



مطالعه تنوع ژنتیکی توده‌های بومی آفتابگردان آجیلی (*Helianthus annuus L.*) ایران با استفاده از

نشانه‌های رتروترانسپوزونی IRAP

اشکان بصیرنیا^۱، رضا درویش زاده^{۲*}، بابک عبدالمهدی مندولکانی^۳، علیرضا نبی پور^۴

^۱ کارشناس ارشد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

^۲ دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

^۳ دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

^۴ استادیار معاونت تحقیقات برنج کشور، آمل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۹/۱۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۲/۲۰

چکیده

وجود تنوع ژنتیکی برای بدست آوردن ارقام با عملکرد بالا، کیفیت بهتر، تحمل بیشتر به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و مقاومت بیشتر به آفات و بیماری‌ها، برای به‌نژادگران ضروری است. رتروترانسپوزون‌ها فراوان‌ترین و رایج‌ترین عناصر جابه‌جا شونده در ژنوم یوکاریوت‌ها به‌ویژه ژنوم گیاهان می‌باشند. توزیع گسترده رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم گیاهان استفاده از آن‌ها را به عنوان نشانه‌های مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی ایده‌آل ساخته است. در این مطالعه فعالیت رتروترانسپوزون‌ها و همچنین تنوع ژنتیکی در ۱۰ توده بومی آفتابگردان آجیلی با استفاده از نشانه‌های IRAP (Inter-retrotransposon amplified polymorphism) بررسی شد. از ۲۵ آغازگر و ترکیب آغازگری IRAP، ۱۱ آغازگر قادر به تولید الگوی باندهای چند شکل با وضوح بالا بودند. ۱۱ آغازگر IRAP، ۱۱۶ مکان را تکثیر کردند که از این تعداد ۱۱۰ مکان چند شکل بود. حداقل تشابه ژنتیکی نی (۰/۷۴) بین توده‌های همدان و مشهد، و حداکثر تشابه (۰/۸۸) بین توده‌های مرند و اصفهان مشاهده شد. تجزیه کلاستر با استفاده از الگوریتم UPGMA، ۱۰ توده بومی آفتابگردان آجیلی را در ۳ گروه اصلی 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. نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مرز با نشانه‌های IRAP نشان داد که رتروترانسپوزون‌های مطالعه شده در ژنوم آفتابگردان فعال هستند و به صورت سربه‌سر، سربه‌دم و دم‌به‌دم در ژنوم ادغام شده‌اند. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که نشانه‌های مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها ابزاری مفید برای مطالعات ژنومیکس در آفتابگردان می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان آجیلی، تجزیه کلاستر، توده‌های بومی، رتروترانسپوزون، نشانه‌های مولکولی.

شرایط محیطی است. علاوه بر شرایط محیطی تظاهر این نشانگرها بوسیله برهمکنش‌های ناشی از اپیستازی و پلیوتروپی تغییر می نماید. تعداد نشانگرهای مورفولوژیک خصوصا در تلاقی‌های درون گونه‌ای بسیار محدود است. نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA، تنوع در توالی DNA افراد مختلف را شامل می‌شوند. تنوع این نشانگرها در سطوح فنوتیپی تظاهر نمی‌یابد. نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA، تکمیل کننده نقاط ضعف نشانگرهای مورفولوژیک بوده و اطلاعات بسیار مفیدی درباره چندشکلی، روابط ژنتیکی و تنوع ژنتیکی در اختیار محققین قرار می دهند (Chalmers et al., 2001). نشانگرهای مولکولی مختلفی از قبیل RFLP (Cheres and RFLP, 1998) و AFLP (Dong et al., 2007; Knapp, 1998) و RAPD (Iqbal et al., Darvishzadeh, 2012) و SSR (Darvishzadeh et al., 2010; SSR, 2008) و Kholghi et al., 2012 جهت بررسی تنوع ژنتیکی و پیش‌بینی عملکرد هیبریدها در آفتابگردان استفاده شده است.

در دو دهه اخیر نشانگرهای مولکولی بسیاری مبتنی بر رتروترانسپوزونها برای بررسی خصوصیات ژنتیکی گیاهان توسعه یافته‌اند (Waugh et al., 1997; Flavel et al., 1998; Kalendar et al., 1999). فراوانی، توزیع و پراکنش بسیار بالای رتروترانسپوزونها در ژنوم گیاهی، آن‌ها را به یک عامل ممتاز جهت توسعه سیستم‌های نشانگر مبتنی بر DNA تبدیل کرده است. مقایسات مستقیم بین نشانگرهای مبتنی بر

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) با مبدا تکامل شمال غرب آمریکا، یکی از مهمترین محصولات زراعی در جهان است (FAO, 2010). سطح زیر کشت آفتابگردان در جهان در سال زراعی ۲۰۰۸/۲۰۰۹ میلادی حدود ۲۴ میلیون هکتار و مقدار بذر تولید شده حدود ۳۳ میلیون تن می باشد (FAO, 2010). ارقام زراعی آفتابگردان دارای دو تیپ روغنی و آجیلی می‌باشند (Salunkhe et al., 1999). در تیپ آجیلی درصد روغن کمتر از ۳۰ درصد می باشد ولی درصد پروتئین بالایی دارند (Lu and Hoefl, 2009). وزن صد دانه بین ۱۰ تا ۲۰ گرم و حتی بیشتر متغیر است و به منظور مصرف آجیلی مورد استفاده قرار می گیرند (Lu and Hoefl, 2009).

