تجزیه ساختار و تنوع ژنتیکی آفتابگردان روغنی (*Helianthus annuus* L.) بر اساس نشانگرهای ریزماهواره

فاطمه صحرانورد آذرتمر[۱]، مرتضی قدیم زاده[۲] و رضا درویش‌زاده[۳،*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۲- دانشیار، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۳- استاد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۰/۰۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۱۲/۲۲)

چکیده

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی و درک روابط موجود بین ژنوتیپ ها گام مؤثری در راستای حفظ ژرم پلاسم و طراحی برنامه های اصلاحی در گیاهان است. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۰٦ لاین مختلف آفتابگردان روغنی با ۳۰ جفت آغازگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع ۷۱ آلل در لاین های مورد مطالعه شناسایی شدند. تعداد آلل ها در مکان های ریزماهواره بین ۲ تا ٤ عدد متغیر و میانگین تعداد آلل در هر مکان ریزماهواره ۲/۲۰۷ بود. دامنه تعداد آلل موثر از ۱/۰٦ در مکان ژنی ORS718 تا ۳/۱۵ در مکان ژنیHA3040 متغیر بود. میانگین تعداد آلل موثر برابر ۱/٦٤ برآورد شد. میانگین محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) برابر ۰/۳٤٤ به دست آمد. با توجه به میزان PIC و تعداد آلل، می‌توان بیان نمود که آغازگرهای HA3040 و ORS733، مناسب ترین آغازگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی و تمایز ژنوتیپ ها می‌باشند. بر اساس ضریب همبستگی کوفنتیک (r=۰/٤٦) مناسب ترین روش برای گروه‌بندی لاین‌های مورد مطالعه، گروه‌بندی بر اساس ضریب تشابه جاکارد با الگوریتم Complete بود. بر اساس این گروه بندی لاین های مورد بررسی در ٤ گروه قرار گرفتند. ۹٦ لاین از ۱۰٦ ژنوتیپ استفاده شده بر اساس مراکز تحقیقاتی مبدا، گروه‌بندی شدند. کمترین فاصله ژنتیکی نی برابر ۰/۰۰٤ بین گروه SPII با ENSAT و INRA-MONTPOL مشاهده شد و بیشترین آن ۰/۲۱۰ بین دو گروه NOVARTIS و HUNGARY مشاهده شد. تجزیه ساختار جمعیت نشان داد به احتمال قوی جمعیت مورد مطالعه دارای ۵ زیرساختار می باشد. بررسی انتساب لاین‌ها به زیرساختارها الگوی خاصی از جمله توزیع جغرافیایی را نشان نداد. از تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی که با استفاده از نشانگرهای SSR به دست آمد، میتوان بطور مطلوب در برنامه های تلاقی و بهنژادی آفتابگردان روغنی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: آفتابگردان، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، ریزماهواره، زیرجمعیت

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **r.darvishzadeh@urmia.ac.ir**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) یک گیاه دیپلوییید (۲n=۲x=۳٤)، متعلق به خانواده *Asteraceae* یا *Compositae*، زیر خانواده Helianthoideae و طایفه Heliantheae می باشد. جنس *Helianthus* شامل ٦٧ گونه یک ساله و چند ساله می باشد (Heiser, 1976). آفتابگردان زراعی دولپه، دگرگشن و یک ساله می باشد (Heiser, 1976; Fick, 1989). آفتابگردان بومی آمریکای شمالی است (Dry and Burdon, 1986; Muller *et al.*, 2009). دانه های روغنی بی شک از راهبردی ترین محصولات کشاورزی هستند که تولید آن جزء نیازهای زیر بنایی برای ایجاد امنیت غذایی هر جامعه محسوب می شود. آفتابگردان یکی از چهار گروه عمده گیاهان روغنی است که از نظر سطح زیر کشت بعد از سویا، کلزا و بادام زمینی قرار دارد (Hu *et al.*, 2010). آفتابگردان دارای سه تیپ روغنی، آجیلی و زینتی می‌باشد (Paniego *et al.*, 2007). درصد روغن در بین گروه‌های مختلف تیپ روغنی بین ٤٢ تا ٥٢ درصد متغیر بوده و برای استحصال روغن مورد استفاده قرار می‌گیرند. آفتابگردان یک گیاه مدل برای مطالعات ژنومیکس در خانواده آستراسه می باشد (Poniego *et al.*, 1999).

انتخاب ژنوتیپی نیازمند تنوع می باشد و با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه، حدود انتخاب؛ چه طبیعی و چه مصنوعی وسیع‌تر می‌شود. در حقیقت تنوع ژنتیکی برای کشاورزان و اصلاح گران جهت به دست آوردن ارقام جدید با عملکرد بالا، سازگاری به تنش های محیطی و مقاومت به آفات و عوامل بیماری زا ضروری است (Laurentin, 2009). ارقام هیبرید آفتابگردان برای اولین بار در اوایل دهه‌ی هفتاد میلادی از طریق تلاقی لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی و لاین‌های برگرداننده باروری معرفی شدند که نقطه عطفی در اصلاح آفتابگردان به شمار می‌رود (Fick and Zimmer, 1974). در اکثر موارد شناسایی لاین های والدی در آفتابگردان براساس صفات مورفولوژیک است اما تعداد این صفات محدود و ناپایدارند. نشانگرهای DNA اطلاعات مفیدی راجع به پلی مورفیسم، ارتباط ژنتیکی و تنوع ارائه می دهند (Thormann *et al.*, 1994; Paniego *et al.*, 1999). این نشانگرها پایداری بالاتری دارند و در همه بافت ها صرف نظر از مراحل رشد و نمو یا حالت دفاعی سلول قابل تشخیص هستند و تحت تاثیر محیط و اثرات اپیستازی قرار نمی گیرند (Mondini, 2009). یکی از نشانگرهای مولکولی بر پایه واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)، نشانگر ریزماهواره یا ردیف‌های تکراری ساده (Simple sequence repeat; SSR) می‌باشد که به طور گسترده‌ای در مطالعات ژنتیک گیاهی در سال‌های اخیر استفاده می شود (Darvishzadeh *et al.*, 2010; Kholghi *et al.*, 2012). ریزماهواره‌ها گروهی از ردیف‌های تکرار شونده اند که با نام‌های مختلف همچون تفاوت طول ردیف‌های ساده (SSLPs)، ردیف های کوتاه تکراری (STRs)، موتیف‌های با ردیف ساده (SSMs) و نقاط ریزماهواره نشانمند از ردیف (STMs) نیز خوانده می‌شوند. از آنجا که جایگاه ژنی یک ریزماهواره در ژنوم خاص بوده و ردیف‌های مجاور آن در ژنوتیپ‌های مختلف حفظ شده است، آغازگر طراحی شده برای یک ژنوتیپ می‌تواند به خوبی برای تکثیر ریزماهواره از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ژنوتیپ‌های دیگر و حتی گونه‌های خویشاوند استفاده شود. واگرایی و یا هم‌گرایی SSRها در اگزون‌ها می‌تواند باعث ایجاد و یا از دست دادن عملکرد یک ژن از طریق جهش در چارچوب، یا افزایش سمیت mRNA (Expanded mRNA toxicity) شود (Li *et al.*, 2004). با وجود این، عملکرد ژن‌هایی که حاوی SSRها هستند و همچنین نقش موتیف‌های SSR در ژن‌های گیاهی کمتر مطالعه و درک شده است (Varshney *et al.*, 2005). نشانگرهای SSR به دلیل میزان بالای چندشکلی، توزیع تصادفی و توارث همبارز مندلی، از برترین و قابل اعتمادترین نشانگرها برای مطالعات ژنتیکی می باشند (Kalia *et al.*, 2011). به علت بیشتر بودن تعداد آلل هایشان در میان تمام نشانگرها بالاترین میزان

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

هتروزیگوسیتی را دارند (Liu, 2007). این نشانگرها امروزه به عنوان یک ابزار کارآمد برای انگشت نگاری مولکولی انواع گیاهان (Veinne, 2003; Eathing *et al.*, 2007)، توسعه نقشه های پیوستگی در گونه های مختلف (Kubo, 2009) و بررسی پیوستگی نشانگرهای مولکولی با ژن های صفات مهم اقتصادی (Galaev, 2006; Khelestkina *et al.*, 2002) استفاده می شوند. در گیاهان توالی های(AC)n، (TC)n، (AT)n بسیار متداول است. جداسازی دی نوکلئوتیدهای AT از کتابخانه ژنومی که فراوان ترین ریزماهواره در گیاهان هستند، به علت خاصیت متقارن بودن (پالیندروم) این نوع توالی ها بسیار سخت است (Gabor *et al.*, 2000; Morgante *et al.*, 2002). ریزماهواره ها بر خلاف ماهواره ها و ماهوارک‌ها دارای توزیع تصادفی در ژنوم می باشند به طوریکه در ۱۰Kb از توالی DNA حداقل یک توالی ریزماهواره دیده می شود (Gabor *et al.*, 2000; Morgante *et al.*, 2002). وبر (Weber, 1990) دریافت که اگر تعداد واحدهای تکرار شونده CA کمتر از ۱۲ باشد، ریز ماهواره‌ها رفتار یک شکلی (Monomorphic) نشان خواهند داد در حالی که با افزایش طول ریزماهواره (بیشتر از ۱۲ تکرار) احتمال چندشکلی (Polymorphism) نیز بیشتر می شود. پژوهش های بعدی بر روی ریزماهواره ها از جمله گیاهان نتایج وبر (Weber, 1990) را مورد تایید قرار داد. به طوری که همبستگی مثبت و معنی داری بین تعداد واحدهای تکرارشونده و تعداد آلل‌های شناسایی شده مشاهده شد.

