کند (ون و همکاران، ۲۰۲۳). بهره‌گیری از جمعیت‌های بزرگ، متنوع و غیرخویشاوند در این رویکرد، امکان تحلیل همزمان چندین صفت و برآورد اثرات ژنتیکی جزئی و افزایشی را فراهم می‌سازد. کاربرد در پنبه در گونه‌های آلوتراپلوئید پنبه (*Gossypium spp.*)، نقشه‌برداری مبتنی بر همبستگی ژنوتیپ- فنوتیپ به‌طور گسترده برای شناسایی ژن‌ها و QTL‌های مرتبط با کیفیت الیاف (طول، استحکام، یکنواختی و ریزش الیاف)، عملکرد و اجزای عملکرد (تعداد غوزه، وزن غوزه، وزن بذر و عملکرد در واحد سطح) و همچنین مقاومت به تنش‌های زیستی نظیر ویروس پیچیدگی برگ پنبه، پژمردگی ورتیسیلیومی و بلایت باکتریایی مورد استفاده قرار گرفته است (عبدالرحمانوف و همکاران، ۲۰۰۹). توسعه پلتفرم‌های SNP پرچگالی بالا نظیر CottonSNP63K، ۷۰ K و ۸۰ K امکان اجرای مطالعات ارتباط ژنومی گسترده (GWAS) با قدرت تفکیک بالا و پوشش ژنومی مناسب را در پنبه فراهم ساخته و ردیابی دقیق QTL‌های پایدار و قابل‌استفاده در برنامه‌های اصلاحی را تسهیل کرده است (کای و همکاران، ۲۰۱۷).

مزیت کلیدی این رویکرد، توانایی نقشه‌برداری صفات کمی پیچیده با قدرت تفکیک در حد ژن یا ناحیه ژنی، تحلیل همزمان چندین صفت و استفاده مستقیم از تنوع ژنتیکی ذخایر ژرم‌پلاسما است. افزون بر این، استفاده از داده‌های SNP و سایر نشانگرهای مولکولی با تراکم بالا، امکان برآورد دقیق الگوی LD در سراسر ژنوم و آشکارسازی روابط واقعی میان ژنوتیپ و فنوتیپ را فراهم می‌کند؛ امری که در شناسایی ژن‌های کاندید و طراحی استراتژی‌های اصلاح ژنومی اهمیت بنیادین دارد. با این حال، این رویکرد با چالش‌ها و

محدودیت‌هایی نیز همراه است. از جمله، موفقیت نقشه‌برداری مبتنی بر همبستگی به پوشش گسترده نشانگرها، کیفیت داده‌های فنوتیپی، اندازه نمونه مناسب و دسترسی به اطلاعات ژنومی مرجع دقیق وابسته است. در گونه‌ها یا جمعیت‌هایی با اطلاعات ژنومی محدود، قدرت آشکارسازی QTL ها کاهش می‌یابد. علاوه بر این، ساختار جمعیتی، خویشاوندی و همبستگی‌های تصادفی می‌توانند منجر به نتایج کاذب شوند؛ از این‌رو، به‌کارگیری مدل‌های آماری پیشرفته نظیر مدل‌های مختلط خطی (MLM)، مدل‌های چندلایه و روش‌های تصحیح ساختار جمعیتی Q، PCA و K-matrix برای کنترل اثرات محیطی و ژنتیکی ناخواسته ضروری است. در مجموع، نقشه‌برداری مبتنی بر همبستگی ژنوتیپ-فنوتیپ به‌عنوان یکی از ارکان اصلی ژنومیکس پنبه، امکان بهره‌برداری مؤثر از تنوع ژنتیکی، شناسایی QTL های با اثر کوچک و پیوند مستقیم GWAS با انتخاب ژنومی و MAS را فراهم کرده و جایگاه خود را در اصلاح پیشرفته پنبه به‌طور فزاینده‌ای تثبیت نموده است.