کشاوری نوین باعث کاهش تنوع ژنتیکی گیاهان زراعی نسبت به اجداد وحشی آن‌ها شده است. وجود تنوع ژنتیکی برای بدست آوردن ارقام با عملکرد بالا، کیفیت بهتر، تحمل بیشتر به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و مقاومت بیشتر به آفات و بیماری‌ها، برای به‌نژادگران ضروری است (Laurentin, 2009). خصوصیات مورفولوژیک از جمله اولین نشانگرهای مورد استفاده در ارزیابی تنوع بین و میان جمعیت‌ها به‌شمار می‌آیند. ارزیابی با این نشانگرها معمولا کم هزینه و آسان است اما عوامل متعدد نامطلوبی با نشانگرهای مورفولوژیک مرتبط هستند. اولین عامل وابستگی یا تاثیر پذیری بالای این صفات از

اطلاعات کافی در مورد تنوع ژنتیکی و گروه بندی آنها محققین را بر آن داشت تا از نشانگرهای IRAP جهت بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین گروه‌های هتروتیک و همچنین بررسی چند شکلی درجی^۲ رتروترانسپوزون‌ها در توده‌های بومی آفتابگردان آجیلی استفاده نمایند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

در این مطالعه، ۱۰ توده بومی آفتابگردان آجیلی از مناطق مختلف مرسوم کشت آفتابگردان آجیلی در کشور شامل ارومیه، خوی، بوکان، مرند، میانه، سنندج، همدان، شاهرود، اصفهان و مشهد جمع‌آوری گردید. از هر توده تعداد ۵ بذر در گلدان‌های کوچک حاوی ترکیب پیت ماس و ورمیکولیت کشت گردید و جهت رشد در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۵۴ درصد رطوبت قرار داده شد. نمونه برداری از برگ‌های جوان گیاهان ۱۵ روزه با استفاده از نیتروژن مایع صورت گرفت و بافت‌های برگ‌ها تا زمان استخراج DNA در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. DNA ژنومی با استفاده از روش Dellaporta *et al.*, (1983) با اندکی تغییرات استخراج شد. DNA ژنومی در نهایت در مقدار ۱۰۰ μl بافر TE (Tris 10mM, EDTA 1mM; pH 8.0) حل شد. کمیت و کیفیت DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه بیوفتومتر ۶۱۳۱ (Eppendorf, Germany) تعیین

رتروترانسپوزون‌ها و سایر نشانگرها، حاکی از چندشکلی بالا و ارائه نمودن اطلاعات مفید توسط این نشانگرها در گیاهان است (Abdollahi Mandoulakani *et al.*, 2008; Abdollahi Mandoulakani *et al.*, 2012; Queen *et al.*, 2004; Tam *et al.*, 2005). IRAP^۱ یکی از انواع نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها می باشد که به‌عنوان یک نشانگر مولکولی جهت بررسی تنوع ژنتیکی و بررسی وقایع درج (insertion) رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم گیاهان قابل استفاده است (Kalendar *et al.*, 1999). از نشانگرهای رتروترانسپوزونی بطور موفقیت آمیزی در ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان مختلفی از قبیل جو (Kalendar *et al.*, 1999)، گندم (Abdollahi Mandoulakani *et al.*, 2008, 2009; Carvalho *et al.*, 2010) و یونجه (Abdollahi Biswas *et al.*, 2010) استفاده شده است. در مطالعه ای، Vukich *et al.*, (2009)، دو گروه از LTR های ژنوم آفتابگردان را جداسازی و توالی‌یابی نموده و سپس آغازگرهایی را جهت بدست آوردن الگوی تکثیری IRAP در ۳۶ گونه وحشی و ۲۶ واریته آفتابگردان طراحی کردند. آنها نشان دادند که نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها می توانند بطور موثری جهت بررسی تنوع ژنتیکی آفتابگردان بکار روند. کشور ایران با توجه به شرایط اقلیمی خاص از مناطق مستعد کشت و کار انواع آفتابگردان بویژه آفتابگردان آجیلی می باشد. وجود ژرم پلاسما غنی آفتابگردان آجیلی در کشور ایران و فقدان

² Insertional polymorphism

¹ Inter-retrotransposon amplified polymorphism

تک پلیمراز (Cinagene Co., Tehran, Iran) و $10\mu\text{M}$ از هر آغازگر در ترموسایکلر ۹۶ پایه (Eppendorf Mastercycler Gradient Type 5331; Eppendorf AG, Hamburg, Germany) انجام شد. چرخه‌های دمایی برای تکثیر به صورت زیر برنامه‌ریزی شد: مرحله اول: واسرشت سازی اولیه در 94°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، مرحله دوم: 37°C چرخه که هر چرخه شامل دمای واسرشت‌سازی در 94°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال 53°C تا 60°C درجه سانتی‌گراد (بسته به ساختار آغازگر، جدول ۲) به مدت ۴۰ ثانیه و دمای توسعه در 72°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و مرحله سوم: دمای توسعه‌ی نهایی در 72°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. جداسازی قطعات با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز $1\% / 1/8$ (Invitrogen Ultra Pure) به مدت ۴ ساعت در 65°C ولت صورت گرفت. رنگ آمیزی قطعات با استفاده از اتیدیوم بروماید با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انجام شد. عکس برداری و ذخیره اطلاعات با استفاده از سیستم ژل داکيومثیشن 212 (Gel Logic PRO, USA) زیر نور UV انجام گرفت.

شد. همچنین کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز $1\% / 1/8$ با ولتاژ 80°C ولت به مدت ۴۵ دقیقه بررسی گردید. DNA های دارای اسمیر یا آلودگی حذف شده و مجدداً از نمونه‌های آنها استخراج DNA انجام گرفت.

