

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌هایی از آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) با استفاده از نشانگر مولکولی TRAP

حسین زینل‌زاده تبریزی^{۱*}، کامیل حالیل اوغلو^۲، احمد رزبان حقیقی^۳

۱. دانش‌آموخته دکتری اصلاح نباتات و پژوهشگر جهاد دانشگاهی همدان

۲. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آتاتورک ترکیه

۳. دانش‌آموخته دکترای بیولوژی مولکولی و پژوهشگر مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۲۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹)

Genetic diversity of sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.) using TRAP markers

Hossein Zeinalzadeh Tabrizi^{1*}, Kamil Haliloglu², Ahmad Razban Haghghi³

1. Ph.D. of Plant Breeding, Iranian Academic Center For Education, Culture and Research (ACECR), Hamedan, Iran

2. Professor, Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Ataturk University, Erzurum, Turkey

3. Ph.D. of Molecular Biology, East Azarbaijan Agricultural and Natural Recourses Research and Education Center, Tabriz, Iran

(Received: Nov. 18, 2015 - Accepted: Mar. 9, 2016)

Abstract

In order to investigate genetic diversity of sunflower genotypes, TRAP markers were used with six fixed and arbitrary primers. Nineteen primer combinations generated a total of 116 bands in which 109 of them were polymorphic. Restorer inbred lines with a mean of 22.76 polymorphic bands had the highest polymorphic loci (84.48 %), and Iranian hybrids with a mean of 2.97 polymorphic bands had the lowest polymorphic loci (40.52 %). Maximum and minimum genetic distances were between restorer lines and Iranian hybrids (0.151) and foreign hybrids and open pollinated cultivars (0.064), respectively. Maximum genetic similarity was between restorer and CMS lines (0.066). AMOVA analysis revealed that 87 % of total variance was within groups, and 13 % was between groups. Using UPGMA method of clustering and principal coordinate analysis, three distinctive groups were identified. Minimum similarity coefficient (0.472) was observed between R42 and CMS328 inbred lines. Results showed that TRAP marker was useful in genetic diversity estimation of sunflower genotypes. Higher similarity coefficient (0.755) for the studied genotypes indicated a narrow genetic base suggesting increasing genetic diversity of sunflower germplasm and selection of high diversity of new inbred lines in the future sunflower breeding programs.

Keywords: Genetic diversity, Molecular marker, Sunflower, TRAP.

چکیده

بمطابق بررسی تنوع ژنتیکی ۶۸ ژنوتیپ آفتابگردان از نشانگر جدید مولکولی TRAP با ۶ آغازگر ثابت و ۶ آغازگر تصادفی و ۱۹ ترکیب آغازگری استفاده شد. تمام ترکیب‌های آغازگری چند شکل بودند که در مجموع ۱۱۶ باند ایجاد کردند که ۱۰۹ تای آنها چندشکل بود. در این تحقیق لاین‌های برگرداننده باروری با میانگین ۲۲/۷۶ باند چندشکل، بیشترین جایگاه چند شکل (۸۴/۴۸ درصد) و هیبریدهای ایرانی با میانگین ۲/۹۷ باند چندشکل، کمترین جایگاه چند شکل (۴۰/۵۲ درصد) را به‌خود اختصاص دادند. بیشترین فاصله ژنتیکی بین گروه برگرداننده باروری و هیبریدهای ایرانی (۰/۱۵۱) و کمترین فاصله بین هیبریدهای خارجی و ارقام آزاد گرده‌افشان خارجی (۰/۰۶۴) بود. گروه لاین‌های برگرداننده باروری و مادری کمترین فاصله ژنتیکی را داشتند (۰/۰۶۶). بر اساس تجزیه واریانس مولکولی، ۸۷ درصد از تنوع ژنتیکی ناشی از تنوع درون گروه‌ها و ۱۳ درصد مربوط به تنوع بین گروه‌ها بود. در هر دو تجزیه خوشه‌ای و هماهنگ‌کننده‌های اصلی، گروه لاین‌های برگرداننده باروری و مادری در یک گروه، هیبریدها و ارقام خارجی در گروه مشابه و هیبریدهای ایرانی در گروه مجزا قرار گرفتند. بر اساس تجزیه خوشه‌ای کلی، پایین‌ترین ضریب تشابه (۰/۴۷۲) بین لاین‌های R42 و CMS328 محاسبه شد. نتایج نشان داد که نشانگر TRAP کارایی بسیار خوبی در گروه‌بندی و محاسبه تنوع ژنتیکی آفتابگردان دارد. با وجود تنوع ژنتیکی میان گروه‌ها و ژنوتیپ‌ها، به دلیل ضریب تشابه ژنتیکی بالای ژنوتیپ‌ها (۰/۷۵۵)، تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی پایین برآورد شد و بدین‌وسیله افزایش تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های آفتابگردان و انتخاب لاین‌های اینتر و والدینی جدید با تنوع بالا در برنامه‌های آینده اصلاح آفتابگردان پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، تنوع ژنتیکی، نشانگر مولکولی، TRAP.

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) با سطح زیرکشت ۲۴/۸ میلیون هکتار و تولید دانه ۳۷/۵ میلیون تن سالیانه از مهمترین گیاهان روغنی جهان به‌شمار می‌رود. روغن آفتابگردان با سهم ۷/۵ درصدی بعد از سویا، کلزا و پالم در ردیف چهارم قرار گرفته است (FAO, 2012). ایران با مصرف روغن حدود ۹۰۰ هزار تن در سال، ۹۰ درصد روغن مورد نیاز خود را با واردات تامین می‌کند (Anonymous, 2012). در سال ۲۰۱۲ میزان سطح زیر کشت آفتابگردان در ایران ۷۰ هزار هکتار و میزان تولید دانه ۷۸ هزار تن بوده است (FAO, 2012). کشف نرعقیمی ژنتیکی، سیتوپلاسمی^۲ و ژن‌های برگرداننده‌ی باروری^۳ در اوایل دهه ۱۹۷۰ در توسعه هیبریدهای تجاری آفتابگردان اهمیت بسیاری داشت. کاربرد بذور هیبرید و استفاده عملی از هتروزیس در اصلاح آفتابگردان خیلی دیرتر از اصلاح ذرت شروع شد، زیرا گل‌ها در آفتابگردان دوجنسه بوده و عقیم کردن مکانیکی آن برای تولید بذر در سطح وسیع عملاً امکان‌پذیر نبود. بنابراین، تولید تجارتی بذور هیبرید در آفتابگردان پس از کشف نرعقیمی سیتوپلاسمی و ژن برگرداننده باروری متناظر عملی گردید. تولید ارقام هیبرید پرمحصول و پر روغن باعث شد که این گیاه هرچه بیشتر مورد توجه قرار گرفته و سطح زیر کشت و میزان تولید آن هرچه سریع‌تر افزایش یابد (Dedio, 1992). در حال حاضر برنامه‌های اصلاح آفتابگردان سه هدف عمده افزایش عملکرد، ایجاد پایداری عملکرد دانه و روغن و یافتن منابع جدید نرعقیمی سیتوپلاسمی را دنبال می‌کنند (Gentzittel et al., 1994). کاهش طول دوره رویشی، افزایش عملکرد و ایجاد یکنواختی از طریق

تهیه هیبریدهای یک‌جانبه^۵ و سه‌جانبه^۶ از مهمترین اهداف اصلاح آفتابگردان در کشور ما به‌شمار می‌رود (Zeinalzadeh Tabrizi and Ghaffari, 2009). مهمترین مزیت هیبریدهای آفتابگردان عبارتند از: (۱) عملکرد بالا از نظر دانه و روغن (۲) یکنواختی بوته‌ها از نظر خصوصیات زراعی (۳) سهولت ایجاد مقاومت به بیماری‌های مختلف در نتاج F₁ (Dedio, 1992).