نشانگرهای مولکولی بسیاری از قبیل RFLP (Cheres *et al.*, 1998)، AFLP (Dong *et al.*, 2007; Darvishzadeh, 2012)، RAPD (Iqbal *et al.*, 2008)، SSR (Darvishzadeh *et al.*, 2010; Kholghi *et al.*, 2012; Yu et al., 2002) و IRAP و REMAP (Basirnia *et al.*, 2016) جهت بررسی تنوع ژنتیکی و پیش‌بینی عملکرد هیبریدها در آفتابگردان استفاده شده است. تحقیقات در رابطه با آفتابگردان نشان داده است که عملکرد هیبریدها با تنوع ژنتیکی والدین همبستگی معنی داری دارد (Darvishzadeh, 2012). در حال حاضر ریزماهواره ها نشانگر رایج برای ارزیابی ژرم پلاسم آفتابگردان هستند. نشانگرهای مولکولی خنثی مانند ریزماهواره ها وAFLP، امکان ارزیابی رابطه میان اندازه جمعیت، سطح تنوع ژنتیکی و پسروی خویش آمیزی را میسر ساخته است (Ebrahimi and Zinoabedini, 2013). در این تحقیق تنوع ژنتیکی حجم انبوهی از لاین‌های آفتابگردان روغنی از مراکز مختلف تحقیقاتی با نشانگرهای SSR بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA: بذور ۱۰۶ لاین خالص آفتابگردان روغنی از چندین مرکز تحقیقاتی جهان شامل موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ایران، وزارت کشاورزی آمریکا، چندین مرکز تحقیقاتی وابسته به دانشگاهها در اروپا تهیه (جدول ۱) و در گلدان‌های جداگانه کشت شدند و سپس DNA ژنومی از نمونه‌های برگی گیاهچه های ۱۵ روزه با روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta *et al.*, 1983) استخراج شد. کیفیت DNA نمونه های استخراجی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر TBE X 0.5 (45 mM Tris base, 45mM boric acid, 1mM EDTA pH 8.0) در ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ٤٥ دقیقه بررسی شد. کمیت DNA با استفاده از اسپکتوفتومتری در طول موج ۲٦۰ نانومتر با استفاده از بیوفوتومر ٦۱۳۱ (Eppendorf, Germany) تعیین شد. DNA ژنومی در نهایت در مقدار ۱۰۰ µl بافر TE (10mM Tris, 1mM EDTA; pH 8.0) حل شد. از ۳۳۹ نشانگر SSR توسعه یافته در دانشگاه ارگون آمریکا ‘ORS’ (Tang *et al.*, 2002) و ۱۸۰ نشانگرSSR توسعه یافته در INTA آرژانتین ‘HA’ (Paniego *et al.*, 2002)، ۳۰ مکان SSR بر اساس توازن در پوشش مناسب ژنوم و وضوح در باندهای چندشکل تولیدی انتخاب شدند (Tang *et al.*, 2002; Poormahamad Kiani *et al.*, 2007).

واکنش زنجیره ای پلی مراز: واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر که شامل ٤/٤٤ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر بافر پی سی آر (10X)، ۱

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۰/۸ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار (http://biofluxbiotech.com :BioFluxbiotech)، ۰/۸ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۰/۱۶ میکرولیتر از تگ DNA پلی مراز (Cinna Gen, Tehran, Iran) و ۵ نانوگرم DNA الگو بود، انجام شد.

جدول ۱- اسامی و منشا لاین های آفتابگردان روغنی مورد مطالعه

Table 1. Name and origin of sunflower lines used in the present study

شماره No.	نام لاین Line	کشور Country	گروه Group	شماره No.	نام لاین Line	کشور Country	گروه Group
1	DM2	USA	USDA	53	H100A	FRANCE	ASGROW
2	HAR4	USA	USDA	54	H158A/RHA274	FRANCE	ASGROW
3	SDB1	USA	USDA	55	H209A/H566R	FRANCE	ASGROW
4	SDR18	USA	USDA	56	H100A/83HR4	FRANCE	ASGROW
5	RHA274	USA	USDA	57	H205A/H543R	FRANCE	ASGROW
6	SDB3	USA	USDA	58	H209A/LC1064	FRANCE	ASGROW
7	HA335B	USA	USDA	59	AS5304	FRANCE	ASGROW
8	PM1-3	USA	USDA	60	LP-CSYB	FRANCE	ENSAT
9	SDR19	USA	USDA	61	ENSAT-283	FRANCE	ENSAT
10	HA337B	USA	USDA	62	AS3211	FRANCE	ENSAT
11	HA304	USA	USDA	63	AS5306	FRANCE	ENSAT
12	RHA858	USA	USDA	64	ENSAT-254	FRANCE	ENSAT
13	RHA266	USA	USDA	65	ENSAT-270	FRANCE	ENSAT
14	KANSAS510	USA	USDA	66	1009329 2(100K)	FRANCE	ENSAT
15	16	IRAN	SPII	67	1009337 (100K)	FRANCE	ENSAT
16	344	IRAN	SPII	68	100935 0(100K)	FRANCE	ENSAT
17	11×12	IRAN	SPII	69	ENSAT-699	FRANCE	ENSAT
18	26	IRAN	SPII	70	AS3232	FRANCE	ENSAT
19	38	IRAN	SPII	71	PAC2	FRANCE	ENSAT
20	346	IRAN	SPII	72	1009370-1(100K)	FRANCE	ENSAT
21	260	IRAN	SPII	73	1009370 3(100K)	FRANCE	ENSAT
22	262	IRAN	SPII	74	ENSAT-695	FRANCE	ENSAT
23	1059	IRAN	SPII	75	AS6305	FRANCE	ENSAT
24	36	IRAN	SPII	76	AS0-1-POP-A	FRANCE	ENSAT
25	4	IRAN	SPII	77	CAY	FRANCE	ENSAT
26	30	IRAN	SPII	78	A-control plastipic	FRANCE	ENSAT
27	28	IRAN	SPII	79	703-CHLORINA	FRANCE	ENSAT
28	110	IRAN	SPII	80	NS-R5	FRANCE	NOVARTIS
29	LC1064C	FRANCE	ASGROW	81	NS-B5	FRANCE	NOVARTIS
30	H158A×LC1064C	FRANCE	ASGROW	82	NSF1 A4×R5	FRANCE	NOVARTIS
31	AS5305	FRANCE	ASGROW	83	NSF1 A5×R5	FRANCE	NOVARTIS
32	RHA265	FRANCE	ASGROW	84	AF1 POPA	FRANCE	NOVARTIS
33	H100B	FRANCE	ASGROW	85	BF1 POPB	FRANCE	NOVARTIS
34	SSD580	FRANCE	ASGROW	86	TMB 51	FRANCE	INRAMONT
35	SSD581	FRANCE	ASGROW	87	QHP1	FRANCE	INRAMONT
36	5AS-F1/A2×R2	FRANCE	ASGROW	88	D34	FRANCE	INRAMONT
37	8ASB2	FRANCE	ASGROW	89	H603R	FRANCE	INRAMONT
38	12ASB3	FRANCE	ASGROW	90	OES	FRANCE	INRAMONT
39	15038	FRANCE	ASGROW	91	SDB2	FRANCE	INRAMONT
40	15031	FRANCE	ASGROW	92	F330/03	HUNGARY	-
41	H158A/LC1064C	FRANCE	ASGROW	93	F1250/03	HUNGARY	-
42	H543R/H543R	FRANCE	ASGROW	94	B454/03	HUNGARY	-
43	H156A/RHA274	FRANCE	ASGROW	95	F929/03	HUNGARY	-
44	H156A/H543R	FRANCE	ASGROW	96	RT931	FRANCE	RUSTICA
45	H100A/H543R	FRANCE	ASGROW	97	RT948	FRANCE	RUSTICA
46	H100A/RHA274	FRANCE	ASGROW	98	CSWW2X	FRANCE	Caussade semences
47	H205A/83HR4	FRANCE	ASGROW	99	9CSAS	FRANCE	Caussade semences
48	H158A/H543R	FRANCE	ASGROW	100	7CR16=PRH6	FRANCE	C.F
4	H209A/83HR4	FRANCE	ASGROW	101	803-1	SERBIA	IFVC
9	H157A/LC1064	FRANCE	ASGROW	102	5DES20QR	FRANCE	BRN
50	H100A/LC1064	FRANCE	ASGROW	103	11/4N-P	Eastern Europe	-
51	H100A/90R78	FRANCE	ASGROW	104	H049+FSB	FRANCE	-
52	AS613	FRANCE	ASGROW	105	H543R	FRANCE	-

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

واکنش های PCR به صورت تاچ‌داون (Touchdown) به شرح زیر انجام شد: فاز اول: ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه؛ فاز دوم: مرحله اول شامل ۱۰ چرخه به صورت ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ٦٤ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه مرحله دوم شامل ۳۰ چرخه به صورت ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ٥٤ درجه سانتی‌گراد (دمای اتصال آغازگر) به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ٤٥ ثانیه؛ فاز سوم: ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰دقیقه. دمای اتصال ۲ درجه پایین تر از دمای ذوب آغازگر انتخاب شد. مزیت این روش اختصاصی‌تر شدن اتصالات اولیه آغازگر- الگو می‌باشد (Paniego *et al.*, 2002; Tang and Knapp, 2003; Tang *et al.*, 2002). محصولات PCR که تنوع در تعداد تکرار ریزماهواره ها را نشان دادند با ۵ میکرولیتر بافر لودینگ (98% formamide, 10Mm EDTA, 0.05% bromophenol blue and 0.05% xylene cyanol) ترکیب شده و به کمک الکتروفورز و ژل آگارز ۳٪ در بافر TBE 0.5X و در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت با استفاده از دستگاه (BioRad power pack) جداسازی شدند. زمان الکتروفورز بسته به وزن مولکولی قطعات حاصل از PCR بین ۱/۵-۳ ساعت متغیر بود. رنگ آمیزی باندها با اتیدیوم بروماید ۱ میکروگرم بر میلی لیتر انجام گرفت. از نشانگر ۱۰۰ جفت باز به عنوان شاخص برای تعیین اندازه آللی استفاده شد.