واکنش‌های IRAP

با استفاده از ۹ آغازگر مبتنی بر LTR (جدول ۱)، ۹ آغازگر منفرد و ۱۶ ترکیب آغازگری، برای مطالعه تنوع ژنتیکی و چند شکلی درجی رتروترانسپوزون‌ها در ۱۰ توده بومی آفتابگردان آجیلی شامل ۵۰ فرد مورد آزمایش قرار گرفت که از این تعداد ۱۱ آغازگر منفرد و ترکیب آغازگری قادر به تولید چندشکلی درجی در ژنوم آفتابگردان بودند (جدول ۲). آغازگرها بر اساس توالی‌های LTR رتروترانسپوزون‌ها طراحی شدند (Vukich *et al.*, 2009; Schulman AH, Personal communication, 2012) واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم نهایی $20\mu\text{l}$ حاوی حدوداً ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی، $2\mu\text{l}$ از بافر PCR 10X، $1/75\text{ mM}$ کلرید منیزیم، $0/25\text{ mM}$ dNTP (BioFluxbiotech; <http://biofluxbiotech.com>) و $1/1$ واحد آنزیم

جدول ۱- ساختار توالی آغازگرهای رتروترانسپوزونی استفاده شده در توده های آفتابگردان آجیلی.

Table 1- Sequence structure of retrotransposon primers used on confectionary sunflower populations.

نوع رتروترانسپوزون Retrotransposon type	توالی (۵'-۳') Sequence (5'-3')	آغازگر رتروترانسپوزونی Retrotransposon primer
LTR	AGAGGGGAATGTGGGGGTTTCC	1061
LTR	TCTCTATTTATAGCCGAGAGGTG	1062
LTR	GATCCGGTTTCACGGGACTTAC	1063
LTR	CGAAGAACAACCGAATCACC	1064
LTR	AGCCTCTGAAAGACTCGTTCG	1065
<i>Helicopia</i> LTR	GGTTTAGGTTTCGTAATCCTCCGCG	Cf
<i>Helicopia</i> LTR	ACAGACACCAGTGGCACCAAC	Cr
<i>SURE</i> LTR	TAACGGTGTTCTGTTTTCAGG	Uf
<i>SURE</i> LTR	AGAGGGGAATGTGGGGGTTTCC	UR1

جدول ۲- آغازگرهای IRAP (ساده و مرکب یا ترکیبی) استفاده شده در توده های آفتابگردان آجیلی.

Table 2- IRAP primers (single primer and primer combination) used on confectionary sunflower populations.

اندازه باند (جفت باز) Band length (base pair)	دمای اتصال Annealing temperature	درصد مکان های چند شکل Percentage of polymorphic loci	تعداد مکان های چند شکل Number of polymorphic loci	تعداد مکان تکثیر شده Number of loci	آغازگرهای IRAP IRAP primers
2500-500	57	100	9	9	1062
3000-500	56	90	9	10	1065
3000-500	60	91	10	11	1061-1065
2000-250	53	88	8	9	1062-1065
3000-250	55	100	5	5	1063-1064
2000-250	57	83	5	6	1063-1065
3000-500	57	90	9	10	1064-1065
2000-500	60	100	9	9	CF
1500-250	58	100	18	18	Cr
2500-300	58	100	18	18	Uf
2000-250	60	91	10	11	Uf-UR1
		94.8	110	116	مجموع Sum
	57.3		10	10.5	میانگین Mean

آنالیز داده‌ها

مختصات اصلی (PCoA) با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

در این بررسی، تعداد ۹ آغازگر ساده و ۱۶ ترکیب آغازگری برای مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۰ توده بومی آفتابگردان آجیلی استفاده شد که از این تعداد، ۱۱ آغازگر تولید الگوی باندهای چند شکل با وضوح بالا نمودند (جدول ۲). از سری رتروترانسپوزون‌های ۱۰۶۱ تا ۱۰۶۵ فقط ۲ آغازگر ۱۰۶۲ و ۱۰۶۵ تولید الگوی باندهای چندشکل نمودند و سایر آغازگرهای ساده از این سری، یا هیچ باندهای تولید نکردند و یا اینکه الگوی مونومورف تولید نمودند. ۵ آغازگر ترکیبی از سری ۱۰۶۱ تا ۱۰۶۵ تولید الگوی باندهای چند شکل نمودند. از آغازگرهای سری *Helicopia*^۱ (آغازگرهای Cf و Cr، (Vukich et al., 2009)) و سری *SURE*^۲ (آغازگرهای Uf و UR1، (Vukich et al., 2009))، آغازگرهای ساده Cf، Cr و Uf تولید الگوی باندهای چند شکل نمودند و از ترکیبات آغازگری ممکن بین آنها، فقط یک ترکیب آغازگری از آغازگرهای *SURE* تولید الگوی باندهای چند شکل نمود (جدول ۲).

دمای اتصال آغازگرها از ۵۳ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد متغییر بود و میانگین دمای اتصال ۵۷/۳ درجه سانتی‌گراد بود (جدول ۲). یازده آغازگر مورد استفاده (۵ آغازگر ساده + ۶ ترکیب

ابتدا قطعات تکثیر شده به صورت ۰ و ۱ (۰) برای عدم حضور باند و ۱ برای حضور باند) نمره‌دهی شدند. تعداد نشانگرهای تکثیر شده، درصد نشانگرهای چندشکل، تعداد مکان‌ها با فراوانی بیشتر یا مساوی ۰/۵، تعداد مکان‌های اختصاصی، میانگین هتروزیگوسیتی و خطای معیار میانگین هتروزیگوسیتی، سطح تمایز ژنتیکی (PhiPT) و میزان مهاجرت بین گروه‌ها (Nm) با استفاده از نرم‌افزار Peakall and GenALEx 6 (Smouse, 2006) محاسبه شد. آنالیز واریانس مولکولی (Analysis of molecular variance: AMOVA) برای بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون توده‌های بومی با استفاده از نرم‌افزار GenALEx 6 انجام گرفت. برای تعیین فاصله ژنتیکی بین هر جفت از توده‌های بومی، ماتریس فاصله Nei با استفاده از نرم‌افزار GenALEx 6 محاسبه شد. ماتریس فاصله حاصل برای ترسیم دندروگرام بر پایه الگوریتم UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc 2.1 (Rohlf, 2000) مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی مقدار سازگاری بین ماتریس فاصله با ماتریس کوفنتیک حاصل از دندروگرام، ضریب r کوفنتیک با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc 2.1 محاسبه شد. ماتریس Dcenter از ماتریس فاصله Nei با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc 2.1 محاسبه شد و برای انجام محاسبات تجزیه به