شناسایی تنوع ژنتیکی، به‌نژادگران را در امر شناسایی والدین برای انجام تلاقی‌های مطلوب یاری می‌رساند. روش‌های مختلفی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی درون جوامع گیاهی وجود دارد. ارزیابی صفات مورفولوژیکی گیاه همواره در برنامه‌های اصلاحی جهت برآورد تنوع و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها مورد استفاده بوده است، ولی با توجه به اینکه اندازه گیری صفات مورفولوژیکی برای تعداد زیادی نمونه، نیاز به صرف وقت و هزینه زیادی دارد و همچنین ارزیابی مورفولوژیکی به‌دلیل اثر محیط بر بیان ژن، ممکن است روش قابل اعتمادی برای تعیین تفاوت‌های ژنتیکی نباشد، امروزه برای بررسی تنوع ژنتیکی از نشانگرهای مولکولی نظیر AFLP، SSR، RAPD به‌طور گسترده استفاده می‌شود (Farsani et al., 2011). هر کدام از این روش‌های مولکولی برای تعیین شباهت‌ها و تفاوت‌های بین افراد، توانایی‌ها و محدودیت‌های خاص خود از قبیل تعداد نشانگر موجود، چندشکلی هر نشانگر، نحوه توارث یا مکان ژنومیک هر نشانگر را دارا هستند. بنابراین برای تخمین بدون اریب تنوع ژنتیکی موجود در یک جمعیت، توجه به انتخاب نشانگر مولکولی مناسب در کنار روش‌های تجزیه آماری متناسب حائز اهمیت می‌باشند (Friedt et al., 2007). تاکنون نشانگرهای مولکولی مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی، پیش‌بینی عملکرد هیبریدها و ارزیابی ژرم‌پلاسم آفتابگردان استفاده شده است (Cheres and Knapp, 1998;)

1. Genetic Male Sterility
2. Cytoplasmic Male Sterility
3. Fertility Restorer Genes
4. Heterosis

5. Single Cross
6. Three Way Cross

در سال‌های اخیر به‌عنوان مواد ژنتیکی گیاهی در برنامه‌های اصلاح ژنتیکی و تولید هیبریدهای جدید آفتابگردان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این ژنوتیپ‌ها شامل ۲۳ لاین پدری برگرداننده باروری^۲، ۳۰ لاین مادری نرعیقیم باروری (CMS)، ۸ هیبرید تجاری خارجی، ۳ هیبرید ایرانی و ۴ رقم تجاری آزاد گرده‌افشان خارجی بودند که مشخصات آنها در جدول ۱ آمده است.

استخراج DNA

از هر ژنوتیپ تعداد ۱۰ گیاه در شرایط گلخانه کشت شدند. نمونه‌های برگ‌های جوان ۱۵-۲۰ روزه به‌صورت بالک صورت گرفته و قبل از استخراج در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی به‌روش بهینه‌سازی شده Zeinalzadeh Tabrizi و همکاران (۲۰۱۵) برای گیاه آفتابگردان استخراج شده و در مقدار ۱۵۰ µl Tris 10mM, EDTA 1mM; TE; pH 8.0) حل شد. کمیت و کیفیت DNAهای ژنومی استخراجی با استفاده از نسبت $A_{260}/A_{280} \approx 1.8$ و برای آلودگی پروتئینی و نسبت $A_{260}/A_{230} \approx 2$ برای ترکیبات فنلی و پلی‌ساکاریدی با استفاده از طول موج دستگاه اسپکتروفوتومتر ND-3300 (NanoDrop spectrophotometer Technologies, USA) اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، کیفیت DNAهای ژنومی استخراجی با استفاده الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر 1X SB به‌مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. اندک نمونه‌های دارای اسمیر حذف و استخراج دو باره برای آنها انجام شد.

انتخاب آغازگرهای TRAP

آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق شامل ۶ آغازگر ثابت و ۶ آغازگر تصادفی بود (Yue et al., 2009).

Gentzbittel et al., 1994; Iqbal et al., 2008; Darvishzadeh et al., 2010; Kholghi et al., 2012; Basimia et al., 2014; Hongtrakul et al., 1997; Yue et al., 2009; Lawson et al., 1994; Liu and Bruke, 2003).

نشانگر مولکولی جدید (TRAP Target Region) (Amplification Polymorphism) برای اولین بار در آفتابگردان در سال ۲۰۰۳ توسط Hu و Vick (۲۰۰۳) مورد استفاده قرار گرفت. در این نشانگر از توالی‌های بیان شده برچسب‌دار^۱ (EST) از پروژه ژنوم *Compositae* برای آفتابگردان استفاده می‌شود. در این نشانگر از یک آغازگر ثابت طراحی شده برای توالی بیان شده برچسب‌دار و یک آغازگر تصادفی برای ایجاد نشانگر چندشکل استفاده می‌شود. این نشانگر بین ۳۰-۵۰ قطعه چندشکل ایجاد می‌کند و به این دلیل جزو نشانگرهای با درجه چندشکلی بالا به‌شمار می‌رود (Hu and Vick, 2003). با وجود بیش از ۱۲ سال از معرفی این نشانگر، هنوز در مورد استفاده از آن برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در آفتابگردان در کشور گزارشی منتشر نشده است. هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی مواد گیاهی ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوی که در سال‌های اخیر در برنامه‌های اصلاح آفتابگردان روغنی در کشور مورد استفاده قرار گرفته‌اند و همچنین استفاده از نشانگر مولکولی جدید TRAP برای بررسی تنوع ژنتیکی آفتابگردان و تعیین گروه‌های هتروتیپ بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

۶۸ ژنوتیپ مورد بررسی در این آزمایش همگی از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی - ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوی تهیه شدند که