تجزیه های آماری: الگوی باندی حاصل از هر آغازگر SSR به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) نمره‌دهی شد. امتیازدهی نوارها به صورت شمارهٔ آلل تولیدی در مکان مورد نظر نیز صورت گرفت (سیستم هم‌بارز). تعداد آلل مشاهده شده (Na) و آلل مؤثر (Ne در هر یک از مکان های SSR با استفاده از نرم‌افزار GenAlex نسخهٔ ٦/٤١ (Peakall and Smouse, 2006) محاسبه شد. برای انتخاب ضریب تشابه و الگوریتم مناسب برای گروه بندی لاین ها، از ضریب همبستگی کوفنتیک (r) استفاده شد. محاسبه ضرایب تشابه، گروه بندی لاین‌ها و ضریب همبستگی کوفنتیک با استفاده از نرم افزار NTSYS، نسخه ۲/۱ انجام شد (Rohlf, 1998). برای بررسی سطوح همکاری بین مراکز مهم تحقیقات آفتابگردان روغنی، ۹٦ لاین از ۱۰٦ ژنوتیپ استفاده شده بر اساس مراکز تحقیقاتی مبدا، گروه‌بندی شدند به طوری که در هر گروه بیش از ٤ نمونه موجود باشد. بدین ترتیب آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) بر پایه داده‌های SSR با استفاده از نرم‌افزار GenAlex انجام شد. سطوح تمایز ژنتیکی (PhiPT)، میزان مهاجرت (Nm) و فاصله ژنتیکی نی (Nei, 1978) بین گروه ها با استفاده از نرم افزار GenAlex 6 محاسبه شد.

تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیر جمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط با استفاده از روش Bayesian در نرم‌افزار Structure 2.3.4 انجام گرفت (Pritchard *et al.*, 2000). این روش هر یک از ژنوتیپ‌ها را با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌کند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. بین ۱ تا ۱۰ زیرجمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هرکدام از زیرجمعیت‌ها ۵ تکرار منظور گردید. برای این منظور از مدل ترکیبی (Admixture model) و استقلال فراوانی آللی با ۱۰۰۰۰۰ تکرار آزمایش (یا Burn-in) و ۱۰۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده گردید تا منحنی حداکثر درست نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیر جمعیت) یک ماتریس به نام Q_{st} را به دست می‌دهد که این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. تعداد واقعی زیرجمعیت توسط لگاریتم Likelihood برای هر K؛ LnP(D)= L(K) تعیین می شود (Rosenberg *et al.*, 2002). از آنجایی که توزیع LnP(D) عدد دقیق و واضحی از K واقعی را نشان نمی‌دهد، دلتا K (ΔK) مبنی بر برآورد ثانویه تغییر در(ΔK) Likelihood جهت برآورد دقیق

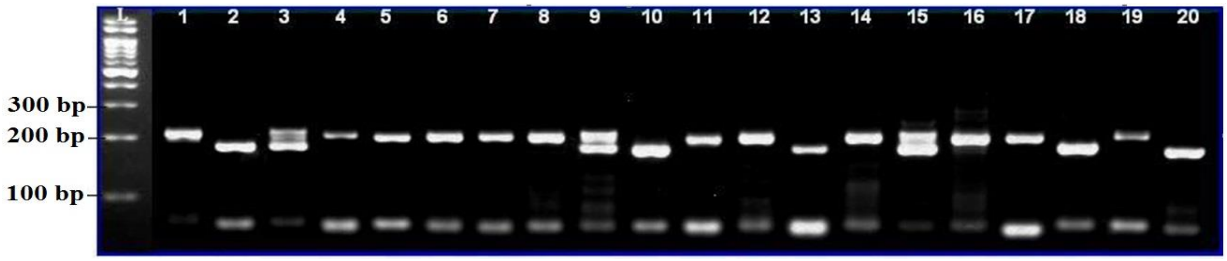
[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

مقدار واقعی K استفاده شد (Evanno *et al.*, 2005). در این روش شیب تابع احتمال در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی درآن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد.

نتایج و بحث

با استفاده از ۳۰ مکان SSR در مجموع ۷۱ آلل مختلف در لاین‌های مورد مطالعه شناسایی شد (جدول ۲). تعداد آلل در مکان های مورد مطالعه بین ۲ تا ٤ متغییر بود. میانگین تعداد آلل در مکان‌ها ۲/۲۱ بود. نمونه ای از الگوی نواری حاصل از تکثیرDNA تعدادی از ژنوتیپ‌های آفتابگردان با استفاده از آغازگر ریزماهواره ORS1265در شکل ۱ نشان داده شده است. خلقی و همکاران (Kholghi *et al.*, 2012) در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵ توده آفتابگردان آجیلی با ۲۰ نشانگر SSR تعداد ٤۳ آلل مختلف با میانگین ۲/۱۵ آلل در هر مکان در توده‌های مورد مطالعه شناسایی کردند. تنک و کنپ (Tang and Knapp, 2003) از ۱۲۲ نشانگر ریزماهواره برای تمایز ۹ ژنوتیپ آفتابگردان آجیلی و روغنی استفاده کردند و میانگین تعداد آلل را ۳/۵ آلل برای هر مکان ریزماهواره گزارش نمودند. تفاوت در نتایج گزارش شده توسط مطالعات مختلف عمدتا به دلیل تفاوت در تعداد ارقام مورد مطالعه، سابقه ژنتیکی، تعداد نشانگر مورد استفاده و تکنیک های مورد استفاده برای شناسایی پلی مورفیسم می‌باشد. اندازه باند و تفاوت بین باند ها از عوامل موثر در انتخاب سیستم جداسازی محصولات PCR است. در مقایسه ژل آگارز قدرت تفکیک پایینی از ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید دارد، با این وجود آگارز به عنوان یک سیستم ایمن (Safe) در بسیاری از مطالعات مربوط به بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شده است (Naseri *et al.*, 2011; Gharghani *et al.*, 2009). از آن جایی‌که میانگین تعداد آلل در هر مکان ریزماهواره مناسب بودن آن مکان ژنی برای تخمین تنوع ژنتیکی را نشان می-دهد، بنابراین آغازگرهایی از قبیل HA3040، HS3070،ORS822 ، ORS733 و ORS621 که تعداد آلل زیادی در مکان های ژنی شناسایی کردند برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب می‌باشند (جدول ۲).

دامنه تعداد آلل موثر از ۱/۰٦ در مکان ژنی ORS718 تا ۳/۱۵ در مکان ژنیHA3040 بود. میانگین تعداد آلل موثر برابر ۱/٦٤ برآورد شد (جدول ۲). تعداد آلل موثر از محاسبه‌ی تعداد آلل و فراوانی آن‌ها به دست می‌آید و به وسیله آن می توان ژنوتیپ‌هایی با تعداد و توزیع آللی کاملاً متفاوت را با یکدیگر مقایسه نمود. آلل موثر ۱/۰٦ در مکان ژنی ORS718 نشان دهنده ۲ آلل با فراوانی آللی کاملا متفاوت و وجود یک آلل نادر برای این مکان ریزماهواره است. میزان دامنه PIC (میزان اطلاعات چند شکل) در لاین‌های مورد مطالعه بین ۰/۰۵۵ برای آغازگر ORS718 تا ۰/٦۸۷ برای آغازگر HA3040 متغیر بود. میانگین PIC در لاین‌های مورد مطالعه ۰/۳٤٤ بود. میزان اطلاعات چند شکل، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آن ها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چند شکلی بالا و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد. با توجه به میزان PIC و تعداد آلل،می‌توان بیان نمود که



شکل ۱- نمونه ای از الگوی نواری حاصل از تکثیرDNA تعدادی از ژنوتیپ های آفتابگردان با استفاده از آغازگر ریز ماهواره ORS 1265. چاهک اول از سمت چپ، نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰bp می باشد.

Figure 1. SSR fingerprints of some sunflower lines using ORS 1265 primer. The first Lane from left: 100 bp DNA ladder (Fermentas).