مطالعات ارتباطی سراسر ژنوم (Genome-Wide Association Studies; GWAS): با گسترش نشانگرهای SNP و توسعه فناوری‌های توالی‌یابی پرچگالی و کم‌هزینه، امکان بررسی جامع ژنوم و شناسایی QTL های مؤثر بر صفات کمی و کیفی در گونه‌های گیاهی به‌طور چشمگیری فراهم شده است (مالیک و همکاران، ۲۰۱۴). مطالعات ارتباطی سراسر ژنوم (GWAS) رویکردی ژنوم‌گسترده، مبتنی بر جمعیت و مستقل از پیش‌فرض‌های ژنتیکی است که در آن هزاران تا میلیون‌ها واریانت ژنتیکی در سطح کل ژنوم مورد ارزیابی قرار می‌گیرد تا ارتباط آماری هر واریانت با صفات هدف شناسایی شود. این رویکرد بر تنوع فنوتیپی و ژنتیکی طبیعی موجود در جمعیت‌های متنوع ژرم‌پلاسما تکیه دارد و برخلاف روش‌های سنتی مبتنی بر جمعیت‌های تفکیکی یا ژن‌های کاندیدا، امکان کشف واریانت‌های ناشناخته، غیرمنتظره و با اثرات کوچک را فراهم می‌آورد.

در GWAS، ابتدا جمعیت‌های مورد مطالعه با دقت بالا و اغلب در چند محیط، فنوتیپ‌برداری می‌شوند و سپس DNA استخراج‌شده با استفاده از آرایه‌های SNP پرچگالی یا روش‌های ژنوتیپ‌برداری مبتنی بر توالی‌یابی نظیر GBS و RAD-seq مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد. هر SNP یا واریانت ژنتیکی که فراوانی آن به‌طور معنی‌دار با تغییرات فنوتیپی صفت مورد نظر همبستگی نشان دهد، به‌عنوان واریانت مرتبط با صفت شناسایی می‌شود. این واریانت‌ها معمولاً ناحیه‌ای از ژنوم را مشخص می‌کنند که به‌دلیل وجود عدم تعادل پیوستگی (LD)، در مجاورت یا هم‌مکانی با ژن‌ها یا عناصر تنظیمی کلیدی کنترل‌کننده صفت قرار دارند. در پنبه آلوتراپلوئید، به‌ویژه در گونه‌های *G. hirsutum* و *G. barbadense*، GWAS به‌طور گسترده برای شناسایی آلل‌های مرتبط با صفات زراعی کلیدی از جمله کیفیت الیاف (طول، استحکام، یکنواختی و ظرافت الیاف)، عملکرد محصول و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به‌کار گرفته شده است (سو و همکاران، ۲۰۱۶). برای نمونه، برخی مطالعات گزارش کرده‌اند که ده‌ها SNP به‌طور معنی‌دار با صفات کیفیت الیاف مرتبط هستند که توان بالای GWAS را در تبیین معماری ژنتیکی صفات کمی پیچیده در پنبه به‌خوبی نشان می‌دهد.

مزیت اصلی GWAS نسبت به روش‌های نقشه‌برداری سنتی، توانایی تحلیل کل ژنوم بدون محدودیت ژن‌های کاندیدا، شناسایی QTL های با اثر کوچک، قدرت تفکیک بالا و امکان استفاده مستقیم از جمعیت‌های بزرگ و متنوع ژنتیکی است. با این حال، GWAS با چالش‌هایی نیز همراه است؛ از جمله نیاز به پوشش گسترده و یکنواخت SNP ها، کیفیت بالای داده‌های فنوتیپی، اندازه نمونه مناسب و کنترل دقیق ساختار جمعیتی و خویشاوندی به‌منظور کاهش نتایج کاذب مثبت. از این‌رو، به‌کارگیری مدل‌های آماری پیشرفته نظیر مدل‌های مختلط خطی (MLM)، مدل‌های چندلایه و روش‌های تصحیح مبتنی بر PCA و ماتریس خویشاوندی (K) ضروری است. افزون بر این، تأیید عملکردی ژن‌های کاندید شناسایی‌شده از

طریق داده‌های ترانسکریپتومیکس، پروتئومیکس یا مطالعات عملکردی ژن برای انتقال نتایج GWAS به برنامه‌های اصلاحی کاربردی اهمیت بالایی دارد. در مجموع، GWAS به‌عنوان یکی از ابزارهای محوری ژنومیکس پنبه، نقش کلیدی در انتخاب ژنومی، طراحی برنامه‌های اصلاحی مبتنی بر SNP و شناسایی ژن‌ها و QTL‌های پایدار ایفا می‌کند و جایگاه آن در به‌نژادی مدرن پنبه به‌طور فزاینده‌ای تثبیت شده است (گائو و همکاران، ۲۰۲۵).