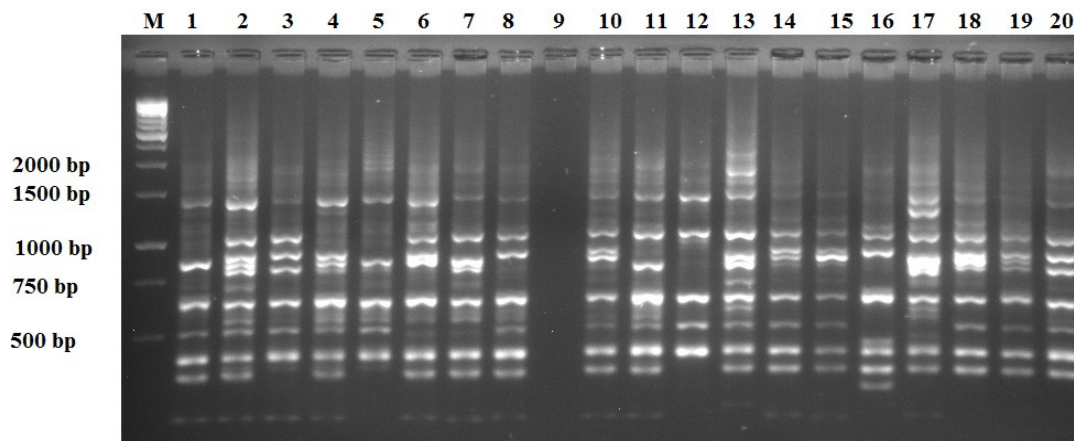
¹ *Helianthus copia*-like detecting element

² Sunflower unidentified detecting retroelement

نشان داد که دو مولفه اول در مجموع ۵۰/۴ درصد از تغییرات را توجیه می نمایند. گروه بندی توده های مورد مطالعه با استفاده از دو مولفه اول، همچون تجزیه کلاستر توده ها را در سه گروه قرار داد (شکل ۳). آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که از کل تنوع ژنتیکی، ۱۳ درصد تنوع، بین توده های و ۸۷ درصد تنوع، درون توده های می باشد ($P \leq 0.05$). حداقل تمایز ژنتیکی (۰/۰۰۹) بین توده های بومی سنندج و میانه و حداکثر تمایز ژنتیکی (۰/۲۲۴) بین توده های بومی همدان و میانه مشاهده شد (جدول ۳). حداقل میزان مهاجرت ($Nm=0.86$) بین توده های بومی همدان و میانه و حداکثر آن (۲۷/۵۲) بین توده های بومی سنندج و میانه مشاهده شد (جدول ۳). میانگین هتروزیگوسیتی در دامنه اعداد ۰/۲۵۵ تا ۰/۲۹۹ و تعداد آلل های موثر در دامنه ۱/۴۳ تا ۱/۵۳ بین توده های بومی مرند و سنندج مشاهده شد. ضریب شانون در دامنه ۰/۳۷۶ تا ۰/۴۳۵ بین توده های میانه و سنندج متغیر بود. درصد مکان های چند شکل بین ۶۲/۷۳ تا ۷۵/۴۵ درصد به ترتیب بین توده های میانه و خوی مشاهده شد. فراوانی تمامی باندهای تکثیر شده بیشتر از ۰/۵ بود (جدول ۴).

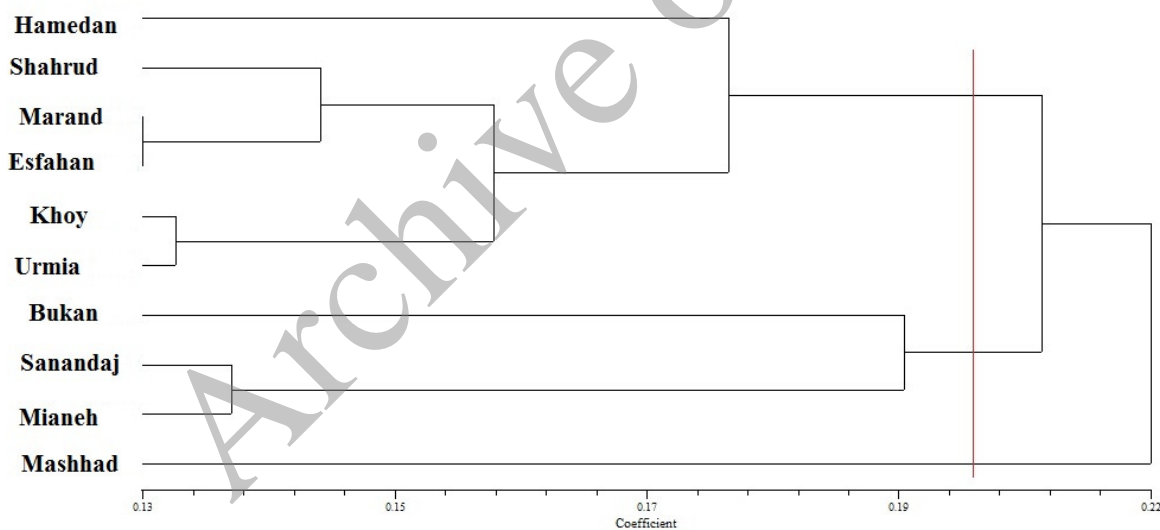
آغازگری (۱۶۶ مکان را تکثیر نمودند که از این تعداد، ۱۱۰ مکان (۰/۹۴/۸) چندشکل می باشد (جدول ۲). مکان های چندشکل به ازای هر آغازگر بین ۵ تا ۱۸ مکان متغیر بود. میانگین مکان های چندشکل به ازای هر آغازگر ۱۰ بود (جدول ۲). دامنه طول باندهای تکثیر شده بین ۲۵۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز متغیر بود (جدول ۲). الگوی باندهای تکثیر شده توسط ترکیب آغازگری Uf-Ur1 در شکل ۱ نشان داده شده است.