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

آغازگرهای HA3040 و ORS733، مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی و تمایز ژنوتیپ‌ها می‌باشند.

به منظور بررسی سطح تنوع در درون و بین گروه‌های تشکیل شده بر اساس مراکز تحقیقاتی مبدا، تجزیه واریانس مولکولی (Analysis of molecular variance: AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار GenAlex انجام گرفت. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۸ درصد از تنوع محاسبه شده مربوط به بین گروه‌ها و ۹۲ درصد تنوع مربوط به درون گروه‌هاست (جدول ۳). کم‌بودن تنوع بین جمعیتی و شاخص‌های تمایز نشان دهنده وجود جریان ژنی بالا در بین جمعیت‌ها می‌باشد (Piñera, 2007). گرلیده و همکاران (Garayalde *et al.*, 2011) با نشانگرهای SSR و ISSR تنوع درون جمعیتی در توده های آفتابگردان را ۸۰٪ گزارش کردند. خلقی و همکاران (Kholghi *et al.*, 2012) با نشانگرهای SSR تنوع درون جمعیتی در توده های آفتابگردان آجیلی را ۸٦٪ گزارش کردند. بصیرنیا و همکاران (Basirnia *et al.*, 2016) با بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های مورد بررسی در این مطالعه با نشانگرهای REMAP + IRAP نتایج مشابهی را گزارش کردند به طوری که تنوع درون گروه‌ها ۹٤٪ و تنوع بین گروه‌ها ٦٪ بود. بالاتر بودن تنوع درون جمعیتی نسبت به بین جمعیتی نشان می‌دهد که در بین جمعیت های مختلف ساختار ژنتیکی بارزی وجود ندارد (Diz *et al.*, 2009). تنوع ژنتیکی زیاد در درون گروه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های ژنتیکی زیاد افراد درون گروه از لحاظ مکان‌های ژنی تکثیر یافته می‌باشد و این گویای ناهمگنی درون گروه می‌باشد. به طور کلی ناهمگنی زیاد در درون گروه می‌تواند دلایل زیادی از جمله ماهیت چند پلوئیدی، دگرگشنی، تلاقیهای مختلف بین ژنوتیپ ها، اختلاط فیزیکی بذور و غیره داشته باشد. در اینجا می‌توان دلیل بالا بودن تنوع در درون گروه‌ها را احتمالاً به انجام تلاقی بین ژنوتیپ‌ها از گروه‌های مختلف، اختلاط بذور هنگام تکثیر، یا اندازه کوچک گروه‌های مورد مطالعه و یا بزرگ بودن ژنوم و کافی نبودن ترکیبات آغازگری برای پوشش کامل ژنوم و در نتیجه عدم ارزیابی کامل ژنوتیپ ها از لحاظ تنوع ژنتیکی در کل ژنوم نسبت داد.

عدد شاخص تثبیت (F_{ST})، تمایز بین جمعیت‌های مختلف را نشان می دهد. بیشترین مقدار F_{ST} برابر ۰/۲۰۸ بین لاین های گروه های NOVARTIS (فرانسه) و HUNGARY (مجارستان) و کمترین مقدار آن برابر ۰/۰۲۷ بین لاین های گروه‌های USDA-USA (آمریکا) و ASGROW (فرانسه) مشاهده شد (جدول ٤). بیشترین میزان جریان ژنی (Nm) برابر ۸/۹۹٤ بین لاین‌های گروه های USDA-USA (آمریکا) و ASGROW (فرانسه) و کمترین میزان جریان ژنی (Nm) برابر ۰/۹٥٤ بین لاین های گروه‌های NOVARTIS (فرانسه) و HUNGARY (مجارستان) مشاهده شد (جدول ٤). نتایج نشان داد با کاهش مقدار F_{ST} مقدار Nm افزایش می‌یابد. به طورکلی اگر Nm<۱ باشد تمایز بین افراد بیشتر و اگر Nm>۱ باشد تمایز بین افراد اندک است (Wright, 1951). میزان جریان ژنی بالا می‌تواند دلیلی بر وجود منشاء مشترک بین لاین‌ها و پراکنش و مهاجرت آنها به وسیله انسان باشد. بصیرنیا و همکاران (Basirnia *et al.*, 2016) تنوع ژنتیکی همین لاین‌ها را با نشانگرهای REMAP + IRAP بررسی کردند به طوری که کمترین تمایز ژنتیکی (PhiPT=۰/۰۱٦) و بیشترین جریان ژنی (Nm=۱٥/۳۷) بین لاین های گروه های USDA-USA (آمریکا) و ASGROW (فرانسه) مشاهده شد که مشابه نتایج این مطالعه است. تعداد آلل موثر (Ne) از ۰/۰۷٥ در گروه INRA-MONTPOL (مون پلیه فرانسه) تا ۰/۱۲۲ در گروه HUNGARY (مجارستان) متغیر بود. شاخص شانون (I) از ۰/۰٤۷ در گروه SPII (نهال و بذر کرج ایران) تا ۰/۰٦۲ در گروه ENSAT (تولوز فرانسه) مشاهده شد. بیشترین درصد مکان های پلی مورف به ترتیب در گروه های ASGROW (۱۰۰ درصد)(فرانسه)، SPII (۹۳/۱۰ درصد) (نهال و بذر کرج ایران) و USDA-USA (۸۹/٦٦ درصد) (وزارت کشاورزی آمریکا) مشاهده شد (جدول ٥).

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

جدول ۲- تخمین تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های آفتابگردان روغنی مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای میکروساتلیت

Table 2. Estimation of genetic diversity in studied oily sunflower genotypes by using simple sequence repeat (SSR) markers

نام آغازگر Locus	توالی تکرار Repeat motifs	آغازگر رفت (′3-′5) Forward primer (′5-′3)	آغازگر برگشت (′5-′3) Reverse primer (′3-′5)	تعداد آلل Na	تعدادآلل موثر Ne	محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)	دمای اتصال Annealing temperature (°C)
ORS785	(AG)17	CAAAATACCCAGGT CAAAGCA	CCTAGCTTATGGGAC GTATGGA	2	1.990	0.500	57
ORS807	(AG)15	CCGATATTTTGACC GATATTTTGC	TCTCACCCTTCATCTC CTTCC	2	2.000	0.503	57
ORS608	(AT)6(AG)11	CATGGAAAGCCGAG TTCTCT	CGTGCGTGATTAACA TACCC	2	1.137	0.121	57
ORS609	(AG)20	GCGAAGGAACTGAA CCGATA	GGATTTTAGTCCGCC AATCA	2	1.300	0.232	57
ORS1079	(CT)26	TACGACTGACGATT CCATTTCTC	AACTGGATTTCACAG GGAGTGTT	2	1.367	0.270	59
ORS718	(CT)13	CACTTTACGCACAC CAAACC	ATGCAACACCCGAAT CAAAG	2	1.058	0.055	57
ORS1265	(CT)18	GGGTTTAGCAAATA ATAGGCACA	ACCCTTGGAGTTTAG GGATCA	2	1.785	0.442	59
ORS1242	(CT)14	GCAATCGTTTCACT CTTCCATTC	TGGTCGTAGAATTGT CGGTCAT	2	1.331	0.250	59
HA3070	-	GGGATGAGCTCTGTC	CTTTTCAATTCCCGCT	3	1.232	0.189	57
ORS822	(GT)8	CAATGCCATCTGTC ATCAGCTAC	AAACAAACCTTTGGA CGAAACTC	3	2.046	0.514	59
ORS1256	(GT)8(AG)25	GATGTTGATGTTGG TGAAGTTGC	CTCCGTCACCTTAAG CACTTGTA	2	1.972	0.495	59
ORS630	(CT)15	TGTGCTGAGGATGA TATGCAG	GCACGACCCGGATAT GTAAC	2	1.97٥	0.496	54
ORS949	(AC)13	TGCAAGGTATCCAT ATTCCACAA	TATACGCACCGGAAA GAAAGTC	2	1.925	0.483	57
ORS733	(AG)21	TATGAGTTGGCAAG GGCTTC	GGACTCCAACGAGAG AATCAGT	3	2.336	0.575	57
ORS1088	(CT)15	ACTATCGAACCTCC CTCCAAAC	GGATTTCTTTCATCTT TGTGGTG	2	1.220	0.181	59
ORS378	(GT)17	GTGAAACCTTCGGA CCTCTG	GTACAAAACTTATAA ATAAAACAATA	2	1.979	0.498	57
ORS617	(GA)17	GGTACTTGGTATTC ATGGGTCAT	GACACCGCCAACTTA ACACTT	2	1.290	0.226	57
ORS694	(AG)17	CCTGGAACTGAACC GAGAAC	GCCGTGAAACAGAGA GAGGA	2	1.861	0.465	57
ORS1064	(CT)19	TGAATGATCTATGA GTGGTGATGG	ACTCGCAGTGGTAAG TCGTTAGG	2	1.118	0.106	59
ORS1264	(AG)28	TAGAAGCGGTTGGG TTGACAGTA	TGAACTCGGTTGATT CTCTAGCC	2	1.471	0.322	59
ORS728	(AG)7	CTCCATAGCAACCA CCTGAAA	CCAAACTCTGAATGA TACTTGTGAC	2	1.940	0.487	57
ORS844	(AC)17	ACGATGCAAAGAAT ATACTGCAC	CATGTTTAATAGGTTT TAATTCTAGGG	2	1.729	0.424	59
ORS878	(AC)11	TGCAAGGTATCCAT ATTCCACAA	TATACGCACCGGAAA GAAAGTC	2	1.903	0.477	59
ORS1179	(AG18	GATTCGGAGCTGTT AGGAGGTAG	AAACGGGAAGCAAG AATAGAACA	2	1.075	0.070	59
ORS565	(AG)13	TGGTCAACGGATTT AGAGTCAA	TCCAGTTTGGTCTTGA TTTGG	2	1.895	0.476	54
HA3040	-	GACCCGAACCACACT	GTTCTTGCTTCGATCC	4	3.147	0.687	57
ORS488	(AC)14	CCCATTCACTCCTGT TTCCA	CTCCGGTGAGGATTT GGATT	2	1.111	0.101	57
ORS621	(CT)14	CGCCTTATGCTGAG AGGAAA	CCTGAAGCGAAGAAG AATCG	3	1.240	0.195	57
ORS1215	(CT)10	ATACTCTTCCACCCT CAAATCCA	GGTTGCGGTAGTGGT CTGTAGT	2	1.146	0.128	59
Mean (میانگین)				2.207	1.641	0.344	
SE (خطای استاندارد)				0.091	0.090	0.33	