نتیجه‌گیری

اصلاح مولکولی پنبه در دهه‌های اخیر از اتکای صرف بر نشانگرهای منفرد و نقشه‌برداری‌های کلاسیک، به‌سوی چارچوب‌های ژنوم‌گسترده و داده‌محور حرکت کرده است. نتایج این مرور نشان می‌دهد که نشانگرهای مولکولی، نقشه‌برداری QTL و مطالعات ارتباطی سراسر ژنوم (GWAS) هر یک نقش متمایز اما مکملی در رمزگشایی معماری ژنتیکی صفات کمی پیچیده پنبه ایفا می‌کنند. انتخاب مبتنی بر نشانگر (MAS) همچنان ابزاری مؤثر برای انتقال ژن‌ها و QTL‌های با اثر عمده، به‌ویژه در صفات کیفی و مقاومت‌های تک‌ژنی، محسوب می‌شود؛ با این حال، کاربرد آن در صفات چندژنی نظیر عملکرد، کیفیت الیاف و تحمل تنش‌ها به‌دلیل ماهیت پلی‌ژنیک و اثرات

وابسته به محیط، محدود باقی مانده است. در مقابل، GWAS با بهره‌گیری از نشانگرهای SNP پرچگالی و تنوع طبیعی ژرم‌پلاسِم، امکان شناسایی QTL‌های متعدد با اثرات کوچک و توزیع ژنومی گسترده را فراهم کرده است و درک دقیق‌تری از معماری ژنتیکی این صفات ارائه می‌دهد. چالش اصلی اصلاح مولکولی پنبه، نه کمبود QTL یا نشانگر، بلکه شکاف میان کشف ژنومی و کاربرد اصلاحی است. هم‌پوشانی محدود QTL‌ها، ناپایداری اثرات در محیط‌های مختلف و پیچیدگی ژنوم آلوتتراپلوئید پنبه، لزوم گذار از MAS کلاسیک به رویکردهای یکپارچه‌تر مانند انتخاب ژنومی و ادغام داده‌های چندآمیگس را برجسته می‌سازد. ترکیب داده‌های SNP، GWAS، ترانسکریپتومیکس و فنوتیپ‌برداری دقیق، مسیر عملی‌تری برای پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنوتیپ‌ها و تسریع پیشرفت ژنتیکی فراهم می‌کند. در مجموع، آینده اصلاح پنبه در گرو ادغام نقشه‌برداری QTL، GWAS و انتخاب ژنومی در یک چارچوب چندآمیگسی و چندصفه‌ای است. چنین رویکردی می‌تواند محدودیت‌های اصلاح کلاسیک و MAS را پشت سر گذاشته و زمینه دستیابی به بهبود پایدار عملکرد، کیفیت الیاف و مقاومت به تنش‌ها را در برنامه‌های به‌نژادی پنبه فراهم سازد.

منابع

1. Kabish, A.K., D.T. Degefu, and Z.D. Gebregiorgis, *Cotton value chain and economics, in Cotton Sector Development in Ethiopia: Challenges and Opportunities*. 2024, Springer. p. 441-463.
2. Hamid, R., et al., *Transcriptome profiling and cataloging differential gene expression in floral buds of fertile and sterile lines of cotton (Gossypium hirsutum L.)*. Gene, 2018. 660: p. 80-91.
3. Gogari, S., *Gossypium arboreum (L.): A Review on its Agronomic and Industrial Potential for Sustainable Cotton Production*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2025: p. 102797.
4. Hamid, R., M. Shahsavari, and O. Alishah, *Combining ability and heterosis estimates for fiber yield and quality traits in NCII crosses of G. hirsutum*. Iranian Journal of Cotton Researches, 2022. 10(1): p. 71-92.
5. Hamidi, A., et al., *Evaluation of seed cotton yield, its components, earliness, fiber quality and morphological characteristics distinctness, uniformity and stability of three Upland Cotton (Gossypium hirsutum L.) new introducing tolerant to salinity hybrid genotypes*. Iranian Journal of Cotton Researches, 2024. 12(1): p. 41-68.

6. Faghani, E., et al., *Assessment of Irrigation Regimes on Yield Performance and Physiological and Biochemical Traits of cotton Varieties*. Iranian Journal of Cotton Researches, 2025. 12(2): p. 113-128.
7. Grover, C., et al., *Molecular confirmation of species status for the allopolyploid cotton species, Gossypium ekmanianum Wittmack*. Genetic Resources and Crop Evolution, 2015. 62(1): p. 103-114.
8. Shaheen, T., et al., *Cotton genetic resources. A review*. Agronomy for sustainable development, 2012. 32(2): p. 419-432.
9. Shahbazi, S., et al., *SSR-based molecular characterization of Verticillium wilt resistance in Iranian cotton cultivars*. Biochemistry and Biophysics Reports, 2025. 42: p. 102059.
10. Thoppurathu, F.J., et al., *Unravelling the treasure trove of drought-responsive genes in wild-type peanut through transcriptomics and physiological analyses of root*. Functional & Integrative Genomics, 2022. 22(2): p. 215-233.
11. Altaf, M.T., et al., *Advancements in QTL mapping and GWAS application in plant improvement*. Turkish Journal of Botany, 2024. 48(7): p. 376-426.
12. Zhang, Z., et al., *Environmental impacts of cotton and opportunities for improvement*. Nature Reviews Earth & Environment, 2023. 4(10): p. 703-715.
13. Ghorbanzadeh, Z., et al., *Integrative Genomics and Precision Breeding for Stress-Resilient Cotton: Recent Advances and Prospects*. Agronomy, 2025. 15(10): p. 2393.
14. Rahimova, G., et al., *Morphological and agronomic characterization of colored cotton cultivars of G. hirsutum L.* Journal of Wildlife and Biodiversity, 2024. 8(2): p. 165-178.
15. Hamid, R., A.G. Shahriari, and B. Panahi, *Weighted Gene Co-expression Network Analysis Identifies Functional Modules Associated with Multiple Abiotic Stressors in Cotton (Gossypium hirsutum L.)*. Journal of Plant Growth Regulation, 2025: p. 1-20.
16. Tulsani, N.J., et al., *Transcriptome landscaping for gene mining and SSR marker development in Coriander (Coriandrum sativum L.)*. Genomics, 2020. 112(2): p. 1545-1553.
17. Desai, H., et al., *Genic microsatellite marker characterization and development in little millet (Panicum sumatrense) using transcriptome sequencing*. Scientific reports, 2021. 11(1): p. 20620.
18. Boopathi, N.M., et al., *Molecular breeding for genetic improvement of cotton (Gossypium spp.)*. Advances in plant breeding strategies: breeding, biotechnology and molecular tools, 2015. 1.
19. Abdurakhmonov, I., Z. Buriev, and S. Shermatov. *Marker-assisted selection for complex fiber traits in cotton*. in *5th World Cotton Research Conference, Special session of ICGI, Mumbai, India*. 2011.
20. Gao, H. and H. Li, *Marker-Assisted Selection (MAS) in Soybean Breeding*. Molecular Plant Breeding, 2025. 16.
21. Tharun, P.S., N. Talekar, and V.R. Akkati, *Applications of molecular marker implementation for enhanced oilseed breeding through marker-assisted selection (Mas)*. Journal of Experimental Agriculture International, 2024. 46(5): p. 865-876.
22. Vasanthrao, T., et al., *Marker-assisted selection*. Genes Traits Mol Plant Breed, 2023. 31.
23. Yang, T., et al., *GWAS and GS analysis revealed the selection and prediction efficiency for yield, plant morphological, and fiber quality in Gossypium barbadense*. Theoretical and Applied Genetics, 2025. 138(7): p. 138.
24. Reddy, K.R., et al., *High-temperature and drought-resilience traits among interspecific chromosome substitution lines for genetic improvement of upland cotton*. Plants, 2020. 9(12): p. 1747.
25. Akbari, A., et al., *Analysis of Fennel Breeding Populations Based on Distinctness, Uniformity, and Stability (DUS) Testing via Morphological Descriptors and DNA Molecular Markers*. Genetic Resources and Crop Evolution, 2025. 72(1): p. 325-342.
26. Kushanov, F.N., et al., *Genetic diversity, QTL mapping, and marker-assisted selection technology in cotton (Gossypium spp.)*. Frontiers in plant science, 2021. 12: p. 779386.

27. Xu, Z., et al., *Development of a set of monosomic alien addition lines from Gossypium raimondii in Gossypium hirsutum toward breeding applications in cotton*. BMC plant biology, 2025. 25(1): p. 150.
28. Hamid, R., et al., *Uncloaking lncRNA-mediated gene expression as a potential regulator of CMS in cotton (Gossypium hirsutum L.)*. Genomics, 2020. 112(5): p. 3354-3364.
29. Madhumati, B., *Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis*. Int J Pure App Biosci, 2014. 2(1): p. 169-188.
30. Kumar, R., et al., *Advances in genomic tools for plant breeding: harnessing DNA molecular markers, genomic selection, and genome editing*. Biological Research, 2024. 57(1): p. 80.
31. Seth, D., et al., *Application of Molecular Markers in Genetic Improvement of Crop Plants: Current Status and Future Prospects*. Molecular Markers and Crop Improvement: Principle and Application, 2025: p. 1-17.
32. Malik, W., et al., *Molecular markers and cotton genetic improvement: current status and future prospects*. The Scientific World Journal, 2014. 2014(1): p. 607091.
33. Chaudhary, L., et al., *Estimation of genetic divergence among some cotton varieties by RAPD analysis*. Journal of Plant Breeding and Crop Science, 2010. 2(3): p. 039-043.
34. Lan, T.-H., C.G. Cook, and A.H. Paterson, *Identification of a RAPD marker linked to a male fertility restoration gene in cotton (Gossypium hirsutum L.)*. J Agric genomics, 1999. 4: p. 1-5.
35. Babu, K.N., et al., *Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and derived techniques*, in *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*. 2020, Springer. p. 219-247.
36. Cai, Y., et al., *Development and Application of a Cultivar-Specific Sequence-Characterized Amplified Region (SCAR) Marker for the Detection of Chrysanthemum morifolium Ramat. 'Daboju'*. Plants, 2022. 11(5): p. 604.
37. Guo, W., et al., *Development of SCAR marker linked to a major QTL for high fiber strength and its usage in molecular-marker assisted selection in upland cotton*. Crop Science, 2003. 43(6): p. 2252-2256.
38. Kiran, U., et al., *SCAR markers: a potential tool for authentication of herbal drugs*. Fitoterapia, 2010. 81(8): p. 969-976.
39. Kulkarni, K.P., et al., *Cleaved amplified polymorphic sequence markers in horticultural crops: current status and future perspectives*. Agronomy, 2024. 14(11): p. 2598.
40. Karaca, M. and A.G. İnce, *New non-redundant microsatellite and CAPS-microsatellite markers for cotton (Gossypium L.)*. Turkish Journal of Field Crops, 2011. 16(2): p. 172-178.
41. Sheeja, T.E., et al., *Amplified fragment length polymorphism: applications and recent developments*. Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols, 2020: p. 187-218.
42. Ismail, S., et al., *Linkage map construction and detection of QTLs associated with earliness, fiber quality and yield in an interspecific cross between Gossypium hirsutum L. and Gossypium barbadense L.* Int J Adv Res, 2015. 3(3): p. 637-649.
43. Li, G. and C.F. Quiros, *Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica*. Theoretical and applied genetics, 2001. 103(2): p. 455-461.
44. Lin, Z.-x., et al., *Linkage map construction and mapping QTL for cotton fibre quality using SRAP, SSR and RAPD*. Plant breeding, 2005. 124(2): p. 180-187.
45. Ramesh, P., et al., *Advancements in molecular marker technologies and their applications in diversity studies*. Journal of biosciences, 2020. 45(1).
46. Feng, C.-D., J.M.D. Stewart, and J.-F. Zhang, *STS markers linked to the Rf 1 fertility restorer gene of cotton*. Theoretical and applied genetics, 2005. 110(2): p. 237-243.
47. Arslan, M., et al., *Assessment of genetic diversity in cotton genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers: insights from interspecific and intraspecific variations*. Genetic Resources and Crop Evolution, 2025. 72(3): p. 3661-3670.
48. Dwivedi, A., et al., *Exploitation of novel drought responsive EST-SSR markers in tetraploid cotton (Gossypium hirsutum L.)*. Gene Reports, 2025. 38: p. 102097.