جدول ۱. مشخصات ژنوتیپ‌های آفتابگردان مورد بررسی

ردیف	نام ژنوتیپ	نوع ژنوتیپ	ردیف	نام ژنوتیپ	نوع ژنوتیپ
۱	R 2	برگشت‌دهنده باروری (R)	۳۵	Berezanski	آزادگرده‌افشان خارجی
۲	R 3	برگشت‌دهنده باروری (R)	۳۶	Master	آزادگرده‌افشان خارجی
۳	R 5	برگشت‌دهنده باروری (R)	۳۷	Zaria	آزادگرده‌افشان خارجی
۴	R 15	برگشت‌دهنده باروری (R)	۳۸	Record	آزادگرده‌افشان خارجی
۵	R 19	برگشت‌دهنده باروری (R)			
۶	R 21	برگشت‌دهنده باروری (R)	۳۹	CMS 16	نر عقیم باروری (CMS)
۷	R 22	برگشت‌دهنده باروری (R)	۴۰	CMS 26	نر عقیم باروری (CMS)
۸	R 23	برگشت‌دهنده باروری (R)	۴۱	CMS 28	نر عقیم باروری (CMS)
۹	R 24	برگشت‌دهنده باروری (R)	۴۲	CMS 30	نر عقیم باروری (CMS)
۱۰	R 26	برگشت‌دهنده باروری (R)	۴۳	CMS 32	نر عقیم باروری (CMS)
۱۱	R 27	برگشت‌دهنده باروری (R)	۴۴	CMS 36	نر عقیم باروری (CMS)
۱۲	R 29	برگشت‌دهنده باروری (R)	۴۵	CMS 38	نر عقیم باروری (CMS)
۱۳	R 33	برگشت‌دهنده باروری (R)	۴۶	CMS 40	نر عقیم باروری (CMS)
۱۴	R 34	برگشت‌دهنده باروری (R)	۴۷	CMS 42	نر عقیم باروری (CMS)
۱۵	R 38	برگشت‌دهنده باروری (R)	۴۸	CMS 44	نر عقیم باروری (CMS)
۱۶	R 41	برگشت‌دهنده باروری (R)	۴۹	CMS 46	نر عقیم باروری (CMS)
۱۷	R 42	برگشت‌دهنده باروری (R)	۵۰	CMS 54	نر عقیم باروری (CMS)
۱۸	R 43	برگشت‌دهنده باروری (R)	۵۱	CMS 58	نر عقیم باروری (CMS)
۱۹	R 46	برگشت‌دهنده باروری (R)	۵۲	CMS 78	نر عقیم باروری (CMS)
۲۰	R 50	برگشت‌دهنده باروری (R)	۵۳	CMS 82	نر عقیم باروری (CMS)
۲۱	R 53	برگشت‌دهنده باروری (R)	۵۴	CMS 96	نر عقیم باروری (CMS)
۲۲	R 55	برگشت‌دهنده باروری (R)	۵۵	CMS 110	نر عقیم باروری (CMS)
۲۳	R 56	برگشت‌دهنده باروری (R)	۵۶	CMS 154	نر عقیم باروری (CMS)
			۵۷	CMS 212	نر عقیم باروری (CMS)
۲۴	Armada-GL	هیبرید تجاری خارجی	۵۸	CMS 222	نر عقیم باروری (CMS)
۲۵	ES-Biba	هیبرید تجاری خارجی	۵۹	CMS 234	نر عقیم باروری (CMS)
۲۶	ES-Karamba	هیبرید تجاری خارجی	۶۰	CMS 262	نر عقیم باروری (CMS)
۲۷	Brocar-RM	هیبرید تجاری خارجی	۶۱	CMS 298	نر عقیم باروری (CMS)
۲۸	Euroflor	هیبرید تجاری خارجی	۶۲	CMS 310	نر عقیم باروری (CMS)
۲۹	Tekny	هیبرید تجاری خارجی	۶۳	CMS 328	نر عقیم باروری (CMS)
۳۰	Allstar	هیبرید تجاری خارجی	۶۴	CMS 330	نر عقیم باروری (CMS)
۳۱	Sor	هیبرید تجاری خارجی	۶۵	CMS 354	نر عقیم باروری (CMS)
			۶۶	CMS 358	نر عقیم باروری (CMS)
۳۲	R453	هیبرید ایرانی	۶۷	CMS 376	نر عقیم باروری (CMS)
۳۳	43/128	هیبرید ایرانی	۶۸	CMS 502	نر عقیم باروری (CMS)
۳۴	Azargol	هیبرید ایرانی			

کلراید 25 mM MgCl_2 ، $0.5 \mu\text{L}$ از 10 mM dNTP، $0.5 \mu\text{L}$ 100 pmol از هر آغازگر و $1/5$ واحد آنزیم تک پلیمرز انجام شد. چرخه‌های دمایی در برنامه touch down PCR به صورت زیر انجام شد: برای واسرشت‌سازی DNA ۱ چرخه در دمای 94°C به مدت ۲ دقیقه، ۵ چرخه شامل 94°C به مدت ۴۵ ثانیه، 35°C به مدت ۴۵ ثانیه و 73°C به مدت ۱ دقیقه بود. سپس ۳۵ چرخه بعدی شامل 94°C به مدت ۴۵ ثانیه، 50°C به مدت ۴۵ ثانیه و 73°C به مدت ۱ دقیقه بود. دمای اتصال برای همه ترکیبات آغازگری ثابت بود.

مشخصات این آغازگرها در جدول ۲ آمده است. به دلیل چندشکلی بسیار بالای نشانگر TRAP که حدود ۳۰-۵۰ ردیف چندشکل از خود نشان می‌دهد تنها از ۱۹ ترکیب آغازگری برای ایجاد نشانگر TRAP استفاده شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ۹۶ تایی Multi Gene (TC9600-G-) Gradient Thermal Cycler (230V, Labnet International, Inc. در حجم نهایی $20 \mu\text{L}$ شامل $1 \mu\text{L}$ DNA ژنومی با مقدار $50-30 \text{ ng}/\mu\text{L}$ بافر $10X \text{ PCR}$ ، $1 \mu\text{L}$ منیزیم

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای ثابت و تصادفی استفاده شده برای نشانگر TRAP

نام آغازگر	توالی بیان شده برچسب‌دار (EST) یا شماره بانک ژنی	توالی 5'-3'
آغازگر ثابت		
MSP03	Putative male-sterile gene	GTTGCCATGGACATCAACAC
A11D14F	QHA11D14	GGGGTTCTAAACAAGGTG
B14G14B	QHB14G14	AATCTCAAGGACAAAAGG
F15O11F1	QHF15O11	CTGGAGCCAAGACATCTG
K11F05	QHK11F05	GAACCAAAGTGGGGTATGTA
MAX3BR	AT2G44990	ACGTTATGAGCCCCATGAAGA
آغازگر تصادفی		
TRAP03	IR-700	CGTAGCGCGTCAATTATG
Sa12	IR-700	TTCTAGGTAATCCAACAACA
Sa4	IR-700	TTCTTCTCCCTGGACACAAA
TRAP13	IR-800	GCGCGATGATAAATTATC
Ga3	IR-800	TCACTCAAACCATCTACAC
Ga5	IR-800	GGAACCAAACACATGAAGA

واکنش‌های TRAP

با استفاده از ۶ آغازگر ثابت و ۶ آغازگر تصادفی و ۱۹ ترکیب آغازگری، ۵ گروه ژنوتیپ‌های آفتابگردان از نظر تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. تمام ترکیب‌های آغازگری چند شکل بودند (جدول ۳). آشکارسازی قطعات با استفاده از الکتروفورز ژل آکریلامید ۶ درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید با استفاده از روش Wang و همکاران (۲۰۰۳) و بهینه سازی شده برای نشانگر TRAP توسط Zeinalzadeh Tabrizi (۲۰۱۵) به مدت ۱ ساعت و ۴۵ دقیقه در ۲۰۰ ولت انجام شد. عکس‌برداری با استفاده از دوربین Nikon Coolpix500 و دستگاه ژل داگ (Vilber Lourmat, France) انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