Na: تعداد آلل های متفاوت، Ne: تعداد آلل‌های مؤثر = 1 / (sum p_i^2).

Na = Number of different alleles, Ne = number of effective alleles = 1 / (sum p_i^2).

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در لاین‌های آفتابگردان روغنی

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) in oily sunflower lines

منابع Source	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	تنوع ارزیابی شده Est. Var.	درصد %	معیار Stat	مقدار Value	احتمال P(rand >= data)
بین جمعیت Between population	6	253.724	42.287	1.761	92	PhiPT	0.081	0.010
درون جمعیت Within population	89	1774.245	19.935	19.935	8			
کل Total	95	2027.969		21.696	100			

PhiPT: تفاوت ژنتیکی، df: درجه آزادی، SS: مجذور مربعات و MS: میانگین مربعات

PhiPT: Genetic differentiation; df: degree of freedom; SS: sum of squares and MS: mean of squares

شباهت ژنتیکی لاین‌های آفتابگردان با سه ضریب تشابه تطابق ساده، جاکارد و دایس و در هر مورد گروه بندی لاین ها با آلگوریتم های مختلف انجام شد. بر اساس ضریب همبستگی کوفنتیک مناسب ترین روش برای گروه‌بندی لاین‌های مورد مطالعه، گروه‌بندی بر اساس ضریب تشابه جاکارد با الگوریتم Complete بود (r=۰/٤٦). رینکون و همکاران (Rincon *et al.*, 1996) در تجزیه کلاستر با استفاده از داده‌های مولکولی نشان دادند که به طور کلی ضریب کوفنتیک پایین، دلیل بر عدم کارایی نمودار حاصل نیست. با استفاده از این ترکیب تجزیه کلاستر (ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم Complete) لاین های مورد بررسی در ٤ گروه قرار گرفتند. گروه ۱ شامل ۱۲ لاین از مراکز (INRA-MOTPOL, NOVARTIS, ENSAT, ASGROW, HUNGARY)، گروه۲ شامل ۱۳ لاین از مراکز (ASGROW, HUNGARY, SPII, ENSAT, INRA-MOTPOL, USDA-USA)، گروه ۳ شامل ۱۸ لاین از مراکز(USDA-USA, ENSAT, INRAMOTPOL)، و گروه ٤ شامل ٦۳ لاین از تمامی مراکز بود (شکل ۲). در تجزیه به مختصات اصلی، دو مولفه اول و دوم ١٦/٦٨ درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه می نمایند (شکل ۳). اگر همبستگی بین متغییرهای اصلی کمتر باشد به تعداد متغیرهای اصلی، متغییر جدید به دست خواهد آمد و دو یا سه مولفه اصلی بخش کوچکی از تغییرات داده‌ها را توجیه خواهند نمود. توجیه درصد کمی از تغییرات توسط هر مولفه در این مطالعه، بیانگر پوشش ژنومی مناسب نشانگرهای SSR انتخاب شده می باشد. یعنی در واقع نشانگرهای انتخاب شده پراکنش مناسبی در ژنوم آفتابگردان دارند. در مطالعه بصیرنیا و همکاران (Basirnia *et al.*, 2016) بر روی همین لاین‌ها با نشانگرهایIRAP + REMAP دو مولفه اول،۱۱/٦۰ درصد از تنوع کل را توجیه می نمودند. در گیاهان زراعی، یکی از معیارهای انتخاب والدین برای تلاقی و بهره‌مندی از پدیده‌ی هتروزیس، فاصله‌ی ژنتیکی می‌باشد. هر چند مکانیزم‌های ژنتیکی که در فرایند هتروزیس دخیل‌اند به خوبی درک نشده است ولی مشخص شده است که هیبریدهای حاصل از تلاقی بین والدین با روابط ژنتیکی کمتر و فاصله ژنتیکی بیشتر، قدرت بیشتری را نسبت به هیبریدهای حاصل از والدین با روابط ژنتیکی نزدیک‌تر از خود نشان می‌دهند. ماتریس فاصله ژنتیکی بین گروه ها (مراکز تحقیقاتی) در نرم افزار GenAlEX بر اساس ضریب تشابه ژنتیکی نی محاسبه شد. فاصله ژنتیکی یک پارامتر با ارزشی برای حفاظت ژرم پلاسم و استفاده در اصلاح گیاهان می باشد (Kholghi *et al.*, 2012). بر اساس فاصله ژنتیکی نی (Nei GD) لاین های متعلق به گروه SPII (نهال بذر کرج- ایران) کمترین فاصله (۰/۰۰٤) را با لاین های گروه های ENSAT (تولوز فرانسه) و INRA-

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]

[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

MONTPOL (مون پلیه فرانسه) داشت لذا احتمال تهیه توده‌های اولیه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از فرانسه و یا بر عکس از ایران وجود دارد. بیشترین ژنتیکی نی (۰/۲۱۰) بین دو گروه NOVARTIS و HUNGARY مشاهده شد (جدول ٤). نتایج گروه‌بندی نشان داد که گروه‌بندی ژنوتیپ ها با استفاده از نشانگر ریزماهواره از پراکنش جغرافیایی آن‌ها تبعیت نمی‌کند. نتایج گروه‌بندی حاصل از تجزیه کلاستر با تجزیه به مختصات اصلی تا حدودی در تطابق بود. این نتایج توسط سبزعلیان و همکاران (Sabzalian *et al.*, 2009) در زعفران نیز گزارش شده است.

تجزیه ساختار جمعیت به روش بیزین با استفاده از نرم افزار Structure نشان داد که شاخص K و متوسط Ln(PD) بیشترین مقدار را در K=5 دارند، بنابراین به احتمال قوی جمعیت مورد استفاده دارای ۵ زیر ساختار یا زیر جمعیت می باشد (شکل ٤). بارپلات به دست آمده از نرم افزار Structure نیز نشان داد که لاین های مورد مطالعه بر اساس حد آستانه ۰/۷ به ۵ زیرجمعیت تقسیم‌بندی شده است (شکل ۵).

جدول ٤- مقادیر شاخص تثبیت (Fst)، میزان جریان ژنی (Nm)، فاصله ژنتیکی (Unei GD) و شباهت ژنتیکی (UNei ID) در لاین‌های آفتابگردان روغنی

Table 4. Fixation index (Fst), number of migration (Nm), unbiased Nei genetic distance (Unei GD) and unbiased Nei genetic identity (UNei ID) in oily sunflower lines.