49. Altaf, M.T., et al., *Exploring the genetic diversity of upland cotton (Gossypium hirsutum L.) genotypes using EST-SSR markers: Genetic diversity analysis of upland cotton using EST-SSR markers*. Indian Journal of Experimental Biology (IJEb), 2024. 62(12): p. 1010-1017.
50. Zhang, Y., et al., *Assessing genetic diversity of cotton cultivars using genomic and newly developed expressed sequence tag-derived microsatellite markers*. Genet. Mol. Res, 2011. 10(3): p. 1462-1470.
51. Lin, Z., et al., *A high-density integrative linkage map for Gossypium hirsutum*. Euphytica, 2009. 166(1): p. 35-45.
52. Liu, R., et al., *Quantitative trait loci mapping for yield and its components by using two immortalized populations of a heterotic hybrid in Gossypium hirsutum L*. Molecular breeding, 2012. 29(2): p. 297-311.
53. Sharma, R., et al., *Assessment of genetic finger printing using molecular marker in plants: A Review*. Sci Res Impact, 2012. 1: p. 29-36.
54. Noormohammadi, Z., et al., *Genetic diversity analysis in Opal cotton hybrids based on SSR, ISSR, and RAPD markers*. Genetics and molecular research: GMR, 2013. 12(1): p. 256-269.
55. Panahi, B., H.M. Jalaly, and R. Hamid, *Using next-generation sequencing approach for discovery and characterization of plant molecular markers*. Current Plant Biology, 2024. 40: p. 100412.
56. Panahi, B., Hamid, R., & Jalaly, H. M. Z. 2025. Deciphering plant transcriptomes: leveraging machine learning for deeper insights. *Current Plant Biology*, 41, 100432.
57. Elshire, R.J., et al., *A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species*. PloS one, 2011. 6(5): p. e19379.
58. Li, F., et al., *Genome sequence of the cultivated cotton Gossypium arboreum*. Nature genetics, 2014. 46(6): p. 567-572.
59. Shaheen, T. and Y. Zafar, *Detection of single nucleotide polymorphisms in the conserved ESTs regions of Gossypium arboreum*. Electronic Journal of Biotechnology, 2010. 13(5): p. 3-4.
60. Byers, R.L., et al., *Development and mapping of SNP assays in allotetraploid cotton*. Theoretical and Applied Genetics, 2012. 124(7): p. 1201-1214.
61. Wang, Z., et al., *A whole-genome DNA marker map for cotton based on the D-genome sequence of Gossypium raimondii L*. G3: Genes, Genomes, Genetics, 2013. 3(10): p. 1759-1767.
62. Hulse-Kemp, A.M., et al., *Development of a 63K SNP array for cotton and high-density mapping of intraspecific and interspecific populations of Gossypium spp*. G3: Genes, Genomes, Genetics, 2015. 5(6): p. 1187-1209.
63. Khan, M., et al., *Unraveling key genes and pathways involved in Verticillium wilt resistance by integrative GWAS and transcriptomic approaches in Upland cotton*. Functional & Integrative Genomics, 2025. 25(1): p. 1-31.
64. Wan, S.J., *Fiber Quality Improvement of Upland Cotton (gossypium hirsutum l.) Through Interspecific Introgression*. 2023, University of Georgia.
66. Abdurakhmonov, I.Y., et al., *Linkage disequilibrium based association mapping of fiber quality traits in G. hirsutum L. variety germplasm*. Genetica, 2009. 136(3): p. 401-417.
66. Su, J., et al., *Detection of favorable QTL alleles and candidate genes for lint percentage by GWAS in Chinese upland cotton*. Frontiers in plant science, 2016. 7: p. 1576.
67. Guo, C., et al., *GWAS and eQTL analyses reveal genetic components influencing the key fiber yield trait lint percentage in upland cotton*. The Plant Journal, 2025. 121(5): p. e70036.