حداقل فاصله ژنتیکی بر اساس ضریب فاصله Nei (۰/۱۲) بین توده های بومی مرند و اصفهان، و حداکثر فاصله ژنتیکی (۰/۲۶) بین توده های بومی همدان و مشهد مشاهده شد (جدول ۳). میانگین فاصله ژنتیکی بین توده های بومی ۰/۱۵ بود. دندروگرام حاصل از الگوریتم UPGMA با استفاده از ضریب فاصله Nei توده های بومی آفتابگردان مورد مطالعه را در سه گروه قرار داد (شکل ۲). با توجه به شکل ۲، توده های بومی شاهرود، مرند، اصفهان، خوی و ارومیه در گروه اول قرار گرفتند. توده های بومی بوکان، سنندج و میانه در گروه دوم و توده بومی مشهد به تنهایی در گروه سوم قرار گرفت (شکل ۳). نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)



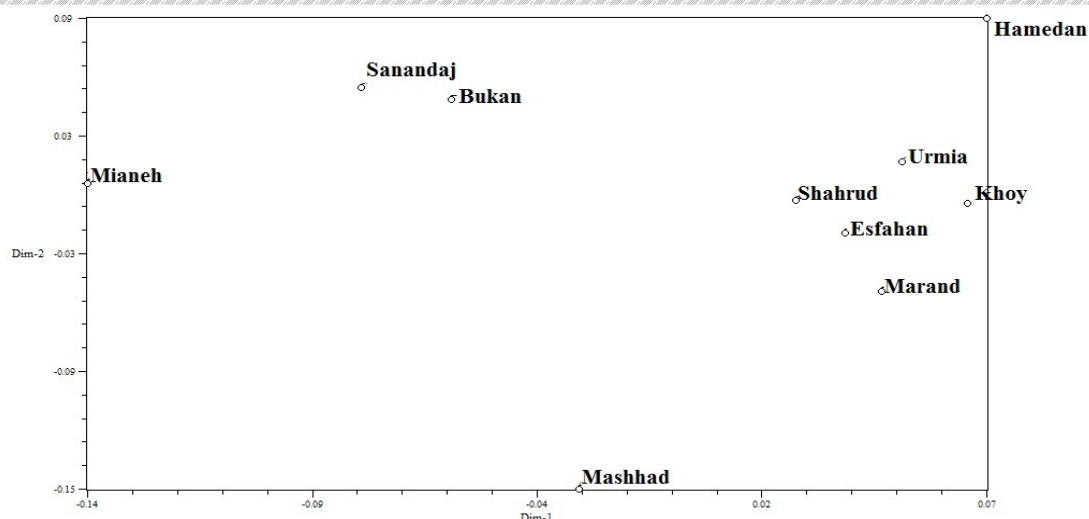
شکل ۱- چند شکلی حاصل از ترکیب آغازگری UF-UR1. ستون M نشانگر وزن مولکولی بر حسب bp، ستون های ۱ الی ۵ افراد توده بومی شاهرود، ستون های ۶ الی ۱۰ افراد توده بومی همدان، ستون های ۱۱ الی ۱۵ افراد توده بومی ارومیه و ستون های ۱۶ الی ۲۰ افراد توده بومی مرند می باشند.

Figure 1- IRAP fingerprints using UF-UR1 primer on sunflower genotypes. Lanes from left to right: M show 1kb DNA ladder (Fermentas) in base pairs; 1 to 5: individuals from Shahroud population, 6 to 10: individuals from Hamadan population, 11 to 15: individuals from Urmia population, 16 to 20: individuals from Marand population.



شکل ۲- دندروگرام ۱۰ توده بومی آفتابگردان آجیلی براساس الگوریتم UPGMA و ضرایب فاصله نی با استفاده از داده های IRAP.

Figure 2- Dendrogram of 10 confectionary sunflower populations based on UPGMA algorithm and Nei genetic distance using IRAP data.



شکل ۳- پلات دو بعدی ۱۰ توده بومی آفتابگردان آجیلی بر اساس تجزیه به مختصات اصلی.

Figure 3- Two dimensional plot of the genetic relationship among 10 sunflower populations produced by principle coordinate analysis on IRAP data.

جدول ۳- تمایز ژنتیکی، فاصله ژنتیکی نی و میزان مهاجرت بین هر جفت از توده های بومی.

Table 3- Genetic differentiation (PhiPT), number of migration (Nm) and Nei genetic distance (GD) values between each pair-wise confectionary sunflower populations.