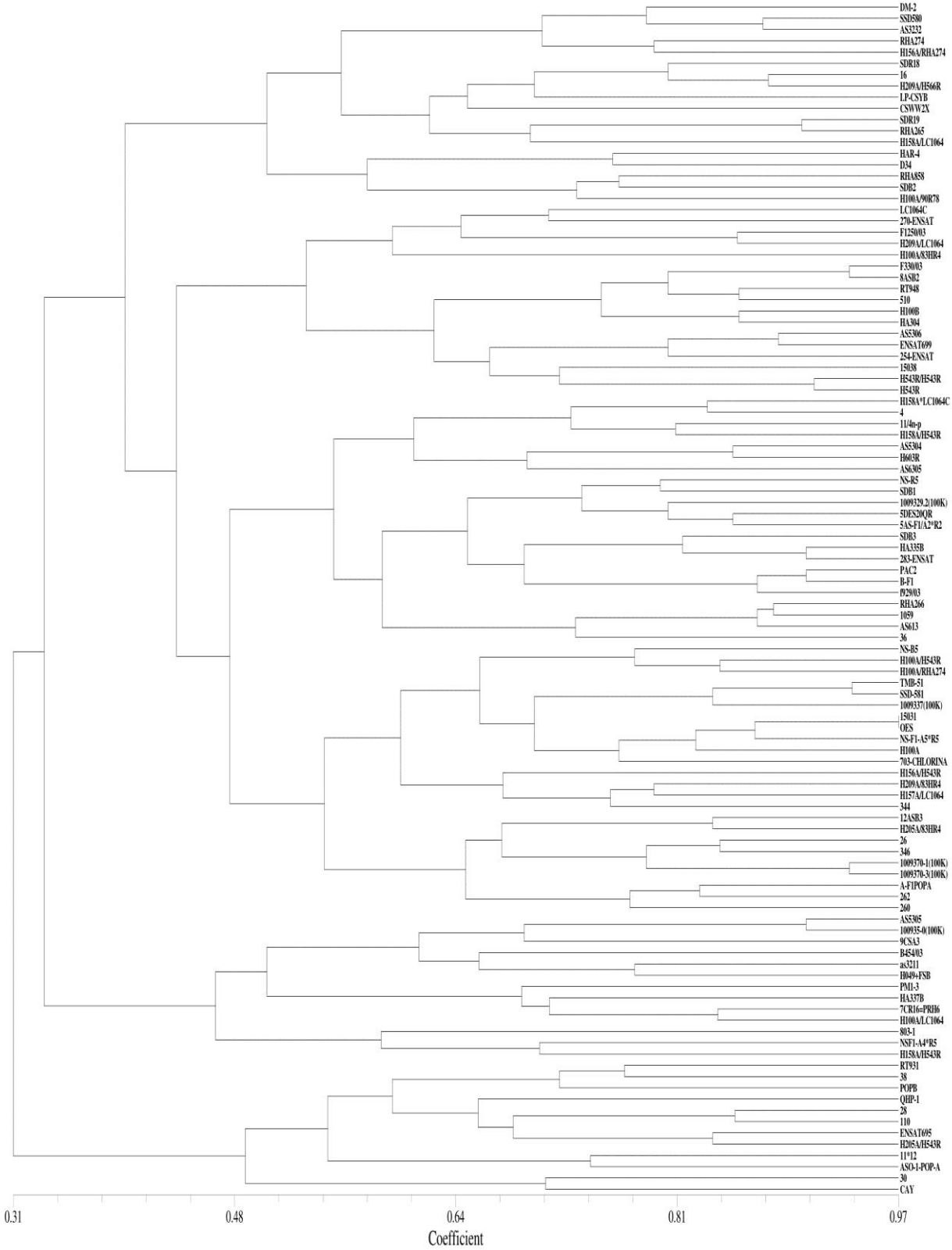
گروه X Group X	گروه Y Group Y	شاخص تثبیت Fst	جریان ژنی Nm	فاصله ژنتیکی UNei GD	شباهت ژنتیکی UNei ID
USDA-USA	ASGROW	0.027	8.994	0.012	0.988
USDA-USA	NOVARTIS	0.083	2.776	0.062	0.939
ASGROW	NOVARTIS	0.062	3.758	0.044	0.957
USDA-USA	INRA MONTPOL	0.065	3.584	0.035	0.966
ASGROW	INRA MONTPOL	0.043	5.550	0.012	0.988
NOVARTIS	INRA MONTPOL	0.066	3.538	0.020	0.980
USDA-USA	ENSAT	0.049	4.882	0.039	0.962
ASGROW	ENSAT	0.037	6.512	0.030	0.971
NOVARTIS	ENSAT	0.076	3.025	0.054	0.948
INRA MONTPOL	ENSAT	0.051	4.656	0.014	0.986
USDA-USA	SPII	0.060	3.944	0.050	0.951
ASGROW	SPII	0.035	6.823	0.024	0.977
NOVARTIS	SPII	0.075	3.069	0.051	0.950
INRA MONTPOL	SPII	0.045	5.316	0.004	0.996
ENSAT	SPII	0.028	8.533	0.004	0.996
USDA-USA	HUNGARY	0.166	1.259	0.178	0.837
ASGROW	HUNGARY	0.166	1.258	0.195	0.823
NOVARTIS	HUNGARY	0.208	0.954	0.210	0.811
INRA MONTPOL	HUNGARY	0.186	1.097	0.166	0.847
ENSAT	HUNGARY	0.141	1.528	0.124	0.883
SPII	HUNGARY	0.141	1.524	0.140	0.869

جدول ۵- تخمین تعدادآلل (Na)، فراوانی آللی (.Na Freq)، تعدادآلل موثر(Ne)، شاخص شانون(I) و درصد پلی مورفیسم (% P) در گروه‌های آفتابگردان روغنی مورد مطالعه

Table 5. Estimation of number of allels (Na), allele frequencies (Na Freq), number of effective alleles (Ne), Shannon index (I) and the percentage of polymorphism (% P) in studied oily sunflower groups

گروه ها Populations	USDA-USA	ASGROW	NOVARTIS	INRA MONTPOL	ENSAT	SPII	HUNGARY
Na	0.099	0.087	0.125	0.104	0.111	0.085	0.144
Na Freq. >= 5%	0.119	0.116	0.125	0.104	0.129	0.099	0.144
Ne	0.080	0.092	0.110	0.075	0.100	0.077	0.122
I	0.050	0.049	0.058	0.054	0.062	0.047	0.061
% P	89.66	100.00	75.86	72.41	86.21	93.10	65.52

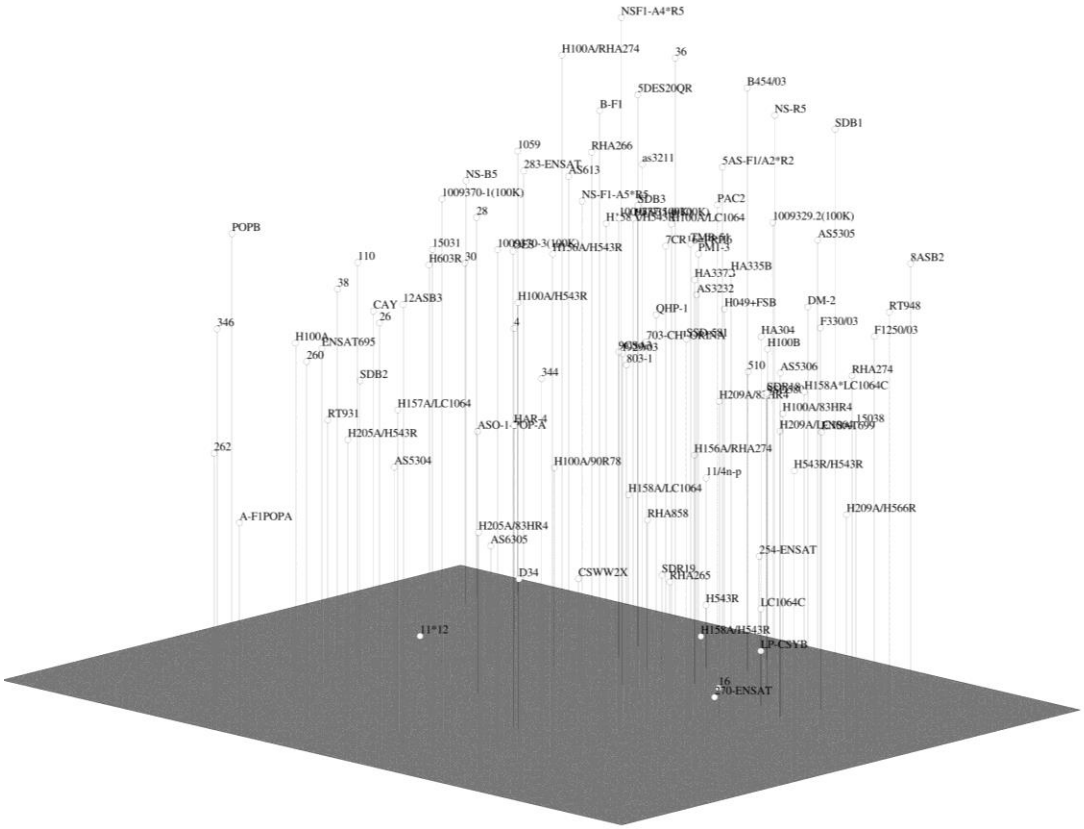
[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]



شکل ۲- دندروگرام ۱۰۶ لاین آفتابگردان روغنی براساس آلگوریتم Complet و ضرایب تشابه جاکارد با استفاده از داده‌های SSR

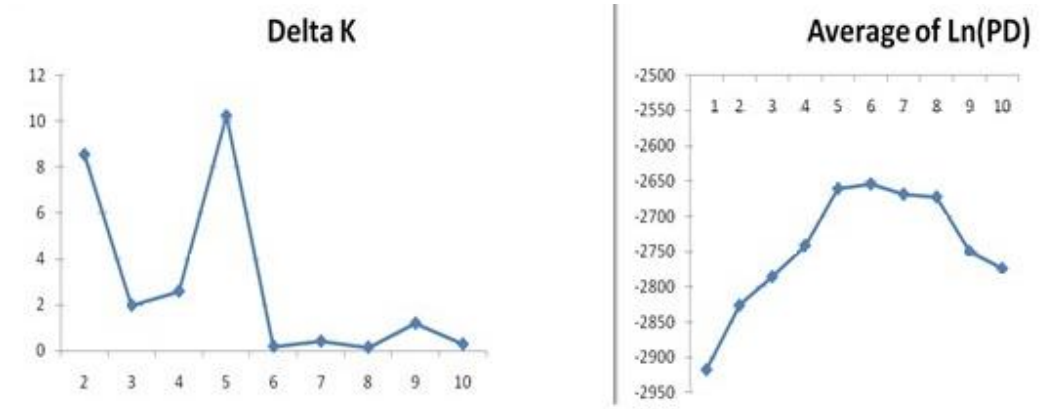
Figure 2. Complete dendrogram based on Jaccard's similarity calculated from SSR data on 106 lines of oily sunflower

