

## ارزیابی تنوع ژنتیکی آفتابگردان آجیلی (*Helianthus annuus* L.) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

مرجان جنت‌دوست<sup>۱</sup>، رضا درویش‌زاده<sup>۲\*</sup>، محمدعلی ابراهیمی<sup>۳</sup>

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه، ۲. دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی

دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ۳. دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۲۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۶/۲۹)

## Studying Genetic Diversity in Confectionery Sunflower (*Helianthus annuus* L.) by Using Microsatellite Markers

M. JANNATDOUST<sup>1</sup>, R. DARVISHZADEH<sup>2\*</sup>, M. A. EBRAHIMI<sup>3</sup>

1. Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran, 2. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran, 3. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

(Received: May. 13, 2014 - Accepted: Sep. 20, 2014)

### Abstract

In this study, genetic variability among and within 50 confectionery sunflower populations was investigated using 10 microsatellite markers (SSR). The number of alleles per locus ranged from 2 to 3 with an average of 2.1. The number of effective alleles per locus was estimated from 1.948 (locus ORS785) to 1.468 (locus ORS1088) with an average of 1.825. The highest expected heterozygosity (0.484) was estimated for ORS785 locus and the lowest one (0.268) estimated for ORS1088. The mean of expected and observed heterozygosity was 0.435 and 0.722, respectively. Polymorphic information content varied between 0.572 in ORS785 locus and 0.334 in ORS1088 with an average of 0.503. A principal co-ordinates analysis (PCoA) showed that the first two Eigen-values explained 31.71% of the cumulative variation. Cluster analysis based on complete algorithm and Nei genetic distance grouped the studied populations in 3 main classes. Analysis of molecular variance revealed that the high part of total variation was due to within populations. So it will be better to do selection within populations in breeding programs.

**Keywords:** Sunflower, Analysis of molecular variance, Cluster analysis, Polymorphic information content, Molecular markers

### چکیده

تنوع ژنتیکی بین و درون ۵۰ توده آفتابگردان آجیلی با استفاده از ۱۰ نشانگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد آلل در مکان‌های ژنی بین ۲ تا ۳ با میانگین ۲/۱ آلل به ازای هر مکان ژنی بود. تعداد آلل مؤثر بین ۱/۹۴۸ در مکان ژنی ORS785 و ۱/۴۶۸ در مکان ژنی ORS1088 با میانگین ۱/۸۲۵ آلل برآورد شد. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۴۸۴) در مکان ژنی ORS785 و کمترین آن (۰/۲۶۸) در مکان ژنی ORS1088 برآورد شد. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب برابر ۰/۴۳۵ و ۰/۷۲۲ بود. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) بین ۰/۵۷۳ در مکان ژنی ORS785 و ۰/۳۳۴ در مکان ژنی ORS1088 با میانگین ۰/۵۰۳ برآورد گردید. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نشان داد دو مؤلفه اصلی اول مجموعاً ۳۱/۷۱٪ از واریانس کل را توجیه می‌نمایند. گروه‌بندی توده‌های آفتابگردان آجیلی مورد مطالعه براساس ضریب فاصله ژنتیکی نی و با استفاده از الگوریتم Complete. آن‌ها را در ۳ گروه مجزا قرار داد. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد تنوع درون توده‌ها بیشتر از تنوع بین توده‌ها می‌باشد. بنابراین در برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان آجیلی، می‌توان انتخاب را درون توده‌ها انجام داد.

**واژه‌های کلیدی:** آفتابگردان، تجزیه واریانس مولکولی، تجزیه خوشه‌ای، محتوای اطلاعات چندشکل، نشانگرهای مولکولی

## مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) متعلق به خانواده Asteraceae و یک گیاه یکساله، دگرگرده-افشان و دیپلوئید با تعداد کروموزوم  $2n=2x=34$  می‌باشد. آفتابگردان یک سیستم مدل برای مطالعه ژنومی خانواده آستراسه می‌باشد (Paniego et al., 1999). ارقام زراعی آفتابگردان به دو تیپ روغنی و آجیلی تقسیم‌بندی می‌شوند. در نوع آجیلی درصد روغن کمتر از ۳۰ درصد بوده و دارای درصد پروتئین بالایی می‌باشند و جهت مصرف آجیلی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Lu and Hoefl, 2009). استان آذربایجان غربی در سال‌های اخیر با اختصاص سطح زیر کشتی معادل ۲۷۵۰۰ هکتار به آفتابگردان آجیلی و ۴۰۰۰ هکتار به آفتابگردان روغنی پتانسیل قابل توجهی در تولید این محصول دارد (<http://tabesh.net>).

شهرستان خوی در استان آذربایجان غربی با سطح زیر کشتی معادل ۱۶۰۰۰ هکتار قطب اول تولید دانه آفتابگردان آجیلی در کشور می‌باشد. بیش از ۱۰ هزار خانوار تنها در شهرستان خوی از طریق کشت این محصول امرار معاش می‌کنند و وجود تنها بازار بورس دانه‌های آجیلی آفتابگردان کشور در خوی نشان از اهمیت و رونق کشت این محصول در این شهرستان دارد. ارقام محلی قلمی و پسته‌ای از ارقام مهم آفتابگردان آجیلی کشت شده در استان آذربایجان غربی می‌باشند. تولید و توسعه ارقام اصلاح شده نقش بسیار مهمی در توسعه کشاورزی و صنایع وابسته و به تبع آن توسعه اقتصادی استان دارد.

تخمین میزان تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از گام‌های پایه‌ای و اساسی در نگهداری و حفاظت مواد ژنتیکی در بانک‌های ژن و اجرای برنامه‌های به‌نژادی است. کشاورزی نوین تنوع ژنتیکی را در گیاهان زراعی نسبت به اجداد وحشی آن‌ها کاهش داده است. جهت دستیابی به ارقام با عملکرد بالا، کیفیت بهتر، تحمل بیشتر به تنش‌های زیستی و غیر

زیستی از قبیل مقاومت به آفات و بیماری‌ها، وجود تنوع ژنتیکی ضروری است (Laurentin, 2009). تعیین تنوع ژنتیکی می‌تواند براساس انواع اطلاعات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی باشد (Mohammadi and Prasanna, 2003; Sudre et al., 2007; Goncalves et al., 2009). با این حال، نشانگرهای مولکولی مزایایی بیش از انواع دیگر نشانگرها دارند و تفاوت‌ها را بدون دخالت عوامل محیطی سریع‌تر ابراز می‌نمایند (Binneck et al., 2002; Garcia et al., 2004; Goncalves et al., 2008; Saker et al., 2005; Souza et al., 2008). از بین نشانگرهای مولکولی DNA، نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به سرعت در حال گسترش‌اند و با سرعت بیشتری می‌توانند تنوع موجود در ژرم‌پلاسم را نشان دهند. از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR، نشانگرهای ریزماهورها (SSR) به دلیل پلی-مورفیسم بالا، توزیع تصادفی و وراثت مندلی هم‌بازر، از نشانگرهای معتبری جهت مطالعات ژنتیکی هستند (Kalia et al., 2011). SSRها به طور گسترده‌ای در تحقیقات آفتابگردان برای شناسایی لاین‌های خالص، ارقام و گونه‌های وحشی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Yu et al., 2002, Tang and Knapp 2003, Hvarleva et al., 2007, Darvishzadeh et al., 2010, Garayalde et al., 2011). در مطالعه‌ای Tang و Knapp (۲۰۰۳) از ریزماهورها برای ارزیابی تنوع توده‌های بومی آفتابگردان آمریکا و جمعیت‌های وحشی ارقام زراعی استفاده کردند. اخیراً از نشانگرهای ریزماهور به منظور گروه‌بندی لاین‌های خالص آفتابگردان که در آمریکا توسعه یافته بودند، استفاده شده و نشان داده شد که این نشانگرها کارایی بالایی در تفکیک لاین‌های با شجره‌های متفاوت دارند (Smith et al., 2009). پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی، تجزیه ارتباط نشانگر صفت (Marker-trait association analysis) و

(BioPhotometer 6131, Eppendorf, Germany) در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر بررسی شد.

#### واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

برای بررسی تنوع ژنتیکی در درون و بین توده‌های آفتابگردان آجیلی، از ۱۰ نشانگر ریزماهواره آگاهی-بخش (جدول ۲) استفاده شد. PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر انجام گرفت. اجزاء واکنش به ازای هر نمونه شامل تک DNA پلی‌مراز<sup>۳</sup> (با غلظت نهایی ۰/۵ واحد) به میزان ۰/۱۶ میکرولیتر، بافر PCR (با غلظت ۱۰ برابر) به مقدار ۲ میکرولیتر، MgCl<sub>2</sub> (با غلظت ۵۰ میلی‌مولار) به میزان ۱ میکرولیتر، dNTP (با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) به مقدار ۰/۸ میکرولیتر، آغازگرهای مستقیم و معکوس (با غلظت ۱۰ میکرو-مولار) هر کدام به مقدار ۰/۸ میکرولیتر، آب دیونیزه استریل به مقدار ۴/۴۴ میکرولیتر و DNA با غلظت ۵ نانوگرم می‌باشد. PCR توسط دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient: Type 5331, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) مطابق با روش Kholghi و همکاران (۲۰۱۲)، به صورت Touchdown انجام گرفت. از مزایای این روش، اختصاصی‌تر شدن اتصالات اولیه آغازگر-الگو می‌باشد. مخلوط محصولات PCR و فرم-آمیددای (98% Formamide, 10 mM EDTA, 0/05% Bromophenol blue and 0/05% Xylene cyanol) در ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز و رنگ‌آمیزی باندها با اتیدیوم بروماید (1.0 mg ml<sup>-1</sup>) صورت گرفت. ژل آگارز با تشکیل ساختمان پلیمری، فاقد بار الکتریکی بوده و از لحاظ شیمیایی (در مقایسه با DNA) خنثی می‌باشد و همواره می‌تواند به راحتی قطعات را با حفظ فعالیت بیولوژیکی-شان جداسازی نماید.

هتروزیس در آفتابگردان روغنی انجام گرفته است در حالی که پژوهش‌ها در آفتابگردان آجیلی محدود است (Dong *et al.*, 2007). در این مطالعه تنوع ژنتیکی آفتابگردان آجیلی با نشانگرهای ریزماهواره بررسی شده است.

### مواد و روش‌ها

#### مواد گیاهی و استخراج DNA

در این تحقیق تنوع ژنتیکی در درون و بین ۵۰ توده آفتابگردان آجیلی (جدول ۱) با نشانگرهای میکروساتیلت بررسی گردید. از آنجایی که استان آذربایجان غربی با توجه به موقعیت جغرافیایی و شرایط اقلیمی، پتانسیل قابل توجهی در تولید آفتابگردان آجیلی دارد اکثر توده‌ها از سطح این استان و به صورت مستقیم از زارعین تهیه شد. توده‌های دیگر از سایر نقاط کشور که کشت آفتابگردان آجیلی مرسوم است جمع‌آوری شدند. بذور هر یک از توده‌ها در گلدان‌های پلاستیکی در شرایط کنترل شده کشت و در مرحله چهار برگی از هر توده ۵ نمونه انتخاب و با روش ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم‌بروماید (CTAB)<sup>۱</sup>، استخراج DNA ژنومی صورت گرفت. DNA ژنومی استخراج شده در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (10 mM Tris, 1 Mm EDTA, pH 8.0) حل شد. برای سنجش کیفیت DNA از نظر سالم بودن و نداشتن شکستگی، از الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد در بافر (45 mM Tris base, 45 mM Boric acid, 1 mM EDTA pH 8.0) استفاده گردید. عکس‌برداری از ژل توسط دستگاه ژل داکيومنتیشن (Gel Logic 212 PRO, Carestream Health, Inc., Rochester, NY, USA) و تاباندن نور UV صورت گرفت. DNA‌هایی انتخاب گردیدند که دارای یک باند تیز در بالای ژل بودند. خلوص و غلظت DNA در دستگاه اسپکتوفتومتری

1. Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide  
2. Deoxyribo Nucleic Acid