Pop1	Pop2	Nei			Pop1	Pop2	Nei		
		PhiPT	GD	Nm			PhiPT	GD	Nm
Hamedan	Shahrud	0.141	0.16	1.52	Khoy	Mashhad	0.131	0.21	1.65
Hamedan	Khoy	0.092	0.17	2.47	Urmia	Mashhad	0.177	0.23	1.15
Shahrud	Khoy	0.092	0.17	2.45	Marand	Mashhad	0.053	0.16	4.43
Hamedan	Urmia	0.136	0.19	1.59	Bukan	Mashhad	0.134	0.24	1.62
Shahrud	Urmia	0.030	0.14	7.98	Esfahan	Mashhad	0.090	0.17	2.51
Khoy	Urmia	0.077	0.13	3.00	Hamedan	Sanandaj	0.136	0.17	1.58
Hamedan	Marand	0.144	0.18	1.48	Shahrud	Sanandaj	0.174	0.19	1.18
Shahrud	Marand	0.094	0.15	2.39	Khoy	Sanandaj	0.159	0.20	1.32
Khoy	Marand	0.061	0.13	3.81	Urmia	Sanandaj	0.172	0.18	1.20
Urmia	Marand	0.144	0.17	1.49	Marand	Sanandaj	0.098	0.17	2.29
Hamedan	Bukan	0.194	0.22	1.03	Bukan	Sanandaj	0.097	0.16	2.33
Shahrud	Bukan	0.146	0.19	1.46	Esfahan	Sanandaj	0.085	0.16	2.69
Khoy	Bukan	0.149	0.20	1.43	Mashhad	Sanandaj	0.129	0.22	1.69
Urmia	Bukan	0.191	0.23	1.05	Hamedan	Mianeh	0.224	0.25	0.86
Marand	Bukan	0.082	0.21	2.79	Shahrud	Mianeh	0.177	0.19	1.15
Hamedan	Esfahan	0.156	0.17	1.35	Khoy	Mianeh	0.181	0.22	1.13
Shahrud	Esfahan	0.077	0.13	2.98	Urmia	Mianeh	0.154	0.21	1.37
Khoy	Esfahan	0.109	0.15	2.03	Marand	Mianeh	0.161	0.23	1.30
Urmia	Esfahan	0.164	0.16	1.27	Bukan	Mianeh	0.172	0.22	1.20
Marand	Esfahan	0.011	0.12	23.03	Esfahan	Mianeh	0.166	0.23	1.25
Bukan	Esfahan	0.048	0.15	4.92	Mashhad	Mianeh	0.154	0.22	1.36
Hamedan	Mashhad	0.208	0.26	0.95	Sanandaj	Mianeh	0.009	0.13	27.52
Shahrud	Mashhad	0.167	0.20	1.24					

جدول ۴- ویژگی های مکان های IRAP تکثیر شده، میانگین هتروزیگوسیتی، تعداد آلل موثر، ضریب شانون و درصد مکان های چند شکل در هر جمعیت.

Table 4- Characteristics of amplified IRAP loci, mean of heterozygosity, effective number of alleles, Shannon's information index and percentage of polymorphic loci in each studied sunflower population.

توده Population	HAMEDAN	SHAHROOD	KHOY	URMIA	MARAND	BUKAN	ESFAHAN	MASHHAD	SANANDAJ	MIANEH
No. Bands	93	91	98	98	97	101	95	95	103	94
No. Bands Freq. $\geq 5\%$	93	91	98	98	97	101	95	95	103	94
No. Private Bands	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. LComm Bands ($\leq 25\%$)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
No. LComm Bands ($\leq 50\%$)	3	2	3	2	3	3	1	3	3	2
Mean He	0.261	0.258	0.281	0.283	0.255	0.255	0.291	0.262	0.299	0.261
SE of Mean He	0.020	0.019	0.018	0.018	0.018	0.019	0.019	0.019	0.019	0.021
Ne	1.46	1.45	1.48	1.49	1.43	1.44	1.52	1.45	1.53	1.48
I	0.381	0.38	0.417	0.419	0.382	0.377	0.423	0.386	0.435	0.376
Percentage of polymorphic loci	64.55	67.27	75.45	74.55	70.91	67.27	71.82	68.18	73.64	62.73

در ژنوم گیاه درج شده باشند می توان فاصله بین آن ها را با طراحی دو آغازگر برای توالی های LTR شان، تکثیر نمود (Vukich et al., 2009). در این مطالعه به جهت افزایش احتمال تکثیر فاصله بین رتروالمنت ها علاوه بر آغازگرهای منفرد یا ساده از ترکیب آغازگرهای رتروترانسپوزونی (آغازگرهای مرکب) نیز استفاده شد. از ۹ آغازگر رتروترانسپوزونی استفاده شده در این مطالعه ۵ آغازگر ساده (1062, 1065, Cf, Cr & Uf) الگوی باندهای چند شکل با وضوح بالا تولید کردند که نشان دهنده فعالیت بیشتر این رتروالمنت ها نسبت به سایر رتروالمنت های استفاده شده در ژنوم آفتابگردان آجیلی است.

بحث

فعالیت رتروترانسپوزون ها در ژنوم آفتابگردان آجیلی

رتروترانسپوزون ها از لحاظ تئوری قادر هستند در جهت گیری های مختلف سر به سر (Head to head)، سر به دم (Head to tail) و دم به دم (Tail to tail) در ژنوم گیاهان درج شوند. در نشانگرهای IRAP، یک آغازگر منفرد در واکنش های زنجیره ای پلی مرز در صورتی تولید الگوی باندهای چند شکل خواهد کرد که دو رتروالمنت مشابه به صورت سر به دم در ژنوم گیاه و در فاصله مناسب از همدیگر درج شده باشند. اگر دو رتروالمنت غیر مشابه به صورت سر به سر

روابط ژنتیکی توده های بومی آفتابگردان آجیلی

بر اساس تجزیه واریانس مولکولی ۸۷ درصد از تنوع ژنتیکی، ناشی از تنوع درون توده های بومی و ۱۳ درصد مربوط به تنوع بین توده های بومی بود. تنوع ژنتیکی درون توده های زیاد می تواند ناشی از طبیعت دگرگشتی گیاه آفتابگردان باشد. تنوع کم بین توده های بومی آفتابگردان آجیلی نشان دهنده جریان کم ژنی بین توده های بومی است. Kholghi *et al.* (2012) نتایج مشابهی در مطالعه تنوع ژنتیکی توده های بومی آفتابگردان آجیلی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره گزارش کردند. در مطالعه ایشان، ۸۶ درصد از تنوع ژنتیکی ناشی از درون توده های بومی و ۱۴ درصد از تنوع مربوط به بین توده های بومی بود.