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]



شکل ۳- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۱۰۶ لاین آفتابگردان روغنی با استفاده از داده‌های مولکولی

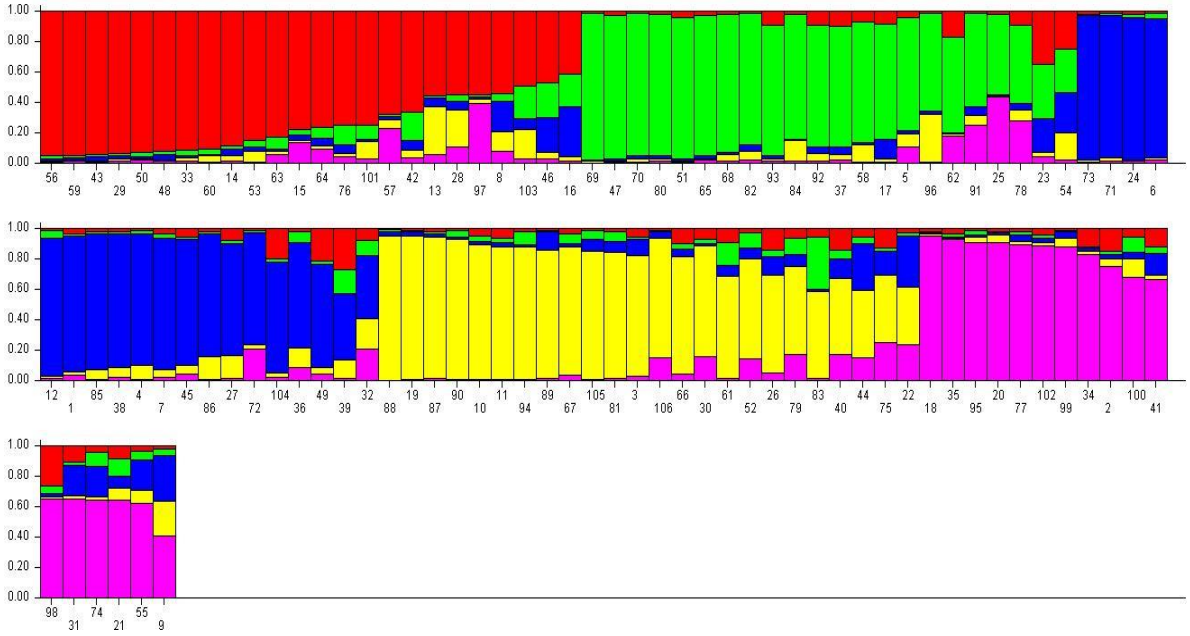
Figure 3. Principal component analysis of 106 sunflower lines using molecular data



شکل ۴- تعیین ساختار جمعیت ها. محور عمودی در نمودار اول شاخص K و در نمودار دوم میانگین Ln(PD) را نشان می‌دهد. محور افقی تعداد زیرجمعیت را نشان می‌دهد.

Figure 4. Determination of population structure. The Y-axis in first diagram is K index and in the second one is Ln(PD). X-axis indicates the number of sub-group.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]



شکل ۵- خویشاوندی ژنتیکی ۱۰۶ ژنوتیپ آفتابگردان روغنی بر اساس نشانگرهای مولکولی SSR تجزیه شده در نرم‌افزار Structure. اعداد در محور عمودی ضریب عضویت هر فرد به زیر جمعیت‌ها و اعداد در محور افقی کد ۱۰۶ ژنوتیپ را نشان می‌دهند. ژنوتیپ‌ها با رنگ‌های یکسان متعلق به یک زیر جمعیت است.

Figure 5. Genetic relatedness of 106 genotypes of oily sunflower with simple sequence repeats (SSRs) analyzed by the Structure program. Numbers on the y-axis indicate the membership coefficient and on the x-axis indicate the genotypes code. Genotypes with the same color belong to the same subgroup.

از کل ۱۰۶ لاین آفتابگردان روغنی، ۳۷ لاین (۳٤/۹۰ درصد) ساختار مخلوط، ۱۵ لاین (۱٤/۱۵ درصد) به هر کدام از ساختارهای اول، دوم، سوم و چهارم و ۹ لاین (۸/٤۹ درصد) به ساختار پنجم تعلق داشتند. ٦٦/٦٦ درصد از لاین های متعلق به گروه INRA-MONTPOL، ٤۰/٦۲ درصد از گروه ASGROW و ۳۵/۷۱ درصد از گروه USDA-USA ساختار مخلوط داشتند. این نتایج با کمترین ضریب تمایز ژنتیکی بین لاین‌های ASGROW و USDA-USA (F_{ST}=0.027) هم خوانی دارد. بررسی انتساب لاین ها به زیرساختارهای تهیه شده توسط نرم افزار Structure همچون گروه‌بندی لاین ها با نرم افزار NTSYS، با الگوی خاصی از جمله الگوی تنوع جغرافیایی لاین ها مطابقت نداشت. بر اساس عدم تطابق تنوع ژنتیکی و جغرافیایی بدست آمده در این پژوهش به نظر می رسد که انتخاب ژنوتیپ ها جهت اجرای برنامه های اصلاحی در آفتابگردان روغنی بهتر است با استفاده از تنوع ژنتیکی صورت بگیرد.

با توجه به میزان PIC و تعداد آلل، می‌توان بیان نمود که آغازگرهای HA3040 و ORS733، مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی و تمایز ژنوتیپ‌ها در آفتابگردان روغنی می‌باشند. این آغازگرها بهتر از همه نشانگرهای استفاده شده توانستند فاصله ژنتیکی لاین ها را مشخص کنند. در کل گروه‌بندی لاین ها با نرم افزار NTSYS و تجزیه ساختار با نرم‌افزار استراکچر نشان داد الگوی تنوع مولکولی با تنوع جغرافیایی لاین‌ها مطابقت ندارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که انتخاب والدین برای هیبریداسیون به جای تنوع جغرافیایی مبتنی بر تنوع ژنتیکی باشد. نتایج حاضر نشان داد تنوع درون مراکز تحقیقاتی بیشتر از تنوع بین آنهاست. بنابراین در برنامه‌های اصلاحی می‌توان گیاهان با صفات مطلوب را از درون مراکز انتخاب کرد. همچنین نشان داده شد که جریان ژنی قابل توجهی میان مراکز تحقیقاتی وجود دارد. از آنجایی که عوامل محیطی تاثیری روی نشانگرهای مولکولی ندارند، انتخاب والدین

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

با قابلیت ترکیب پذیری بالا جهت تولید ارقام هیبرید بر اساس گروه‌بندی هتروتیک حاصل از نشانگرهای SSR می تواند موثر باشد. با تلاقی لاین های دو مرکز NOVARTIS (فرانسه) و HUNGARY (مجارستان) که بیشترین فاصله ژنتیکی نی(GD=۰/۲۱۰) را نشان می‌دهند احتمالا بیشترین هتروزیس را می توان در نتاج مشاهده نمود. همچنین، شناسایی ژنوتیپ‌هایی که از لحاظ ژنتیکی و فنوتیپی بیشترین فاصله را از هم داشته باشند در برنامه های مکان‌یابی QTLهای کنترل کننده صفات کمی نقش اساسی دارد. با استفاده از این ژنوتیپ‌ها میتوان جمعیت های مکان‌یابی با تفرق بالا در افراد را توسعه داد که امکان مکان‌یابی QTLهای کوچک اثر نیز امکان‌پذیر گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه که امکانات لازم برای انجام این تحقیق را فراهم نمودند، صمیمانه تشکر نمایند.

References

Basirnia, A., Darvishzadeh, R. and Abdollahi Mandoulakani, B. (2016). Retrotransposon insertional polymorphism in sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines revealed by IRAP and REMAP markers. *Plant Biosystems*, **150(4):** 641-652.

Cheres, M.T. and Knapp, S.J. (1998). Ancestral origins and genetic diversity of cultivated sunflower: Coancestry analysis of public germplasm. *Crop Science*, **38:** 1476-1482.

Darvishzadeh, R. (2012). Phenotypic and molecular marker distance as a tool for prediction of heterosis and F1 performance in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-water and water-stressed conditions. *Australian Journal of Crop Science*, **6(4):** 732-738.

Darvishzadeh, R., Azizi, M., Hatami-Maleli, H., Bernusi, I., Abdollahi Mandoulakani, B., Jafari, M. and Sarrafi, A. (2010). Molecular characterization and similarity relationships among sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines using some simple sequence repeats. *African Journal of Biotechnology*, **9:** 7280-7288.

Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA mini-preparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1:** 19-21.

Diz, P.A. and Presa, P. (2009). The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). *Aquaculture*, **287:** 278-285.

Dong, G.J., Liu, G.S. and Li, K.F. (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 Genetics*, **43:** 627-635.

Dry, P.J. and Burdon, J.J. (1986). Genetic structure of natural populations of wild sunflowers (*Helianthus annuus* L.) in Australia. *Australian Journal of Biological Science*, **39:** 255–270.

Eathing, S.R., Crosbie, T.M., Edwards, M.D., Reiter, R.S. and Bull, J.K. (2007). Molecular markers in a commercial breeding program. *Crop Science*, **47(S3):** S154-S163.

Ebrahimi, M. and Zinoabedini, M. (2013). Application of genomic and unigene-based microsatellite markers in conservation and management of genetic resources of some Iranian crops. *Crop Biotechnology*, **4:** 133-148 (In Persian).

Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14(8):** 2620.

Fick G.N. and Zimmer, D.E. (1974). Parental lines for production of confection sunflower hybrids. *North Dakota Farm Research*, **31:** 15-16.

Fick, G.N. (1989). *Sunflower*. pp. 301-318, In: G. Robbelen, R.K. Downey and A. Ashri (ed.), Oil Crops of the world. McGraw-Hill, New York, USA.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

Gabor, T., Gasper, Z. and Jurka, J. (2000). Microsatellite in different eukriotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, **10:** 967-981.

Galaev, A.V., Babayants, L.T. and Sivolap Yu., M. (2006). DNA-markers for resistance to common bunt transferred from *Aegilops cylindrica* host. to hexaploid wheat. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, **42:** 62-65.

Garayalde, A.F., Poverene, M., Cantamutto, M. and Carrera, A.D. (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.

Gharghani, A., Zamani, Z., Talaie, A., Oraguzie, N.C., Fatahi, R., Hajnajari, H., Wiedow, C. and Gardiner, S.E. (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. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **13:** 1-14.

Heiser, C.B. (1976). *Sunflowers: Helianthus (Compositae- Heliantheae)*. pp. 36-38, In: N.W. Simmonds (ed.), Evolution of Crop Plants. Longmans Green, London, EN.

Hu, J., Seiler, G. and Kole, C. (2010). *Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower*. CRC Press, Clemson, USA.

Iqbal, M.A., Sadaqat, H.A. and Khan, I.A. (2008). Estimation of genetic diversity among sunflower genotypes through random amplified polymorphic DNA analysis. *Genetics and Molecular Research*, **7:** 1408-1413.

Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R. and Dhawan, A.K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, **177:** 309-334.

Khelestkina E.K., Pestsova, E.G., Salina, E., Roder, M.S., Abruzova, V.S., Koval, S.F. and Bomer, A. (2002). Genetic mapping and tagging of wheat genes using RAPD, STS and SSR markers. *Cellular and Molecular Biology Letters*, **7:** 795-802.

Kholghi M., Darvishzadeh, R., Bernousi, I., Pirzad, A. and Laurentin, H. (2012). Assessment of genomic diversity among and within Iranian confectionary sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations by using simple sequence repeat markers. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, **62:** 488-498.

Kubo, N., Hirai, M., Kaneko, A., Tanaka, D. and Kasumi, K. (2009). Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers in the water lotus (*Nelumbo nucifera*). *Aquatic Botany*, **90:** 191-194.

Laurentin H. (2009). Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **56:** 277-292.

Li Y.C., Korol, A.B., Fahima, T. and Nevo, E. (2004). Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **21:** 991-1007.

Liu, Z. (2007). Aquaculture Genome Technologies. Blackwell Publishing.

Morgante, M., Hanafey, M. and Powell, W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, **30:** 144-200.

Mondini, L., Noorani, A. and Pagnotta, M.A. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, **1:** 19-35.

Muller, M.E., Delieux, F., Fernandez Martınez, J.M., Garric, B., Lecomte, V., Anglade, G., Leflon, M., Motard, C. and Segura, R. (2009). Occurrence, distribution and distinctive morphological traits of weedy *Helianthus annuus* L. populations in Spain and France. *Genetics Resources and Crop Evolution*, **56:** 869-877.

Naseri, L., Darvishzadeh, R., Mohseniazar, M. and Alizadeh, A. (2011). Molecular characterization and similarity relationships among some Iranian native and commercial apple

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

(*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. and Esteban Hopp, H. (1999). *Microsatellite development for sunflower*. In: Proceeding of Plant and Animal Genome VII Conference, San Diego: Starford University Press, USA.

Paniego, N., Echaide, M., Munoz, M., Fernandez, L., Torales, S., Faccio, P., Fuxan, I., Crrera, M., Zandomeni, R., Syarez E.Y. and Esteban Hopp H. (2002). Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome*, **45:** 34-43.

Paniego, N., Heinz, R., Fernandez, P., Talia, P., Nishinakamasu, V. and Esteban Hopp H. (2007). *Sunflower*. pp. 153-177. In: C. Kole (ed.), Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Vol. 2, Oilseeds. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany.

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.

Piñera, J.A., Blanco, G., Vázquez, E. and Sánchez, J.A. (2007). Genetic diversity of black spot sea bream (*Pagellus bogaraveo*) populations off Spanish Coasts: a preliminary study. *Marine Biology*, **151:** 2153–2158.

Poormohammad Kiani, S., Talia, P., Maury, P., Grieu, P., Heinz, R., Perrault, A., Nishinakamasu, V., Hopp, E., Gentzbittel, L., Paniego, N. and Sarrafi, A. (2007). Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science*, **172:** 773-787.

Pritchard J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155:** 945-959.

Rincon, F., Johnson, B., Crossa, J. and Taba, S. (1996). Cluster analysis, an approach to sampling variability in maize accessions. *Maydica*, **41:** 307-316.

Rohlf F.J. (1998). NTSYSpc: *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Version 2.02. Exeter Software, Setauket, New York.

Rosenberg N.A., Pritchard, J.K., Weber, J.L., Cann, H.M., Kidd, K.K., Zhivotovsky, L.A. and Feldman, M.W. (2002). The genetic structure of human populations. *Science*, **298:** 2381–2385.

Sabzalian M.R., Mirlohi, A.F., Saeidi, G. and Rabbani, M.T. (2009). Genetic variation among populations of wild safflower, *Carthamus oxyacanthus*, analyzed by agro-morphological traits and ISSR markers. *Genetic Resource and Crop Evolution*, **56:** 1057-1064.

Tang, S. and Knapp S. J. (2003). Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American landraces and wild populations of cultivated sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, **106(6):** 990-1003.

Tang, S., Yu, J.K., Slabaagh, M.B., Shintani, D.K. and Knapp, S.J. (2002). Simple sequence repeats map of the sunflower genome. *Theoretical and Applied Genetics*, **105:** 1124-1136.

Thormann, C.E., Ferreira, M.E., Camargo, L.E.A., Tivang, J.G. and Osborn, T.C. (1994). Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics*, **88:** 973-980.

Varshney R.K., Graner, A. and Sorrells, M.E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, **23:** 48-55.

Vienne, D. (2003). *Molecular Markers in Plants Genetics and Biotechnology*. Science publishers Inc., Enfield, NH.

Weber, J.J. (1990). Informativeness of human (dC-dA)n (dG.dT)n polymorphisms. *Genomics*, **7**: 524-530.

Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15:** 323-354.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

Yu, J.K., Mangor, J., Thompson, L., Edwards, K.J., Slabaugh, M.B. and Knapp, S.J. (2002). Allelic diversity of simple sequence repeats among elite inbred lines of cultivated sunflower. *Genome,* **45:** 652-660.

Zhang, L.S., Le Clerc, V., Li, S. and Zhang, D. (2005). Establishment of an effective set of simple sequence repeat markers for sunflower variety identification and diversity assessment. *Canadian Journal of Botany,* **83(1):** 66-72.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]

[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]

Genetic Diversity and Structure Analysis of Oily Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Based on Microsatellit Markers

Fatemeh Sahranavard Azartamar[1], Mortaza Ghadimzadeh[2] and Reza Darvishzadeh[3,*]

1- Former M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: December 28, 2015 – Accepted: March 12, 2016)

Abstract

Knowledge about the amount of genetic diversity and understanding relationship between genotypes are important steps in plant germplasm conservation and breeding activities. In this study, the genetic diversity among 106 sunflower lines was assessed by 30 microsatellite primers. A total of 71 alleles were detected. Number of alleles in microssatellite loci ranged from 2 to 4 with the average number of 2.207 alleles per locus. The effective number of alleles ranged from 1.058 in locus ORS718 to 3.147 in locus HA3040. The average number of effective alleles was 1.641. The mean of PIC value was 0.344. Based on allele number and PIC value, SSR loci such as HA3040 and ORS733 are considered appropriate markers for studying genetic diversity in oily sunflower. Based on the results of cluster analysis using Jaccard's similarity coefficient and complete algorithm, the lines were grouped into four groups. Nineteen six out of 106 genotypes were grouped according to their origins (research centers). The highest and lowest Nei genetic distances were 0.21 and 0.004 between "NOVARTIS and HUNGARY" and "SPII with ENSAT and INRA-MONTPOL" groups, respectively. Analysis of the population structure revealed 5 subpopulations in the studied panel. The results show that the assignment of lines to subpopulations is not concordance with their geographical distribution pattern. The genetic diversity and distance revealed by SSR markers can be used in oily sunflower crossing and breeding programs.

Keywords: Sunflower, Cluster analysis, Genetic diversity, Microsatellites, Subpopulation

* **Corresponding Author, E-mail: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.2.6]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.15]