3. Taq DNA Polymerase

جدول ۱- نام، طول جغرافیایی و عرض جغرافیایی محل جمع‌آوری ۵۰ توده آفتابگردان آجیلی

کد	محل جمع‌آوری	طول	عرض	کد	محل جمع‌آوری	طول	عرض
۱	پیرانشهر (بالابان)	45°	36°	۲۶	مرند (دیزج- قلمی)	45° 45'	38° 30'
۲	ارومیه (نوشین شهر)	45° 39'	37° 53'	۲۷	مرند (یامچی - پسته‌ای)	45° 45'	38° 30'
۳	بوکان ۱	46° 12'	36° 31'	۲۸	بانہ ۳	45° 53'	35° 59'
۴	بوکان ۲	46° 12'	36° 31'	۲۹	ارومیه (وقاصولوی سفلی)	45° 0'	37° 40'
۵	ارومیه (اردوشاهی ۱)	45° 0'	37° 40'	۳۰	همدان ۲	48° 32'	34° 52'
۶	سلماس (قره‌قشلاق - قلمی)	44° 47'	38° 11'	۳۱	بانہ ۱	45° 53'	35° 59'
۷	پیرانشهر (اندیزه)	45°	36°	۳۲	شبیستر (کوزه‌کنال ۲)	45°	38°
۸	سقز ۲	46° 20'	36° 15'	۳۳	بانہ ۲	45° 53'	35° 59'
۹	سلماس (قزلجه ۲)	45° 46'	38° 17'	۳۴	ملایر ۳- سفید	48° 51'	34° 19'
۱۰	سلماس (قره‌قشلاق - بادامی)	44° 47'	38° 11'	۳۵	شبیستر (کوزه‌کنال ۳)	45°	38°
۱۱	سقز ۵	46° 20'	36° 15'	۳۶	مازندران (تیرتاش)	52° 0'	36° 30'
۱۲	سقز ۴	46° 20'	36° 15'	۳۷	شاهرود ۲	54° 58'	36° 25'
۱۳	مشهد	59° 35'	36° 20'	۳۸	سردشت	48° 52'	32° 32'
۱۴	اصفهان (طالخنوچه)	51° 43'	32° 39'	۳۹	شاهرود ۱	54° 58'	36° 25'
۱۵	سلماس (صدقیان)	44° 47'	38° 11'	۴۰	مرند ۱ - ۱۳۸۹	45° 45'	38° 30'
۱۶	پیرانشهر (سروکانی)	45°	36°	۴۱	سقز	46° 20'	36° 15'
۱۷	اصفهان (دولت‌آباد)	51° 43'	32° 39'	۴۲	خوی ۶	45° 00'	38° 35'
۱۸	ارومیه (انگنه ۴)	45° 0'	37° 40'	۴۳	ارومیه (مرنگلو)	45° 12'	36° 38'
۱۹	میانه (بسین)	47° 40'	37° 30'	۴۴	ارومیه (باباگنجه ۶)	45° 0'	37° 40'
۲۰	ارومیه (وقاصولوی اولیا)	45° 0'	37° 40'	۴۵	ارومیه (باروج)	45° 0'	37° 40'
۲۱	ارومیه (جبل‌کندی ۲)	45° 0'	37° 40'	۴۶	ارومیه (علی‌بگلو)	45° 0'	37° 40'
۲۲	مرند ۲ - ۱۳۸۹	45°	38° 30'	۴۷	سقز ۳	46° 20'	36° 15'
۲۳	شبیستر (کوزه‌کنال ۱)	45°	38°	۴۸	سقز ۱	46° 20'	36° 15'
۲۴	همدان ۱	48° 32'	34° 52'	۴۹	سندج	46° 31'	35° 31'
۲۵	خوی ۱۰	45° 00'	38° 35'	۵۰	ارومیه (للو ۵)	45° 0'	37° 40'

جدول ۲- نام، توالی و گروه‌های پیوستگی آغازگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های آفتابگردان آجیلی

آغازگر	توالی تکراری	آغازگر رفت	آغازگر برگشت	گروه لینکازی	منبع	دمای اتصال
ORS331	(CT)12(AC)13	TGAAGAAGGGTTGTTGATTACAAG	GCATTGGGTTCCACATTCT	LG7	تانگ و همکاران (۲۰۰۲)	57
ORS603	(AG)16	CAGTGGCTGTTGGTGTGAT	CACACTCTCCCTCTCTCTCT	-	تانگ و همکاران (۲۰۰۲)	57
ORS694	(AG)17	CCTGGAACGAACCGAGAAC	GCCGTGAAACAGAGAGAGGA	LG14	تانگ و همکاران (۲۰۰۲)	57
ORS728	(AG)7	CTCCATAGCAACCACTGAAA	CCTAGCTTATGGGACGTATGGA	LG1	تانگ و همکاران (۲۰۰۲)	57
ORS785	(AG)17	CAAAATACCCAGGTCAAAGCA	CCTAGCTTATGGGACGTATGGA	LG4	تانگ و همکاران (۲۰۰۲)	57
ORS807	(AG)15	CCGATATTTGACCGATATTTGC	TCTCACCTTCATCTCCTCC	LG16	تانگ و همکاران (۲۰۰۲)	57
ORS878	(AC)11	CCAAAGGTGGGATAACCTAAAAG	TCCGTGTTATGCAATTGATT	LG10	تانگ و همکاران (۲۰۰۲)	59
ORS1088	(CT)15	ACTATCGAACCTCCCTCCAAAC	GGATTTCTTTCATCTTTGTGGTG	LG10	تانگ و همکاران (۲۰۰۲)	59
ORS1256	(GT)8(AG)25	GATGTTGATGTTGGTGAAGTTGC	CTCCGTCACCTTAAGCACTTGTA	-	تانگ و همکاران (۲۰۰۲)	59
ORS1265	(CT)18	GGGTTTAGCAAATAATAGGCACA	GGGTTTAGCAAATAATAGGCACA	LG9	تانگ و همکاران (۲۰۰۲)	59

### تجزیه داده‌های مولکولی

داده‌های SSR به صورت سیستم هم‌بارز برای تشخیص هموزیگوتی و هتروزیگوتی در مکان ژنی،

نمره‌دهی شدند. محتوای اطلاعات چندشکل (Polymorphic Information Content: PIC)، (Anderson et al., 1992)، تعداد آل مشاهده

در بررسی تنوع ژنتیکی ۸ هیبرید بلغاری و ۶ لاین اینبرد آفتابگردان با ۱۸ جفت آغازگر SSR توسط Hvarleva و همکاران (۲۰۰۷) میانگین آلل در هر مکان ژنی ۲/۶۷ و میانگین PIC، ۰/۵۴ بدست آمد. در بررسی تنوع ژنتیکی آفتابگردان روغنی با نشانگر ریزماهواره توسط Zhang و همکاران (۲۰۰۵)، تعداد آلل در هر مکان ژنی ریزماهواره از ۲ تا ۹ آلل متغیر با میانگین ۳/۵ بود. در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ ژنوتیپ آفتابگردان روغنی با ۳۸ جفت آغازگر میکروساتلیت توسط Darvishzadeh و همکاران (۲۰۱۰)، در مجموع ۸۸ آلل در میان ژنوتیپ‌ها شناسایی شد. تعداد آلل در هر مکان ژنی از ۲ تا ۴ متغیر با میانگین ۲/۳۲ آلل با ازای هر مکان ژنی بود. در مطالعه ایشان محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) بین ۰/۰۹ و ۰/۶۲ متغیر و با میانگین ۰/۴۱ بدست آمد. در مطالعه حاضر تعداد آلل‌های شناسایی شده (Na) برای مکان‌های ژنی کمتر بود. اختلافات حاصل بین نتایج را می‌توان به عوامل مختلفی از قبیل میزان تنوع در نمونه‌ها، روش آشکارسازی و اندازه نمونه نسبت داد. در این مطالعه از سیستم ژل آگارز برای آشکارسازی و تفکیک محصولات PCR استفاده شد. ژل آگارز قدرت تفکیک پایینی در مقایسه با ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید دارد. با این وجود آگارز به عنوان یک سیستم ایمن در بسیاری از مطالعات مربوط به بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شده است و همچنین تکنولوژی مناسبی برای آنالیز معمول این نوع نشانگرهاست (Gharghani و همکاران، ۲۰۰۹؛ Naseri و همکاران، ۲۰۱۱؛ Basirnia و همکاران، ۲۰۱۴). تعداد آلل موثر از ۱/۴۶۸ در مکان ژنی ORS1088 تا ۱/۹۴۸ در مکان ژنی ORS785 متغیر با میانگین ۱/۸۲۵ بود (جدول ۳). در مطالعه حاضر، میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب برابر ۰/۴۳۵ و ۰/۷۲۲ بود. بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) برابر ۰/۴۸۴ و کمترین میزان آن ۰/۲۶۸

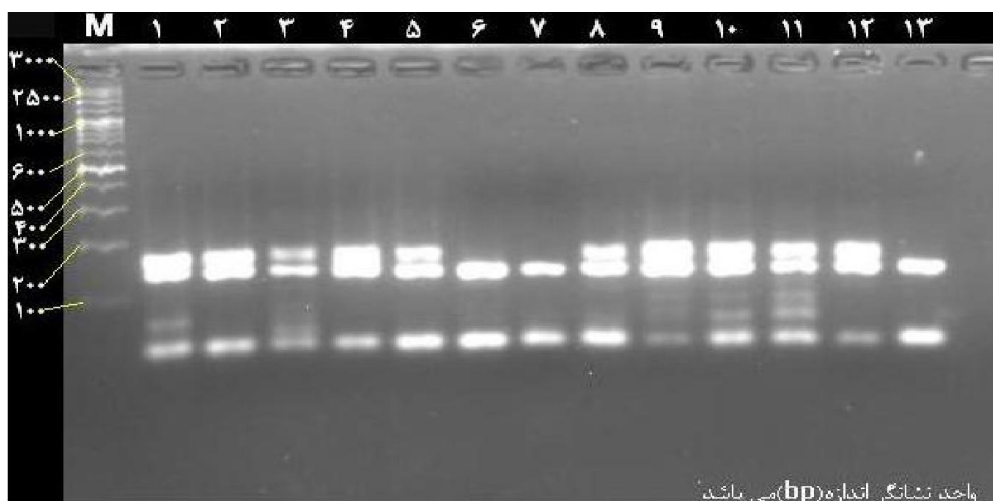
شده (Na)، تعداد آلل مؤثر (Ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، فراوانی آلل‌ها، ارزش شانون (sHa)، شاخص اطلاعات شانون (I) و سطوح تمایز ژنتیکی (PhiPT)، با استفاده از نرم‌افزار GenAlex نسخه ۶/۴۱ (Peakall and Smouse, 2006) محاسبه شد. تعداد آلل مؤثر آماره‌ای است برای برآورد تعداد آلل‌های با فراوانی یکسان در جمعیت ایده‌آل که هموزیگوسیتی آن برابر با جمعیت واقعی است (Peakall and Smouse, 2006). تجزیه واریانس مولکولی (Analysis of molecular variance: AMOVA) برای مشخص شدن میزان تنوع ژنتیکی در درون و بین جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenAlex انجام گرفت. برای گروه‌بندی جمعیت‌ها ماتریس تشابه ژنتیکی براساس ضریب تشابه ژنتیکی نی (Nei, 1978) با استفاده از نرم‌افزار GenAlex محاسبه و دندروگرام به روش Complete در نرم‌افزار NTSYS رسم گردید. برای بررسی مطابقت ماتریس حاصل از دندروگرام (ماتریس کوفنتیک) با ماتریس فاصله ژنتیکی، ضریب همبستگی کوفنتیک (r) با استفاده از نرم‌افزار NTSYS محاسبه گردید. ماتریس Dcenter از ماتریس فاصله Nei با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc محاسبه شد و برای انجام محاسبات تجزیه به مختصات اصلی (Principal coordinate analysis: PCoA) با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc مورد استفاده قرار گرفت.

## نتایج و بحث

با ۱۰ آغازگر ریزماهواره بکار رفته ۲۱ آلل در توده‌های مورد مطالعه شناسایی شد. در شکل ۱ انگشت‌نگاری تعدادی از ژنوتیپ‌های آفتابگردان آجیلی با آغازگر ریزماهواره ORS785 نشان داده شده است. تعداد آلل در مکان‌های ژنی بین ۲ تا ۳ متغیر با میانگین ۲/۱ آلل به ازای هر مکان ژنی بود.