باند‌های حاصل از ۱۹ ترکیب آغازگری به صورت صفر (عدم حضور)، ۱ (حضور) و ۹ (عدم تکثیر و یا از دست رفته) نمره‌دهی شدند. تعداد آلل، تعداد آلل چندشکل، محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) و درصد چندشکلی هر نشانگر یا ترکیب آغازگری محاسبه شد (جدول ۳). تنوع ژنتیکی درون گروه‌ها با استفاده از ضریب Nei و همکاران (۱۹۸۳) و ضریب اطلاعات شانون (Lewontin 1995) با استفاده از نرم‌افزار Popgen (Yeh *et al.*, 1997) محاسبه شد. تنوع ژنتیکی بین گروه‌ها نیز با استفاده از ضریب Nei و همکاران (۱۹۸۳) با استفاده از نرم‌افزار Popgen (Yeh *et al.*, 1997) محاسبه شد. الگوی باندی بین گروه‌ها، تجزیه واریانس

نتایج و بحث

در این تحقیق ۶ آغازگر ثابت و ۶ آغازگر تصادفی ۱۹ ترکیب آغازگری ایجاد کردند که همگی الگوی باندی شفاف و قابل نمره‌دهی ایجاد کردند (شکل ۱). تمام ترکیبات آغازگری باند چندشکل ایجاد کردند که ترکیب آغازگری شماره ۱۷ با محتوای چندشکل ۰/۴۹ چندشکل‌ترین جایگاه بود (جدول ۳). از میان ۱۱۶ باند ایجاد شده توسط نشانگر TRAP، ۱۰۹ تای آنها چندشکل بود. میانگین تعداد باندهای چندشکل ۵/۷۹ بود. اندازه قطعات آشکار شده بین ۹۲۰-۲۵ جفت باز بود. محتوای اطلاعات چندشکل این نشانگر بین ۰/۰۳ و ۰/۵۰ با میانگین ۰/۳۳ بود (جدول ۳).

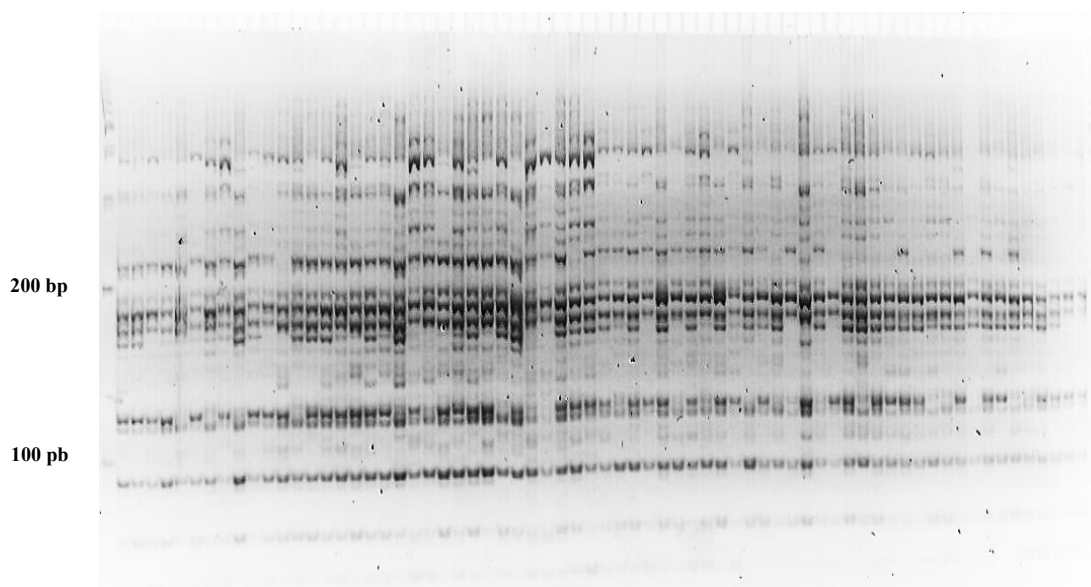
مولکولی (AMOVA) و تجزیه به هماهنگ‌کننده‌های اصلی (PCoA) نیز با استفاده از نرم‌افزار GenAlex (Peakall and Smouse, 2006) محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای بین گروه‌ها با استفاده از ضریب فاصله Nei و همکاران (۱۹۸۳) و بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس [2a/(2a+b+c)] و روش UPGMA انجام شد. برای انتخاب بهترین ضریب فاصله و یا تشابه و روش خوشه‌بندی از ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس فاصله یا تشابه با ماتریس ضرایب آلفای حاصل از دندروگرام با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc (Rohlf, 1992) محاسبه شد.

جدول ۳. تعداد ال، محتوای اطلاعات چند شکل و درصد چندشکلی نشانگرهای TRAP

شماره	آغازگر ثابت	آغازگر تصادفی	تعداد ال	تعداد ال چندشکل	محتوی اطلاعات چندشکل (PIC)	درصد چندشکل
۱	MSP03	TRAP03	11	11	43.0	100%
۲	MSP03	Sa12	5	5	0.42	100%
۳	MSP03	Sa4	11	11	0.36	100%
۴	A11D14F	TRAP03	11	10	0.27	90.1%
۵	A11D14F	Sa12	3	2	0.31	66.7%
۶	A11D14F	Sa4	5	4	0.39	80%
۷	B14G14B	Sa4	2	2	0.47	100%
۸	F15O11F1	TRAP03	8	7	0.22	87.5%
۹	F15O11F1	Sa12	6	6	0.38	100%
۱۰	F15O11F1	Sa4	5	5	0.21	100%
۱۱	F15O11F1	TRAP13	8	6	0.25	75%
۱۲	K11F05	TRAP03	3	2	0.13	66.7%
۱۳	K11F05	Sa12	5	4	0.24	80%
۱۴	K11F05	Sa4	5	5	0.21	100%
۱۵	K11F05	Ga3	6	6	0.43	100%
۱۶	MAX3BR	TRAP03	5	4	0.30	80%
۱۷	MAX3BR	Sa12	7	7	0.49	100%
۱۸	MAX3BR	Sa4	5	5	0.37	100%
۱۹	MAX3BR	Ga5	5	5	0.26	100%

نسبت به تحقیق (Yue *et al.*, 2009) را می‌توان به استفاده آنها از روش تجزیه و تحلیل توالی و استفاده از رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید در این تحقیق مرتبط دانست. دستگاه‌های تجزیه و تحلیل توالی کاپیلاری سیستم در کنار گرانیقیمت بودن حساسیت بیشتری در آشکارسازی قطعات DNA دارند و از این رو بیشتر بودن تعداد باندها در آزمایش آنها و کمتر بودن تعداد باندها در تحقیق حاضر قابل انتظار بود.

Yue و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۷۷ لاین اینبرد آفتابگردان با استفاده از نشانگر TRAP از ۱۲ ترکیب آغازگری استفاده کردند که در مجموع ۲۳۰ باند چندشکل ایجاد نمود. میانگین باندهای ایجاد شده ۱۹/۲ و محتوای چند شکل نشانگر بین ۰/۰۲ و ۰/۵۰ بود. قطعات DNA بین ۳۸ تا ۱۰۴۲ جفت باز بود. کمتر بودن تعداد قطعات ایجاد شده در هر ترکیب آغازگری در این تحقیق



شکل ۱. تصویر ژل اکریلامید حاصل از ترکیب آغازگری MSP03 به‌عنوان آغازگر ثابت و TRAP03 به‌عنوان آغازگر تصادفی در بررسی تنوع ژنتیکی ۶۸ ژنوتیپ آفتابگردان با استفاده از نشانگر TRAP

میانگین ۲۲/۷۶ باند چندشکل بیشترین جایگاه چندشکل (۸۴/۴۸ درصد) و هیبریدهای ایرانی با میانگین ۲/۹۷ باند چندشکل کمترین جایگاه چندشکل (۴۰/۵۲ درصد) را به‌خود اختصاص دادند. میانگین تعداد باندهای چندشکل در درصد جایگاه‌های چندشکل در بین ۵ گروه مورد ارزیابی به‌ترتیب ۱۳/۱۶ و ۶۷/۰۷ درصد بود (جدول ۴). نسبت بالای چندشکلی مشاهده شده در گروه لاین‌های برگرداننده باروری را می‌توان به بالا بودن تنوع ژنتیکی جمعیت والدین لازم برای انجام اینبریدینگ و تولید لاین‌های برگرداننده باروری از آنها

در این تحقیق حدود ۵۰ درصد محتوای چندشکل باندهای چندشکل بین ۰/۴۵ و ۰/۵۰ بود که کاملاً با نتایج (Yue *et al.*, 2009) مطابقت داشت. در بررسی دیگری (Alwala *et al.*, 2006) روی ۳۰ ژنوتیپ چغندرقد با استفاده از نشانگر TRAP از ۱۸ ترکیب آغازگری استفاده شد که ۶۰۰ باند ایجاد کردند که ۵۲۹ تای آنها چندشکل بود. بزرگی قطعات بین ۱۰۰ الی ۷۰۰ جفت باز و محتوای چندشکل بین ۰/۱۱ و ۰/۳۶ و میانگین ۰/۲۴ بود. میانگین باندهای چندشکل ۲۹/۳۸ بود. در این تحقیق لاین‌های برگرداننده باروری با

برای شروع برنامه اصلاحی دانست که در برنامه اصلاح آفتابگردان در ایران از جمعیت هیبریدهای خارجی (Farrokhi, 2004) وارداتی انتخاب و گزینش شده‌اند (Ghaffari and

جدول ۴. تعداد باندهای چند شکل، شاخص اطلاعات شانون، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و درصد جایگاه‌های چند شکل در ژنوتیپ‌های آفتابگردان

گروه‌ها	N	Na	Ne	I	He	UHe	PP%
لاین‌های برگشت‌دهنده باروری (R)	22.767	1.802	1.532	0.452	0.305	0.312	84.48%
هیبریدهای تجاری خارجی (FH)	7.974	1.698	1.574	0.453	0.314	0.335	75.00%
هیبریدهای ایرانی (IH)	2.974	1.259	1.309	0.246	0.170	0.204	40.52%
ارقام آزاد گرده‌افشان خارجی (FOP)	3.966	1.466	1.414	0.330	0.228	0.261	55.17%
لاین‌های نرعیقیم سیتوپلاسمی (CMS)	28.138	1.759	1.503	0.432	0.291	0.296	80.17%
مجموع	13.164	1.597	1.467	0.383	0.262	0.282	67.07%

R: Restorer; FH: Foreign Hybrid; IH: Iranian Hybrid; FOP: Foreign Open Pollinated; CMS: Cytoplasmic Male Sterility
 N: تعداد باند، Na: تعداد ال متفاوت، Ne: تعداد ال‌های مؤثر، I: $1 / (p^2 + q^2)$ شاخص اطلاعات شانون (تنوع ژنی، He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، UHe: $2 * p * q$ (Nei, 1973 #670) نامتعادل هتروزیگوسیتی مورد انتظار، (Nei et al., 1978) * $(2N / (2N-1))$ PP% درصد چند شکلی.

الگوی باندی در نشانگر TRAP

اختصاصی در این نشانگر را می‌توان به اتصال یکی از آغازگرهای ثابت حاصل از EST (MSP03) به جایگاه ژن کاندیدای نرعیقیم ژنتیکی در آفتابگردان دانست (جدول ۲) که در آزمایش (Yue et al., 2009) گزارش شده است. بدین ترتیب این ویژگی اختصاصی نشانگر TRAP می‌تواند در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های آفتابگردان در برنامه‌های اصلاحی آتی مورد توجه قرار بگیرد.

گروه لاین‌های برگرداننده باروری (R) و مادری (CMS) هر کدام با تولید ۱۱۱ باند و گروه هیبریدهای ایرانی (IH) با ۹۹ باند به ترتیب بیشترین و کمترین گروه باندی را به خود اختصاص دادند. از طرف دیگر گروه لاین‌های مادری با ۳ باند اختصاصی و گروه هیبریدهای خارجی با ۱ باند اختصاصی به خوبی توسط این نشانگر از سایر گروه‌ها جدا شدند (جدول ۵). علت وجود باندهای

جدول ۵. الگوی باندی در نشانگر TRAP

	R	FH	IH	FOP	CMS
تعداد باند متفاوت	111	110	99	106	111
تعداد باندهای متفاوت با فراوانی ۵٪ و بیشتر	105	110	99	106	108
تعداد باند اختصاصی	0	1	0	0	3

لاین‌های برگشت‌دهنده باروری (R)، هیبریدهای تجاری خارجی (FH)، هیبریدهای ایرانی (IH)، ارقام آزاد گرده‌افشان خارجی (FOP)، لاین‌های نرعیقیم سیتوپلاسمی (CMS).

تنوع ژنتیکی درون و بین گروه‌ها

کمترین تنوع درون گروهی را داشتند (جدول ۴). بر اساس این دو شاخص، میانگین تنوع ژنتیکی گروه‌ها به ترتیب ۰/۲۸۲ و ۰/۳۸۳ بود. این دو شاخص مهم در تعیین تنوع ژنتیکی بین گروه‌ها و جمعیت‌ها به گسترده استفاده می‌شوند و همواره بایستی با همدیگر در تناسب و هماهنگی باشند. بیشتر بودن تنوع ژنتیکی بالاتر گروه

بر اساس ضریب تنوع ژنی Nei و همکاران (۱۹۸۳) و شاخص اطلاعات شانون (Lewontin, 1995)، گروه لاین‌های برگرداننده باروری به ترتیب با مقادیر ۰/۳۱۲ و ۰/۴۵۲ با بیشترین تنوع درون گروهی و گروه هیبریدهای ایرانی به ترتیب با مقادیر ۰/۲۰۴ و ۰/۲۴۶

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)

بر اساس تجزیه واریانس مولکولی، ۸۷ درصد از تنوع ژنتیکی ناشی از تنوع درون گروه‌ها و ۱۳ درصد مربوط به تنوع بین گروه‌ها بود (جدول ۷). تنوع درون گروهی زیاد می‌تواند ناشی از ماهیت دگرگشن گیاه آفتابگردان باشد. نتایج به دست آمده دقیقاً مشابه گزارش Basirnia و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی آفتابگردان آجیلی با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی IRAP بود. همچنین گزارش مشابهی در مطالعه تنوع ژنتیکی توده‌های بومی آفتابگردان آجیلی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره وجود دارد. در بررسی Kholghi و همکاران (۲۰۱۲) ۸۶ درصد تنوع، درون توده‌ای و ۱۴ درصد بین توده‌ای بود.

لاین‌های برگرداننده باروری نسبت به گروه هیبریدهای ایرانی را می‌توان به انتخاب آنها از میان جمعیت پایه‌ای وسیعتری نسبت داد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین گروه برگرداننده باروری و هیبریدهای ایرانی (۰/۱۵۱) بود. کمترین فاصله و یا به عبارتی بیشترین شباهت ژنتیکی بین هیبریدهای خارجی و ارقام آزاد گرده‌افشان خارجی (۰/۰۶۴) بود (جدول ۶). نتایج این تجزیه و تحلیل با نتایج قسمت چندشکلی مشابه بود. گروه لاین‌های برگرداننده باروری و مادری کمترین فاصله ژنتیکی را دارا بودند (۰/۰۶۶). این دو گروه لاین‌های اینبرد در سالهای اخیر از جمعیت ارقام و هیبریدهای وارداتی به ایران جهت برنامه‌های اصلاحی گزینش و خالص‌سازی شده‌اند. بدین ترتیب کمتر بودن فاصله ژنتیکی این دو گروه با هیبریدهای خارجی و ارقام آزاد گرده‌افشان خارجی را در این راستا می‌توان دانست.

جدول ۶. ماتریس فاصله ژنتیکی بین گروه‌ها با استفاده از ضریب فاصله نامتعادل نی

گروه‌ها	R	FH	IH	FOP	CMS
R					
FH	0.071				
IH	0.151	0.109			
FOP	0.110	0.064	0.113		
CMS	0.066	0.071	0.139	0.085	

لاین‌های برگشت‌دهنده باروری (R)، هیبریدهای تجاری خارجی (FH)، هیبریدهای ایرانی (IH)، ارقام آزاد گرده‌افشان خارجی (FOP)، لاین‌های نرعمیم سیتوپلاسمی (CMS).

جدول ۷. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) گروه‌ها با استفاده از نشانگر TRAP

درصد واریانس	واریانس محاسبه شده	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع تغییرات
13%	870.2	204.51	815.204	4	بین گروه‌ها
87%	431.18	431.18	141.1161	63	درون گروه‌ها
100%	301.21		956.1365	67	کل

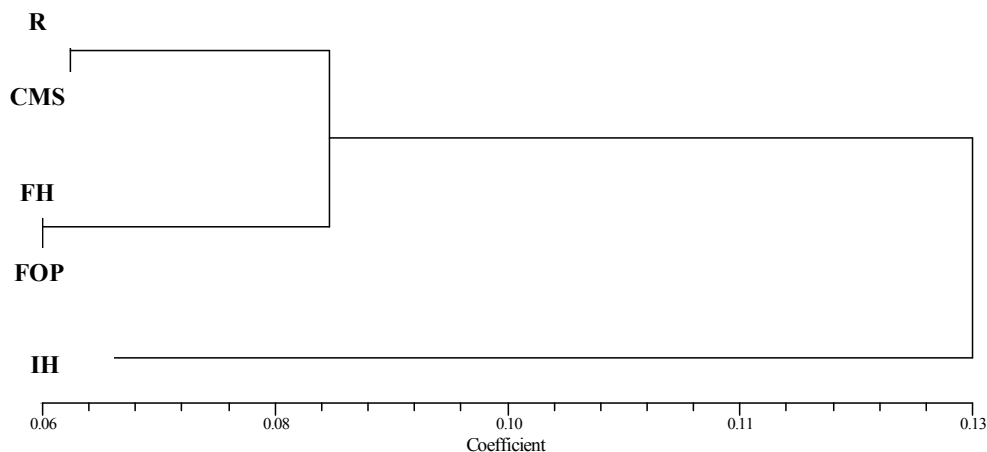
تجزیه خوشه‌ای گروه‌ها

برای بررسی و فهم بهتر ارتباط بین گروه‌ها، بر اساس فاصله ژنتیکی Nei و همکاران (۱۹۸۳) تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انجام شد. در این تجزیه از سه ضریب فاصله ژنتیکی مختلف (دایس، تطابق ساده و جاکارد) و سه روش خوشه‌بندی مختلف (UPGMA,)

Single Linkage و Complete Linkage) استفاده شد و بر اساس بالاترین ضریب همبستگی کوفتیک، فاصله ژنتیکی Nei و روش UPGMA انتخاب شد. بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل‌های قبلی، قرار گرفتن گروه لاین‌های برگرداننده باروری و مادری در یک گروه به همراه قرار گرفتن هیبریدها و ارقام خارجی در

گروه مشابه کاملاً قابل انتظار بود. قرار گرفتن هیبریدهای ایرانی در گروه مجزا از سایر گروه‌ها وجود فاصله ژنتیکی زیاد این گروه را در دندروگرام

مشخص تر کرد. بنا بر دندروگرام حاصل، دو گروه هتروتیک هیبریدهای ایرانی و سایر ژنوتیپ‌ها قابل استنباط است (شکل ۱).

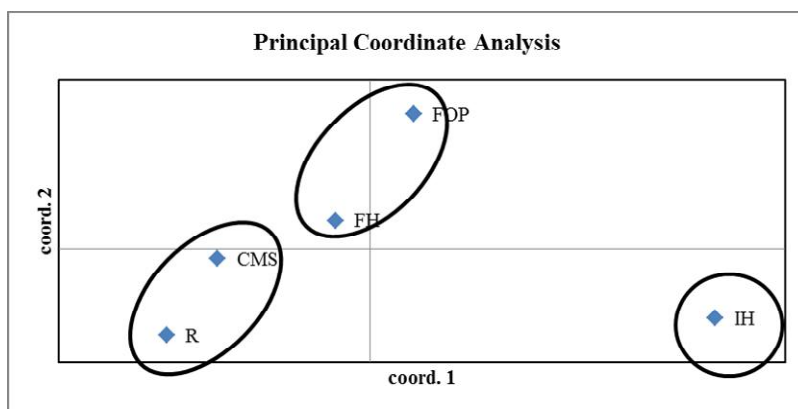


شکل ۲. تجزیه خوشه‌ای گروه‌ها با استفاده از ضریب فاصله ژنتیکی Nei و همکاران (۱۹۸۳) و روش UPGMA لاین‌های برگشت‌دهنده باروری (R)، هیبریدهای تجاری خارجی (FH)، هیبریدهای ایرانی (IH)، ارقام آزاد گرده‌افشان خارجی (FOP)، لاین‌های نرعیتم سیتوپلاسمی (CMS)

در مجموع ۸۶/۹۴ درصد واریانس کل را توجیه کردند. بر اساس نمودار دوبعدی حاصل از دو هماهنگ‌کننده اول، لاین‌های برگرداننده باروری و مادری در یک گروه، هیبریدها و ارقام خارجی در یک گروه و هیبریدهای ایرانی در گروهی کاملاً مجزا قرار گرفتند (شکل ۲).

تجزیه به هماهنگ‌کننده‌های اصلی (PCoA)

برای فهم هرچه بهتر تنوع ژنتیکی بین گروه‌ها و همچنین به دلیل یکسان نبودن تعداد ژنوتیپ‌های گروه‌ها، تجزیه به هماهنگ‌کننده‌های اصلی با استفاده از ضریب فاصله ژنتیکی نامتعادل Nei و همکاران (۱۹۸۳) انجام شد. سه هماهنگ‌کننده اول



شکل ۳. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های آفتابگردان در نمودار دوبعدی حاصل از دو هماهنگ‌کننده اول در تجزیه به هماهنگ‌کننده‌های اصلی لاین‌های برگشت‌دهنده باروری (R)، هیبریدهای تجاری خارجی (FH)، هیبریدهای ایرانی (IH)، ارقام آزاد گرده‌افشان خارجی (FOP)، لاین‌های نرعیتم سیتوپلاسمی (CMS)

بود که دلیل آن را به کم شدن تنوع اللی، کمتر شدن سهم جایگاه‌های چندشکل و کمتر شدن هتروزیگوسیتی مورد انتظار را نسبت داده‌اند. در آزمایش Darvishzadeh و همکاران (۲۰۱۰) برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ ژنوتیپ آفتابگردان از تجزیه به هماهنگ‌کننده‌های اصلی برای درک بهتر گروه‌بندی انجام شده توسط تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. سه مولفه اول ۳۴/۰۵ درصد واریانس کل را توجیه کردند و نتیجه گرفتند که نتایج هر دو تجزیه هماهنگ‌کننده‌های اصلی و خوشه‌ای مشابه بود.

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها

به منظور تعیین روابط ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تجزیه خوشه‌ای کلی با حضور تمامی ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه نی و لی یا دایس انجام شد. این ضریب تشابه یکی از پرکاربردترین ضرایب در بررسی فاصله ژنتیکی می‌باشد. در این تجزیه از سه ضریب فاصله ژنتیکی مختلف (دایس، تطابق ساده و جاکارد) و سه روش خوشه‌بندی مختلف (UPGMA, Single Linkage و Complete Linkage) استفاده شد و بر اساس بالاترین ضریب همبستگی کوفتیک، فاصله تشابه ژنتیکی دایس و روش UPGMA انتخاب شد. بر اساس ۱۱۶ باند چندشکل TRAP، پایین‌ترین ضریب تشابه ۰/۴۷۲ (بین لاین‌های R42 و CMS328) و بالاترین ضریب تشابه ۰/۹۲۰ (بین لاین‌های CMS38 و CMS54) و میانگین ۰/۷۲۴ محاسبه شد (شکل ۳). میانگین ضریب تشابه گروه لاین‌های برگرداننده باروری (۰/۷۰۱) نسبت به سایر گروه‌ها در کمترین مقدار بوده که نشان‌دهنده بیشتر بودن تنوع ژنتیکی این گروه در مقایسه با گروه‌های دیگر است و با نتایج به‌دست آمده از سایر تجزیه‌ها مطابقت دارد.

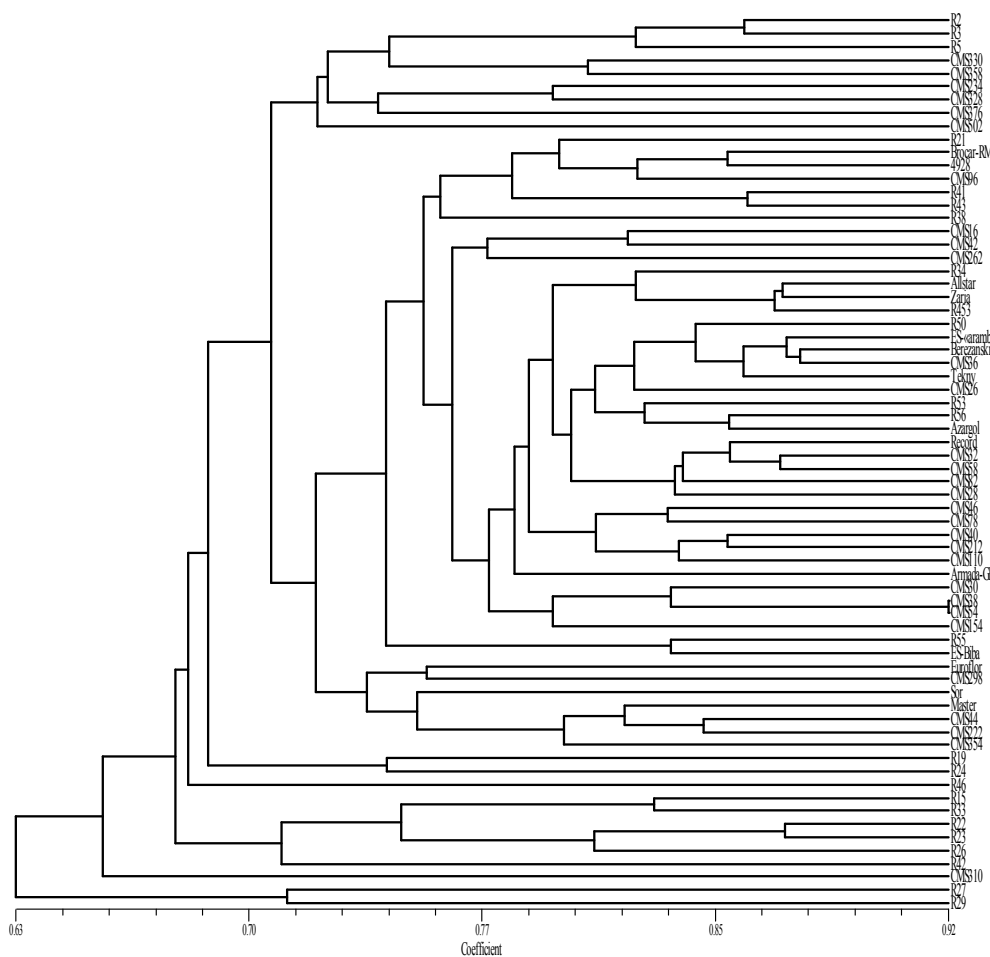
در گیاهانی دگرگشن مانند آفتابگردان یکی از عوامل انتخاب لاین‌های والدین برای تلاقی و بهره‌مندی از پدیده هتروزیس و تولید هیبرید، فاصله

تجزیه به مولفه‌های اصلی و یا هماهنگ‌کننده‌های اصلی با استفاده از ماتریس شباهت و یا فاصله موجب گروه‌بندی افراد در یک نمودار دو بعدی یا سه بعدی می‌شود. فاصله هندسی ایجاد شده بر روی نمودار در حقیقت بازتاب فاصله ژنتیکی بین افراد هست. تفاوت این دو روش در استفاده از ماتریس اولیه برای تجزیه می‌باشد. تجزیه به هماهنگ‌کننده‌های اصلی از یک ماتریس اولیه شباهت و یا فاصله ژنتیکی برای تجزیه استفاده می‌کند در حالیکه در تجزیه به مولفه‌های اصلی از ماتریس اولیه داده‌ها مانند وجود یا عدم وجود ال‌ها (۰ عدم وجود باند و ۱ وجود باند) استفاده می‌کند. در صورت کم بودن تعداد صفات و عدم وجود داده‌های گمشده، نتایج این دو تجزیه تقریباً مشابه خواهد بود (Mohammadi and Prasanna, 2003). Rohlfs (۱۹۷۲) پیشنهاد کرد در صورت داشتن داده‌های گمشده بجای استفاده از تجزیه به مولفه‌های اصلی از تجزیه به هماهنگ‌کننده‌های اصلی استفاده شود زیرا در تجزیه به مولفه‌های اصلی در صورت وجود داده گمشده زیاد، از میانگین گروه برای آن داده‌ها استفاده می‌شود و این کار باعث وجود خطا در تجزیه و تحلیل نهایی و قرار گرفتن افراد دارای داده گمشده در یک گروه می‌شود (Mohammadi, 2006).

در آزمایش Hongtrakul و همکاران (۱۹۹۷) با استفاده از نشانگر AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۳ لاین برگرداننده باروری و مادری، سه مولفه اول در مجموع ۳۴ درصد واریانس کل را توجیه کردند و ژنوتیپ‌ها در نمودار دو بعدی بخوبی از هم تفکیک شدند. در آزمایش Cronn و همکاران (۱۹۹۷) دو مولفه اول ۳۴/۱ درصد واریانس کل را توجیه کرد. در آزمایش آنها نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی با تجزیه به هماهنگ‌کننده‌های اصلی مشابه بود اما به دلیل وجود داده‌های گمشده تجزیه به هماهنگ‌کننده‌های اصلی ترجیح داده شد. نتایج آزمایش آنها نشان داد که تنوع ژنتیکی آفتابگردان‌های وحشی نسبت به زراعی بیشتر

ژنتیکی می‌باشد. هرچند مکانیسم‌های ژنتیکی که در فرایند هتروزیس دخیل هستند هنوز به خوبی درک نشده‌اند و بین محققان در این زمینه اختلاف وجود دارد ولی مشخص شده است که هیبریدهای حاصل از تلاقی‌های بین لاین‌های اینبرد والدینی با روابط ژنتیکی کمتر و فاصله ژنتیکی بیشتر، قدرت بیشتری را نسبت به هیبریدهای حاصل نشان می‌دهد (Basirnia *et al.*, 2014). به‌طور کلی بدون در نظر گرفتن نوع تلاقی (درون گروهی یا بین گروهی) همبستگی پایین بین فاصله ژنتیکی والدین بر اساس نشانگرهای مولکولی و عملکرد هیبریدهای آنها می‌تواند ناشی از انتخاب تصادفی نشانگرها و بر حسب پوشش ژنومی آنها و نه بر اساس ارتباط و یا

پیوستگی آنها با QTL‌های دخیل در هتروزیس باشد (Mohammadi, 2006). قرار گرفتن برخی از ژنوتیپ‌های متفاوت در یک خوشه در کنار هم را می‌توان به شباهت‌های خویشاوندی آنها مرتبط دانست. Yue و همکاران (۲۰۰۹) این پدیده را به متفاوت بودن ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی در هر آزمایش و روش‌های مختلف بررسی و تجزیه آنها نسبت داده است. در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۷۷ لاین آفتابگردان شامل ۶۵ لاین نگه‌دارنده، ۷۱ لاین برگرداننده باروری روغنی، ۲۲ لاین نگه‌دارنده آجیلی و ۱۹ لاین برگرداننده باروری آجیلی با استفاده از ۱۲ نشانگر TRAP، ۷ لاین برگرداننده باروری در خوشه لاین‌های نگه‌دارنده باروری قرار گرفت.



شکل ۴. دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ۶۸ ژنوتیپ آفتابگردان با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA

- of single and three-way crosses in sunflower. *Canadian Journal of Plant Science*, 72(2): 431-434.
- FAO (2012) FAO web site. from www.fao.org.
- Farsani TM, Etemadi N, Sayed-Tabatabaei BE, Talebi M (2011) Assessment of genetic diversity of Bermudagrass (*Cynodon dactylon*) using ISSR markers. *International journal of molecular sciences*, 13(1): 383-392.
- Friedt W, Snowdon R, Ordon F, Ahlemeyer J (2007) Plant breeding: assessment of genetic diversity in crop plants and its exploitation in breeding. *Progress in Botany*, Springer, 151-178.
- Gentzmittel L, Zhang YX, Vear F, Griveau B, Nicolas P (1994) RFLP studies of genetic relationships among inbred lines of the cultivated sunflower, *Helianthus annuus* L.: evidence for distinct restorer and maintainer germplasm pools. *Theoretical and applied genetics*, 89(4): 419-425.
- Ghaffari M, Farrokhi I (2004) Evaluation and providing plant genetic materials for sunflower breeding program for moderate and cold regions of Iran. West Azarbaijan Agricultural and Natural Resource Center Press, Iran.
- Hongtrakul V, Huestis GM, Knapp SJ (1997) Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theoretical and applied genetics*, 95(3): 400-407.
- Hu J, Vick BA (2003) Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21(3): 289-294.
- Iqbal M, Sadaqat H, Khan I (2008) Estimation of genetic diversity among sunflower genotypes through random amplified polymorphic DNA analysis. *Genet Mol. Res*, 7(4): 1408-1413.
- 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*, 62(6): 488-498.
- Lawson W, Henry R, Kochman J, Kong G (1994) Genetic diversity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) as revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Crop and Pasture Science*, 45(7): 1319-1327.
- Lewontin RC (1995) The apportionment of human diversity. *Evolutionary biology*, Springer, 381-398.
- Liu A, Burke JM (2006) Patterns of nucleotide diversity in wild and cultivated sunflower. *Genetics*, 173(1): 321-330.
- Liu J, Liu GS, Jan CC (2003) Comparison of Genetic Diversity of the Germplasm Resources of Confectionary Sunflower (*Helianthus annuus*) in China Based on RAPDs and AFLPs. *Acta Botanica Sinica*, 45(3): 352-358.
- Mohammadi SA, Prasanna B (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43(4): 1235-1248.
- Mohammadi SA (2006) Analysis of molecular data from the aspect of genetic diversity. 9th Iranian Crop Sciences Congress, Tehran University.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12): 3321-3323.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3): 583-590.
- Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19(2): 153-170.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. *Population*

- genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1): 288-295.
- Rohlf FJ (1972) An empirical comparison of three ordination techniques in numerical taxonomy. *Systematic Biology*, 21(3): 271-280.
- Rohlf FJ (1992) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. *Applied Biostatistics*.
- Ronicke S, Hahn V, Friedt W (2005) Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* of 'high oleic' sunflower inbred lines. *Plant breeding*, 124(4): 376-381.
- 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(6): 990-1003.
- Yeh F, Yang R, Boyle T, Ye Z, Mao J (1997) POPGEN Ver. 1.32. The user-friendly software for population genetic analysis. *Molecular Biology and Bio-technology Center, University of Alberta, Alberta, Canada*.
- Yue B, Cai X, Vick BA, Hu J (2009) Genetic diversity and relationships among 177 public sunflower inbred lines assessed by TRAP markers. *Crop science*, 49(4): 1242-1249.
- ZeinalzadehTabrizi H (2015) First report of TRAP molecular marker application using high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system in sunflower genetic diversity study. The 1th International and the 4th National Conference of Medicinal Herbs and Sustainable Agriculture, Hamedan, Iran.
- ZeinalzadehTabrizi H, Ghaffari M (2009) Production of sunflower hybrids based on new cytoplasmic male sterility sources. 3rd International Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe, Berlin, Germany.
- ZeinalzadehTabrizi H, Hosseinpour A, Aydin M, Haliloglu K (2015) A modified genomic DNA extraction method from leaves of sunflower for PCR based analyzes. *J. Bio. & Env. Sci.*, 7(6): 222-225.