حداقل تمایز ژنتیکی (۰/۹٪) بین توده های بومی سنندج و میانه مشاهده شد. این موضوع می تواند ناشی از جریان بالای ژنی بین توده های سنندج با میانه باشد. Kholghi *et al.* (2012) نیز با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و بر اساس ضرایب فاصله کسمان و لئونارد (Kosman and Leonard, 2005)، کمترین فاصله ژنتیکی را بین توده های بومی سنندج و میانه گزارش نمودند. حداکثر تمایز ژنتیکی با مقادیر تقریباً ۲۱ و ۲۲ درصد بین توده های بومی همدان با مشهد و میانه مشاهده شد. تمایز ژنتیکی بالای توده های بومی همدان با مشهد بدلیل فاصله جغرافیایی زیاد و

سایر آغازگرهای منفرد هیچ الگوی بانندی قابل نمره دهی ایجاد نکردند. ۵ آغازگر مرکب یا ترکیبی از سری آغازگرهای ساده ۱۰۶۱ تا ۱۰۶۵ و ۱ آغازگر مرکب از سری آغازگرهای *Helicopia*^۱ (آغازگرهای ساده Cr و Cf، (Vukich *et al.*, 2009)) و سری *SURE*^۲ (آغازگرهای ساده Uf و UR1، (Vukich *et al.*, 2009)) تولید الگوی باندهای چند شکل با وضوح بالا نمودند. در ترکیب هر ۵ آغازگر مرکب از سری ۱۰۶۱ تا ۱۰۶۵ رتروالمنت ۱۰۶۵ حضور داشت که این موضوع تأیید کننده فعالیت بیشتر این رتروالمنت در ژنوم آفتابگردان آجیلی می باشد. ۳ آغازگر ساده و ۱ آغازگر مرکب یا ترکیبی حاصل از آغازگرهای *Helicopia* و *SURE* در مجموع ۵۵ مکان چند شکل تولید کردند که این تعداد برابر با کل مکان های چند شکل تولید شده با ۷ آغازگر ساده و مرکب از سری ۱۰۶۱-۱۰۶۵ (۲ آغازگر ساده ۱۰۶۲ و ۱۰۶۵ و ۵ آغازگر مرکب یا ترکیبی از سری ۱۰۶۱-۱۰۶۵) بود. این نتایج حاکی از فعالیت بیشتر رتروالمنت های *Helicopia* و *SURE* نسبت به سایر رتروالمنت های استفاده شده می باشد. با توجه به الگوهای بانندی تولید شده از آغازگرهای ساده و مرکب یا ترکیبی می توان نتیجه گیری کرد که رتروالمنت های استفاده شده در ژنوم آفتابگردان حضور دارند و به صورت سربه سر، سربه دم و دم به دم در ژنوم آفتابگردان درج شده اند.

^۱ *Helianthus copia*-like detecting element

^۲ Sunflower unidentified detecting retroelement

که هیبریدهای حاصل از تلاقی‌های 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 (Hallauer, 1999; Stuber, 1994). بنابراین جمعیت‌هایی با فاصله ژنتیکی بیشتر یا افراد متعلق به گروه‌های هتروژیک مختلف می‌تواند به طور بالقوه به عنوان والدین تلاقی در برنامه‌های اصلاحی آفتابگردان آجیلی مورد استفاده قرار گیرند.

با توجه به مطالب ذکر شده، از نظر اصلاحی حضور و فراوانی رتروترنسپوزون‌های LTR در ژنوم آفتابگردان آجیلی، این امکان را فراهم می‌سازد تا بتوان با استفاده از نشانگرهای IRAP، تنوع ژنتیکی موجود در ژرم پلاسما آفتابگردان آجیلی را با دقت بالایی بررسی نمود. نتایج نشان داد تنوع زیادی در توده‌های آفتابگردان آجیلی وجود دارد و تنوع درون توده‌ها بیشتر از تنوع بین توده‌ها بود. بنابراین در برنامه‌های به نژادی آفتابگردان آجیلی، می‌توان انتخاب را درون توده‌ها انجام داد.

سپاسگزاری

از پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه بدلیل در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی برای انجام این مطالعه سپاسگزاری می‌شود.

طبعاً ناچیز بودن جریان ژنی بین توده‌های بومی مذکور قابل انتظار است.

میزان مهاجرت بین اکثر توده‌های بومی به استثنای توده‌های بومی همدان با میانه و مشهد، بیش از ۱ بود که می‌تواند ناشی از جابجایی بذر توسط انسان یا فاصله اندک جغرافیایی بین توده‌ها باشد (جدول ۳). میزان مهاجرت بین توده‌های بومی همدان با میانه و مشهد کمتر از ۱ بود که می‌تواند ناشی از فاصله جغرافیایی بین همدان با میانه و مشهد باشد. میزان مهاجرت بین توده‌ها (Nm) که نشان دهنده جریان ژنی بین توده‌هاست در صورتی که کمتر از ۱ باشد نشان دهنده ایزوله شدن گروه‌ها از نظر جریان ژنی نسبت به همدیگر است (Wright, 1951).