با میانگین  $0/503$ ، بین  $0/573$  در نشانگر ORS785 و  $0/334$  در نشانگر ORS1088 برآورد گردید. PIC نشان‌دهنده میزان چند شکلی یک نشانگر می‌باشد. در مطالعه Duca و همکاران (۲۰۱۳) بر روی آفتابگردان روغنی با نشانگر SSR، پارامتر PIC بین  $0/76$  و  $0/43$  با میانگین  $0/57$  بود. در مشاهدات Popov و همکاران (۲۰۰۲)، تنوع ژنتیکی ۳۰ لاین اینبرد آفتابگردان با نشانگرهای ایزوزایم و RAPD مورد بررسی قرار گرفت و لاین‌های خالص، چندشکلی بالایی را با استفاده از نشانگرهای RAPD نشان دادند. دلیل تفاوت میانگین PIC با سایر مطالعات می‌تواند ناشی از متفاوت بودن ژنوتیپ‌های مورد استفاده و تفاوت در جفت آغازگرهای مورد استفاده باشد. بالاترین شاخص اطلاعات شانون (I) در نشانگر ORS785 با میزان  $0/677$  و کمترین آن در نشانگر ORS1088 با مقدار  $0/396$  مشاهده شد. ارزش شانون (sHa) در توده‌های آفتابگردان آجیلی مورد مطالعه بین  $1/020$  در نشانگر ORS603 و  $0/783$  در نشانگر ORS1088 با میانگین  $0/965$  مشاهده شد (جدول ۳). میزان PIC و ضریب شانون بیانگر میزان پلی مورفیسم در بین ژنوتیپ‌ها است.

بود که به ترتیب در مکان‌های ژنی ORS785 و ORS1088 مشاهده شد. آگاهی بخشی نشانگرهای SSR با میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار سنجیده می‌شود. پس مکان‌های ORS785 و ORS1256 با میزان هتروزیگوسیتی بالا می‌توانند در مطالعات تنوع ژنتیکی مؤثر واقع شده و از این مکان‌های SSR می‌توان به خوبی برای آنالیز تنوع در ژرم‌پلاسم آفتابگردان استفاده نمود. بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) برابر  $0/895$  و کمترین آن  $0/406$  بود که به ترتیب در مکان‌های ژنی ORS1256 و ORS1088 مشاهده شد (جدول ۳). در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵ توده آفتابگردان آجیلی با نشانگر SSR توسط Kholghi و همکاران (۲۰۱۲)، میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب برابر  $0/38$  و  $0/55$  بدست آمد. تفاوت بین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، اشاره بر فقدان تعادل هاردی-واینبرگ است. سطح هتروزیگوسیتی ژنتیکی (وجود آلل‌های مختلف در یک مکان ژنی) در یک ژنوتیپ از جمله فاکتورهای مهم در برنامه‌های اصلاحی است و بر میزان تنوع ژنتیکی، قابلیت تلاقی و فرآیند گزینش مؤثر می‌باشد. در مطالعه حاضر، میزان PIC



شکل ۱- الگوی بانندی مربوط به آغازگر ORS785: نمونه‌های ۱ و ۲ مربوط به محلی بوکان، نمونه‌های ۳ تا ۸ مربوط به ارومیه- اردوشاهی، ۹ تا ۱۳ مربوط به سلماس- قره قشلاق قلمی.

جدول ۳- فراوانی آلل‌ها (Allele frequencies)، تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، مشاهده شده (Ho)، شاخص اطلاعات شانون (I)، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و ارزش شانون (sHa) در توده‌های آفتابگردان آجیلی مورد مطالعه

آغازگر	Allele frequency			Na	Ne	He	Ho	I	PIC	sHa
	3	2	1							
ORS331	-	0/456	0/544	2	1/884	0/465	0/804	0/657	0/525	0/993
ORS603	0/473	0/003	0/524	3	1/918	0/474	0/843	0/671	0/568	1/020
ORS694	-	0/446	0/555	2	1/849	0/450	0/712	0/637	0/512	0/994
ORS728	-	0/474	0/526	2	1/889	0/461	0/773	0/649	0/538	0/997
ORS785	-	0/503	0/497	2	1/948	0/484	0/888	0/677	0/573	1/000
ORS807	-	0/660	0/340	2	1/675	0/373	0/434	0/542	0/421	0/937
ORS878	-	0/646	0/354	2	1/778	0/425	0/651	0/613	0/478	0/937
ORS1088	-	0/789	0/211	2	1/468	0/268	0/406	0/396	0/334	0/783
ORS1256	-	0/553	0/448	2	1/928	0/477	0/895	0/669	0/548	0/992
ORS1265	-	0/501	0/499	2	1/914	0/475	0/812	0/667	0/534	1/000
میانگین				2/1	1/825	0/435	0/722	0/618	0/503	0/965

آجیلی کشور نشان‌دهنده جریان بالای ژنی بین توده‌های بومی است.

در تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) مؤلفه اول ۱۶/۵۵٪ و مؤلفه دوم ۱۵/۱۶٪ از واریانس کل را توجیه می‌نماید. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) کاربرد زیادی در تجزیه تنوع ژنتیکی دارد. میزان واریانس نسبی هر مؤلفه نشان‌دهنده اهمیت آن مؤلفه در واریانس کل می‌باشد. براساس درصد تجمعی واریانس ۲ مؤلفه اول در این مطالعه که درصد کمی از واریانس کل را توجیه می‌نمایند می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آغازگرهای مورد استفاده توزیع یکنواخت و مناسبی در سطح ژنوم دارند. در تجزیه خوشه‌ای به روش Complete در نرم‌افزار NTSYS و براساس ضریب فاصله ژنتیکی Nei، ۵۰ توده آفتابگردان مورد مطالعه در ۳ گروه تقسیم‌بندی شدند (شکل ۲). گروه اول شامل ۱۵ توده، گروه دوم شامل ۱۹ توده و گروه سوم شامل ۱۶ توده می‌باشد و گروه‌ها شامل توده‌هایی از مناطق مختلف جغرافیایی کشور می‌باشند. دلایل احتمالی مختلفی برای تشابه ژنتیکی میان توده‌های مناطق گوناگون می‌تواند وجود داشته باشد. بیشتر مواد گیاهی در اصل ممکن است از منبع یکسانی معرفی شده باشند. همچنین کشاورزان در مناطق حاشیه‌ای تمایل به انتخاب

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در نرم‌افزار GenAlex نسخه ۶/۴۱ برای بررسی تمایز و تفکیک توده‌های آفتابگردان آجیلی با استفاده از داده‌های نشانگرهای ریزماهواره صورت گرفت. میزان تنوع در درون توده‌ها ۹۱٪ و بین توده‌ها ۹٪ مشاهده شد (جدول ۴). همچنین مقدار کم آماره  $\Phi$  (۰/۰۸۵) نشان‌دهنده تمایز کم بین توده‌هاست. در مطالعه‌ای، Basirnia و همکاران (۲۰۱۴) تنوع ژنتیکی و فعالیت رتروترانسپوزون‌ها را در ۱۰ توده بومی آفتابگردان آجیلی با نشانگرهای IRAP بررسی کردند. در مطالعه ایشان از ۲۵ آغازگر IRAP، ۱۱ آغازگر قادر به تولید الگوی باندهای چند شکل با وضوح بالا بودند. ۱۱ آغازگر IRAP، ۱۱۶ مکان را تکثیر نمودند که از این تعداد ۱۱۰ مکان چند شکل بود و ۸۷ درصد از تنوع ژنتیکی مربوط به درون توده‌های بومی و ۱۳ درصد مربوط به بین توده‌های بومی بود. در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵ توده بومی آفتابگردان آجیلی با نشانگرهای SSR توسط Kholghi و همکاران (۲۰۱۲) ۸۶ درصد از تنوع ژنتیکی ناشی از درون توده‌های بومی و ۱۴ درصد از تنوع مربوط به بین توده‌های بومی بود. تنوع ژنتیکی زیاد درون توده‌ای می‌تواند ناشی از خصلت دگرگرده‌افشانی آفتابگردان باشد. تنوع کم بین توده‌های بومی آفتابگردان‌های

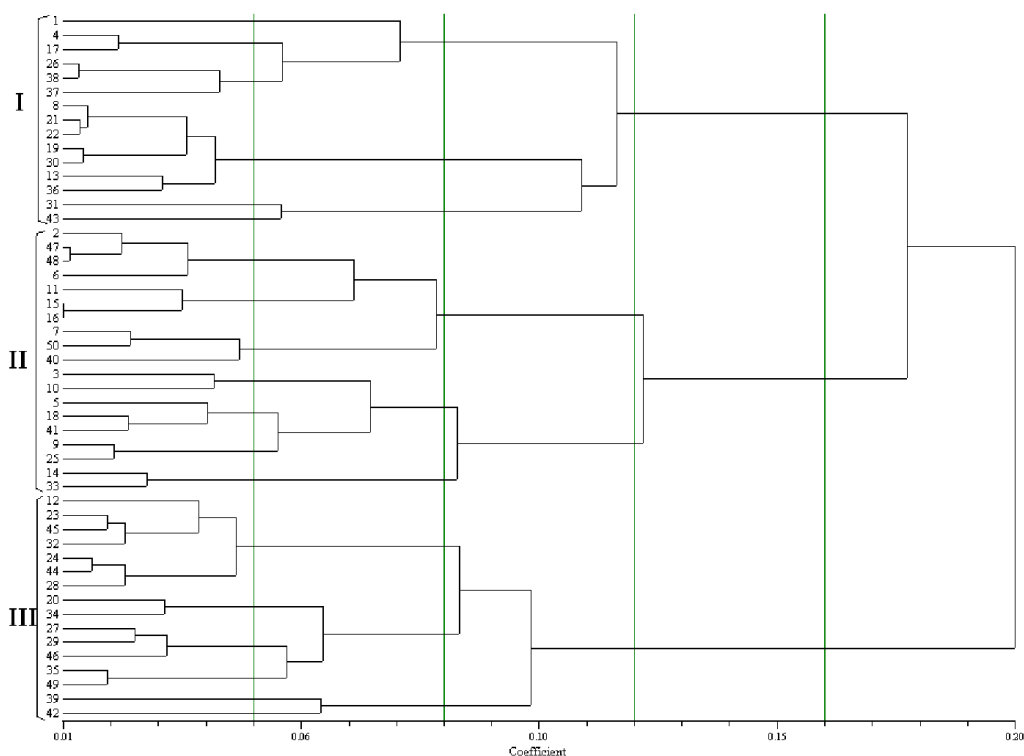
بودن جریان ژنی بین آن‌ها، قابل انتظار است (جدول ۵). هیبریداسیون بین توده‌ها با فاصله ژنتیکی زیاد می‌تواند یک استراتژی مناسب برای برنامه‌های اصلاح بین توده‌ای باشد. فاصله ژنتیکی میان جمعیت‌ها یک پارامتر با ارزش برای حفاظت ژرم‌پلاسم و نیز برای برنامه‌های اصلاحی گیاهان می‌باشد. به خوبی اثبات شده است که تلاقی بین والدین غیر مرتبط و از نظر ژنتیکی دور قدرت هیبریدی بیشتری را نسبت به تلاقی بین ژنوتیپ‌های نزدیک مرتبط نشان می‌دهد (Reif *et al.*, 2007; Solomon *et al.*, 2007).

صفات مشابه‌ای مانند: پایداری عملکرد، مقاومت به حشرات، بیماری‌ها و عوامل زنده داشته تا به نهاده‌های خارجی وابستگی کمتر داشته باشند (Boef *et al.*, 1996). حداقل فاصله ژنتیکی براساس ضریب فاصله نی (Nei genetic distance) (۰/۰۰۸)، بین توده‌های بومی سلماس (صدقیان) و پیرانشهر (سروکانی) مشاهده شد که می‌تواند ناشی از جریان بالای ژنی بین توده‌های مذکور باشد. حداکثر فاصله ژنتیکی براساس ضریب فاصله نی، (۰/۲۰۲) بین توده‌های بومی ملایر ۳ سفید و ارومیه (انگنه ۴) مشاهده گردید که بدلیل فاصله جغرافیایی و ناچیز

جدول ۴- سطوح تمایز ژنتیکی (PhiPT) بین و درون توده‌های آفتابگردان آجیلی مورد مطالعه

منبع	df	SS	MS	Est. Var.	درصد	Stat	Value	P(rand >= data)
بین توده‌ای	49	325/280	6/638	0/429	9%	Phi	0/085	0/010
درون توده‌ای	188	864/283	4/597	4/597	91%			
کل	237	1189/563	-	5/026	100%			

df = degrees of freedom; SS: sum of square; MS = mean of squares.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۵۰ توده آفتابگردان آجیلی با استفاده از داده‌های مولکولی براساس روش Complete



جدول ۵- ماتریس تشابه ژنتیکی بین تعدادی از جمعیت‌های مورد مطالعه براساس ضریب تشابه ژنتیکی Nei

Population	Population	*Nei GD	Population	Population	*Nei GD
15(Sakmas Sadaghiyan)	16 (Piranshahr-Serokani)	0/008	18 (Urmia Anghaneh 4)	34 (Malayer 3 Sefid)	0/202
47 (Saghghez 3)	48 (Saghghez 1)	0/009	36 (Mazandaran Tirtash)	40 (Marand 1389-1)	0/180
26 (Marand Dizaj-Ghalami)	48 (Saghghez 1)	0/010	1 (Piranshahr Baleban)	34 (Malayer 3 Sefid)	0/180
26 (Marand Dizaj-Ghalami)	38 (Sardasht)	0/011	18 (Urmia Anghaneh 4)	29 (Urmia Vaghghaslou-e-Sofla)	0/179
8 (Saghghez 2)	22 (Marand 1389-2)	0/011	10 (Khoy 10)	29 (Urmia Vaghghaslou-e-Sofla)	0/177
21 (Urmia Jabal kandi 2)	22 (Marand 1389-2)	0/011	3 (Boukan)	29 (Urmia Vaghghaslou-e-Sofla)	0/175
21 (Urmia Jabal kandi 2)	25 (Khoy 10)	0/012	34 (Malayer 3 Sefid)	41 (Saghghez)	0/170
19 (Miyaneh Bassin)	30 (Hamadan 2)	0/012	29 (Urmia Vaghghaslou-e-Sofla)	41 (Saghghez)	0/167

\*Pairwise Population Nei Genetic Distance

تجزیه ارتباط در آفتابگردان آجیلی باشد. با استفاده از این روش با بهره‌مندی از تنوع طبیعی ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع فنوتیپی با مدل‌های آماری مختلف از قبیل مدل خطی مخلوط (Mixed linear model) به منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی بررسی می‌شود. تعیین نشانگرهای مرتبط با صفات مهم با استفاده از تجزیه ارتباط در چندین گونه گیاهی از جمله پنبه (Abdurakhmonov *et al.*, 2008)، سورگم (Shehzad *et al.*, 2009)، آفتابگردان روغنی (Fusari *et al.*, 2012)، ذرت (Thornberry *et al.*, 2001)، توتون (Dadras *et al.*, 2014) و درختان جنگلی (Wilcox *et al.*, 2007) انجام شده است.

### سپاسگزاری

از پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه برای در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی قدردانی می‌گردد.

### REFERENCES

Abdurakhmonov IY, Kohel RJ, Yu JZ, Pepper AE, Abdullaev AA, Kushanov FN, Salakhutdinov IB, Buriev ZT, Saha S, Scheffler BE, Jenkins JN, Abdurakhmonov A (2008) Molecular

### نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر نشان داد هیچ ارتباطی بین الگوی تنوع جغرافیایی توده‌ها و تنوع مولکولی بر مبنای نشانگر SSR وجود ندارد و از آنجایی که نشانگرهای مولکولی کمتر تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرند بهتر است انتخاب والدین برای هیبریداسیون به جای تنوع جغرافیایی مبتنی بر تنوع ژنتیکی باشد. براساس درصد تجمع واریانس ۲ مولفه اول در تجزیه به مختصات اصلی نتیجه‌گیری می‌شود که آغازگرهای مورد استفاده به صورت یکنواخت و مناسب در سراسر ژنوم پراکنده‌اند. بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی درون جمعیت‌های آفتابگردان آجیلی تنوع ژنتیکی زیادی وجود دارد و جمعیت‌های مختلف ناهمگن هستند که می‌تواند ناشی از خصلت دگرگرده‌افشانی بالای آفتابگردان آجیلی باشد. بنابراین در برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان آجیلی، می‌توان انتخاب را در درون توده‌ها انجام داد. جمعیت مورد مطالعه می‌تواند یک پانل مناسب برای انجام

diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic *G. hirsutum* L. germplasm. *Genomics*. 92: 478–487.

Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE,

- Tanksley SD, Sorrells ME (1992) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36: 181-186.
- Basirnia A, Darvishzadeh R, Abdollahi Mandoulakani B, Nabipur A (2014) Assessment of genomic diversity in confectionary sunflower populations (*Helianthus annuus* L.) by using retrotransposon based IRAP markers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 6(1): 19-34.
- Binneck E, Nedel JL, Dellagostin OA (2002) RAPD analysis on cultivar identification: a useful methodology? *Revista Brasileira de Sementes*, 24: 183-196.
- Boef WS, Berg T, Haverkort B (1996) *Crop Genetic Resources. Biotechnology: Building on Farmers' Knowledge*, Bunders, J., Haverkort, B., Hiemstra, W, (Eds) London: Macmillan. Pp: 103-128.
- Dadras AR, Sabouri H, Mohammadi Nejad G, Sabouri A, Shoai-Deylami M (2014) Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. *Molecular Biology Reports*, 41(5): 3317-29.
- Darvishzadeh R, Azizi M, Hatami-Maleki H, Bernousi I, Abdollahi Mandoulakani B, Jafari M, Sarrafi A (2010) Molecular characterization and similarity relationships among sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines using some mapped simple sequence repeats. *African Journal of Biotechnology*, 9(43): 280-7288.
- Dong GJ, Liu GS, Li KF (2007) Studying genetic diversity in the core germplasm of confection sunflower (*Helianthus annuus* L.) in China based on AFLP and morphological analysis. *Russian Journal of Genetic*, 43: 627-635.
- Duca M, Port A, Şestacova T, Siniauskaya M, Akseyonova E, Davydenko O (2013) microsatellite marker application in sunflower (*Helianthus annuus* L.) fingerprinting. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(3): 3772-3775.
- Fusari CM, Rienzo JAD, Troglia C, Nishinakamasu V, Moreno MV, Maringolo C, Quiroz F, Álvarez D, Escande A, Hopp E, Heinz R, Lia VV, Paniego NB (2012) Association mapping in sunflower for sclerotinia head rot resistance. *BMC Plant Biology*, 12(93): 1-13.
- Garayalde AF, Poverene M, Cantamutto M, Carrera AD (2011) Wild sunflower diversity in Argentina revealed by ISSR and SSR markers: an approach for conservation and breeding programmes. *Annals of Applied Biology*, 158: 305-317.
- Garcia AAF, Benchimol LL, Barbosa AMM, Geraldi IO (2004) Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology*, 27: 579-588.
- Gharghani A, Zamani Z, Talaie A, Oraguzie NC, Fatahi R, Hajnajari H, Wiedow C, Gardiner SE (2009) Genetic identity and relationships of Iranian apple (*Malus × domestica*) cultivars and landraces, wild *Malus* species and representative old apple cultivars based on simple sequence repeats (SSR) marker analysis. *Genet Resource and Crop Evolution*, 13: 1-14.
- Goncalves LSA, Sudre CP, Bento CS, Moulin MM (2008) Divergencia genética em tomate estimada por marcadores RAPD em comparacao com descritores multicategóricos. *Horticultura Brasileira*, 26: 364-370.
- Goncalves LS, Rodrigues R, do Amaral Junior AT, Karasawa M (2009) Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based on morphological, agronomic and molecular data using a Ward-modified

- location model. *Genetics and Molecular Research*, 8: 364-374.
- Hvarleva TZ, Bakalova A, Chepinski I, Hristova-Cherbadji M, Hristov M, Atanasov A (2007) Characterization of Bulgarian sunflower cultivars and inbred lines with microsatellite markers. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 21: 408-412.
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 177: 309-334.
- Kholghi M, Darvishzadeh R, Bernousi I, Pirzad A, Laurentin H (2012) Assessment of genomic diversity among and within Iranian confectionery sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations by using simple sequence repeat markers, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*. 62: 488-498.
- Laurentin H (2009) Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 56: 277-292.
- Lu G, Hoefft E (2007) Sunflower. In C. Kole, & T. C. Hall (eds.), *A compendium of transgenic crop plants* Vol. 2, Oxford, Wiley-Blackwell.
- Mohammadi SA, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants: salient statistical tools and considerations. *Crop Science*. 43: 1235-1248.
- Naseri L, Darvishzadeh R, Mohseniazar M, Alizadeh A (2011) Molecular characterization and similarity relationships among some Iranian native and commercial apple (*Malus × domestica*) cultivars using simple sequence repeat markers. *Journal of Horticulture Science and Biotechnology*. 86(5): 527-533.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- Paniego N, Muñoz M, Echaide M, Fernandez L, Faccio P, Zandomeni R, Suarez E, Hopp E (1999) Microsatellite development for sunflower. *Plant and Animal Genome VII Conf.*, San Diego: Starford Univ. Press.
- Peakall, R. and Smouse P. E. (2006). GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Popov VN, Yu Urbanovich O, Kirichenko VV (2002) Studying Genetic Diversity in Inbred Sunflower Lines by RAPD and Isozyme Analyses. *Russian Journal of Genetics*. 38: 785-790.
- Reif JC, Gumpert F, Fischer S, Melchiger AE (2007) Impact of Interpopulation Divergence on Additive and Dominance Variance in Hybrid Populations. *Genetics*, 176: 1931-1934.
- Saker MM, Youssef SS, Abdallah NA, Bashandy HS (2005). Genetic analysis of some Egyptian rice genotypes using RAPD, SSR and AFLP. *African Journal of Biotechnology*, 4: 882-890.
- Shehzad T, Iwata H, Okuno K (2009) Genome-Wide association mapping of quantitative traits in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) by using multiple models. *Breeding Science*, 59: 217-227.
- Smith JSC, Hoefft E, Cole G, Lu H, Jones ES, Wall SJ, Berry DA (2009) Genetic diversity among U.S. sunflower inbreds and hybrids: assessing probability of ancestry and potential for use in plant variety protection. *Crop Science*, 49: 1295-1303.
- Solomon KF, Labuschagne MT, Viljoen CD (2007) Estimates of heterosis and association of genetic distance with heterosis in durum wheat under different moisture regimes. *Journal of Agricultural Science*, 145: 239-248.

- Souza SGH, Carpentieri-Pípolo V, Ruas CF, Carvalho VP (2008) Comparative analysis of genetic diversity among the maize inbred lines (*Zea mays* L.) obtained by studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 1202-1210.
- Sudre CP, Leonardecz E, Rodrigues R, Amaral Júnior AT (2007) Genetic resources of vegetable crops: a survey in the Brazilian germplasm collections pictured through papers published in the journals of the Brazilian Society for Horticultural Science. *Horticultura Brasileira*, 25: 496-503.
- Tang S, Knapp SJ (2003) Microsatellites uncover extraordinary diversity in Native American land races and wild populations of cultivated sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 990-1003.
- Thornsberry JM, Goodman MM, Doebley J, Kresovich S, Nielsen D, Buckler ES (2001) Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics*, 28: 286-289.
- Wilcox PL, Echt EC, Burdon RD (2007) Gene-assisted selection: applications of association genetics for forest tree breeding. In: Oraguzie NC, Rikkerink EHA, Gardiner SE, De Silva HN, editors. *Association mapping in plants*. New York: Springer; p. 211-247.
- Yu JK, Mangor J, Thompson L, Edwards KJ, Slabaugh MB, Knapp SJ (2002) Allelic diversity of simple Assessment of genomic diversity among and within Iranian confectionery sunflower 497 sequence repeats among elite inbred lines of cultivated sunflower. *Genome*, 45: 652-660.
- Zhang LS, Le Clerc V, Zhang D and Li S (2005) Establishment of an effective set of simple sequence repeat markers for sunflower variety identification and diversity assessment. *Canadian Journal of Botany*, 83: 66-72.