تجزیه کلاستر با الگوریتم UPGMA با استفاده از ضرایب فاصله Nei، به طور بالقوه توده‌های بومی آفتابگردان را در ۳ گروه هتروژیک دسته‌بندی کرد. مطابق با گزارشات قبلی در گیاهانی از قبیل زعفران (Sabzalian *et al.*, 2009)، گندم (Abdollahi Mandoulakani *et al.*, 2008, 2009) یونجه (Abdollahi Mandoulakani *et al.*, 2012)، نتایج گروه‌بندی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با نتایج تجزیه خوشه‌ای در توافق بود (شکل ۳). در گیاهان زراعی، یکی از معیارهای انتخاب والدین برای تلاقی و بهره‌مندی از پدیده‌ی هتروژیس، فاصله‌ی ژنتیکی می‌باشد. هرچند مکانیزم‌های ژنتیکی که در فرایند هتروژیس دخیل اند به خوبی درک نشده است ولی مشخص شده است

- Abdollahi Mandoulakani B, Bihamta MR, Zali AA, Yazdi-Samadi B, Naghavi MR, Schulman AH (2008). Fine mapping of stripe rust resistance gene Yr15 in durum wheat. *Seed and Plant Improvement Journal* 24: 371–387 (In Persian).
- Abdollahi Mandoulakani B, Bihamta MR, Schulman AH, Zali AB, Naghavi M (2009). Evaluation of retrotransposons as molecular markers in wheat. *Modern Genetics Journal* 4: 17–25 (In Persian).
- Abdollahi Mandoulakani B, Piri Y, Darvishzadeh R, Bernoosi I and Jafari M (2012). Retroelement insertional polymorphism and genetic diversity in *Medicago sativa* populations revealed by IRAP and REMAP markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 30: 286-296.
- Biswas MK, Baig MNR, Cheng YJ, Deng XX (2010). Retrotransposon based genetic similarity within the genus citrus and its relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution* 7: 963–972.
- Carvalho A, Guedes-Pinto H, Martins-Lopes P, Lima-Brito J (2010). Genetic variability of old Portuguese bread wheat cultivars assayed by IRAP and REMAP markers. *Annals of Applied Biology* 3: 337– 345.
- Cheres MT, Knapp SJ (1998). Ancestral origins and genetic diversity of cultivated sunflower: Coancestry analysis of public germplasm. *Crop Science* 38: 1476-1482.
- Chalmers KJ, Campbell AW, Kretschmer J, Karakousis A (2001). Construction of three linkage maps in bread wheat, *Triticum aestivum* L. *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1089-1119.
- 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 Genetics* 43: 627-635.
- Darvishzadeh R, Azizi M, Hatami-Maleli H, Bernusi I, Abdollahi Mandoulakani B, Jafari M, 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.
- 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: 732-738.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Hallauer AR (1999). Temperate maize and heterosis. In: Coors J and Pandey S (Eds.) *Genetics and exploitation of heterosis in crops*, CIMMYT, Mexico City 17–22 Aug. 1997 ASA, Madison, WI. pp. 353–361.
- FAO, 2010; <http://www.fao.org/docrep/012/al375e/al375e.pdf>
- Flavell AJ, Knox MR, Pearce SR, Ellis THN (1998). Retrotransposon based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant Journal* 16: 643–650.
- Iqbal MA, Sadaqat HA, Khan IA (2008). Estimation of genetic diversity among sunflower genotypes through random amplified polymorphic DNA analysis. *Genetics and Molecular Research* 7: 1408-1413.
- Kalendar R, Grob T, Regina M, Souniemi A, Schulman AH (1999). IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 704-711
- Kosman E, Leonard KJ (2005). Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationship between individuals for haploid, diploid and polyploid species. *Molecular Ecology* 14: 415-424.

- Kholghi M, Darvishzadeh R, Bernousi I, Pirzad A, 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 and 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.
- Peakall R, Smouse PE (2006). GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Queen RA, Gribbon BM, James C, Jack P, Falvell AJ (2004). Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 271: 91–97.
- Rohlf FJ (2000). NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York.
- Sabzalian MR, Mirlohi AF, Saeidi G, Rabbani MT (2009). Genetic variation among population of wild safflower, *Carthamus oxyacanthus* analyzed by agro morphological traits and ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56:1057-1064.
- Salunkhe DK, Chavan JK, Adsule RN, Kadam SS (1999). *World oil seeds: Chemistry, technology, and utilization*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Stuber CW (1994). Heterosis in plant breeding. *Plant Breeding Reviews* 12: 227–251.
- Tan SM, Mhiri C, Vogelaar A, KerkveldM, Pearce SR, Le Grandbastien MA (2005). Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 819-831.
- Vukich M, Schulman AH, Giordani T, Natali L, Kalendar L, Cavallini A (2009). Genetic variability in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and *Helianthus* genus as assessed by retrotransposon-based molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 1027-1038.
- Waugh R, McLean K, Flavell AJ, Pearce SR, Kumar A, Thomas BBT, Powell W (1997). Genetic distribution of Bare1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular and General Genomics* 253: 687–694.
- Wright S (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.

Assessment of genetic diversity in Iranian confectionary sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations using retrotransposon based IRAP markers

Basirnia A.¹, Darvishzadeh R.*², Abdollahi Mandoulakani B.³, Nabipur A.⁴

¹MSc, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

²Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

³Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

⁴Assistant Professor, Deputy of Rice Research Institute, Amol, Iran.

Abstract

Genetic diversity is necessary for plant breeders to obtain new cultivars either with high yield, better quality, more adapted to abiotic stress or more resistant to pest and pathogens. Retrotransposons are current component of plant genomes. Ubiquitous, activity and abundant of retrotransposons thorough the plant genome, make them useful molecular marker. We used inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) markers to assess genomic diversity levels and survey the activity of LTR retrotransposon elements in 10 confectionary sunflower populations. Out of 25 single and combined IRAP primers, 11 primers produced scorable and polymorphic banding patterns. A total of 116 loci were amplified by using 11 IRAP primers on confectionary populations. 110 loci out of 116 were polymorphic. The lowest (0.74) and highest (0.88) Nei genetic similarity was observed between Hamedan and Mashhad and Marand and Esfahan populations, respectively. Cluster analysis based on UPGMA algorithm 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. The results showed that retrotransposons are active in sunflower genome and they are inserted in sunflower genome as head-to-head, head-to-tail and tail-to-tail orientations. Our results showed that retrotransposon-based molecular markers can be used as a valuable tool for genomic assessment in sunflower.

Keywords: Cluster analysis, landrace, Retrotransposon, Sunflower, molecular marker.

* Corresponding Author: Darvishzadeh R.

Tel: 09149734458

Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir