مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه بندی لاین های پیشرفته آفتابگردان (*Helianthus annus* L.) با استفاده از نشانگرهای ISSR

حمید حاتمی ملکی*[1]، رضا درویش زاده[2]، زینب محسنی[3]

[1] استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه.

[2] دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه.

[3] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۳۰

چکیده

آفتابگردان از جمله مهمترین محصولات دانه روغنی می باشد. بررسی تنوع ژنتیکی و گروه بندی ژنوتیپ ها و لاین ها از مهمترین عوامل پیشبرد برنامه‌های به نژادی گیاهی است. در این مطالعه، تنوع ژنتیکی و گروهبندی تعدادی از لاین های پیشرفته اصلاحی آفتابگردان حاصل از برنامه های اصلاحی مختلف، با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام شد. تعداد ۱۵ آغازگر ISSR از میان ۲۱ آغازگر با تکثیر مناسب در واکنش زنجیره ای پلی مراز برای انگشت نگاری لاین های آفتابگردان استفاده شدند. در مجموع تعداد ۷۰ نوار بوسیله آغازگرهای ISSR تکثیر شد که تعداد ۲۷ نوار در بین تمام لاین‌ها یک شکل و ٤٣ نوار چندشکل بودند. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار محتوای اطلاعات چندشکل مربوط به آغازگر ۸۰۷ UBC (۰/٤) و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر ۸۰٤ UBC (۰/۱۵) می باشد. با استفاده از ضریب تشابه دایس، کمترین شباهت (۰/٦٥) بین لاین های SF25 با SF278 و بیشترین شباهت (۰/۹۳) بین دو لاین HA336 و SF315 مشاهده شد. تجزیه خوشه ای بر اساس الگوریتم UPGMA لاین‌های مورد مطالعه را در ۸ گروه قرار داد. با توجه به نتایج تجزیه به مختصات اصلی، هر مولفه درصد کمی از تغییرات را توجیه می نمود که این امر نشان دهنده پراکنش ژنومی مناسب آغازگرهای ISSR در این تحقیق بود.

واژه های کلیدی: *نشانگر ISSR، محتوای اطلاعات چندشکلی، تجزیه خوشه ای، تجزیه به مختصات اصلی.*

*نویسنده مسئول: حمید حاتمی ملکی تلفن: ۰۹۱٤۸۹٦٤٥۱۰ Email: Hatamimaleki@maragheh.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

آفتابگردان گیاهی یکساله، دگرگرده‌افشان، دیپلوئید (۲n=۲x=۳٤) و بومی آمریکای شمالی می‌باشد (Dry & Burdon, 1986; Muller *et al.*, 2009). این گیاه با داشتن مقادیر بالای روغن در دانه (۵۰-٤۰٪)، از اهمیت ویژه‌ای در تغذیه جوامع انسانی برخوردار بوده و در سطح وسیعی کشت می‌گردد(Skoric & Marinkovic, 1986). از نظر تولید دانه و روغن، آفتابگردان بعد از سویا و کلزا در رده سوم در جهان قرار داشته و در ایران پس از پنبه و سویا قرار می‌گیرد (Saffari, 2006). ارقام هیبرید آفتابگردان برای اولین بار در اوایل دهه هفتاد میلادی از طریق تلاقی لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی و لاین‌های برگرداننده باروری معرفی شدند که نقطه عطفی در اصلاح آفتابگردان به شمار می‌رود (Fick & Zimmer, 1974). ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه بندی افراد به عنوان یکی از ارکان اصلی به نژادی گیاهی، می‌تواند بر پایه نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی DNA صورت گیرد. در این میان، نشانگرهای مولکولی DNA به دلیل عدم تأثیر پذیری از شرایط محیطی، وراثت‌پذیری و فراوانی بالا از ابزارهای مؤثر برای دستیابی به درک بهتر تنوع ژرم‌پلاسم می باشند (Beckmann & Soller, 1983). یکی از انواع نشانگرهای DNA نشانگر ISSR می‌باشد که توسط Zietkiewicz *et al.* (1994) معرفی گردیده است. در مطالعه ای Garayalde *et al.* (2011)، تنوع ژنتیکی ۱۰ توده وحشی به همراه ٦ لاین اصلاحی آفتابگردان را با نشانگرهای ISSR و SSR بطور همزمان بررسی نمودند. آنها گزارش کردند که توده‌های وحشی تنوع ژنتیکی خود را حفظ کرده اند که برای برنامه‌های اصلاحی مناسب است (Garayalde *et al.*, 2011). در تحقیق دیگری با استفاده از نشانگرهای ISSR، RAPD و SRAP تنوع ژنتیکی بین توده ای و درون توده ای در آفتابگردان گونه H. tuberosus با نام Jerusalem Artichoke (بومی آمریکای شمالی که به منظور استفاده از غده های ریشه ای آن کشت می گردد) مورد ارزیابی قرار گرفت و با استفاده از نرم افزار STRUCTURE و تلفیق داده های هر سه نوع نشانگر، توده های مورد مطالعه در ٦ گروه طبقه بندی شدند Wangsomnuk *et al.*, 2011). اخیراً از نشانگرهای ISSR در کنار ویژگی های کاریوتیپی و کروموزومی، به منظور شناسایی و گروه بندی توده های مختلف آفتابگردان مکزیکی (گونه های بومی آمریکای شمالی که گیاهی مهاجم و علف هرز محسوب می شود) استفاده گردیده است (Yang *et al.*, 2012). مطالعات Yang *et al.* (2012) نشان داد که تعداد کروموزوم در توده های مختلف آفتابگردان مورد مطالعه آنها پایدار بوده و ۲n=۲x=۳٤ می باشد. حال آنکه بر اساس نشانگر ISSR، تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه ای بین توده ها مشاهده گردید. علیرغم اطلاعات مفید بدست آمده از نشانگر ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین روابط ژنتیکی در آفتابگردان، تحقیقات کمی در مورد استفاده از این نشانگر در ارزیابی و

Archive of SID

www.SID.ir

گروه بندی ژنوتیپ ها، ارقام و لاین های اصلاحی آفتابگردان وجود دارد. هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه بندی لاین های اصلاحی پیشرفته آفتابگردان با استفاده از نشانگرهای ISSR بوده است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی و استخراج DNAی ژنومی

بیست و نه لاین پیشرفته آفتابگردان، حاصل از برنامه های اصلاحی مختلف (قسمتی از کلکسیون هسته آفتابگردان در موسسه تحقیقات کشاورزی فرانسه INRA) برای این مطالعه انتخاب شدند. اطلاعات تکمیلی در مورد لاین های مورد مطالعه را می توان در آدرس اینترنتی http://www.heliagene.org یافت. پس از کشت بذور در گلدان ها، استخراج DNAی ژنومی از گیاهچه های ١٠ تا ١٥ روزه با استفاده از روش Doyle & Doyle (1987) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA های استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ٠/٨٪ تعیین گردید. به منظور انگشت نگاری مواد گیاهی مورد مطالعه از ٢١ نشانگر ISSR طراحی شده در دانشگاه بریتیش کلمبیا (University of British Colombia; UBC) استفاده شد. برای شناسایی دمای اتصال بهینه برای آغازگرهای مورد بررسی از PCR گرادیانت استفاده گردید. واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) در حجم نهایی ٢٥ µl شامل ٢/٥ µl بافر ١٠x، ٤ µl dNTP با غلظت ٢٥ mM، ١ µl کلرید منیزیم ٥٠ mM، ٠/٣ µl آنزیم DNA پلیمراز (٥U)، ١١/٢ µl آب دوبار تقطیر ، ١ µl آغازگر ISSR با غلظت ١٠ µM و ٥µl DNA با غلظت ٥ ng/µl انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل واسرشته سازی اولیه به مدت ٤ دقیقه در دمای ٩٤ درجه سانتی گراد، ٣٤ چرخه شامل واسرشته سازی به مدت ٤٥ ثانیه در دمای ٩٤ درجه سانتی گراد، اتصال آغازگر به مدت ١ دقیقه در دمای مناسب اتصال برای هر آغازگر (جدول ١)، مرحله توسعه رشته جدید به مدت ٢ دقیقه در دمای ٧٢ درجه سانتی گراد و در نهایت توسعه نهایی به مدت ١٠ دقیقه در دمای ٧٢ درجه سانتی گراد بود. محصولات PCR در ژل آگارز ٢٪ از همدیگر تفکیک شدند. امتیازدهی الگوی باندها در ژل، به صورت یک برای وجود نوار و صفر برای عدم وجود نوار صورت گرفت. برای هر آغازگری میزان اطلاعات چند شکلی یا PIC (Polymorphic Information Content) براساس فرمول زیر محاسبه شد (Anderson *et al.*, 1992).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} (P_i)^2$$

در این رابطه، P_i فراوانی الل iام و n تعداد الل می‌باشد. برای گروه بندی لاین های مورد مطالعه، میزان تشابه بین آنها بر اساس ضرایب تشابه Dice، Jaccard و Simple matching محاسبه گردید و الگوریتم های UPGMA و WARD با ماتریس تشابه حاصل از هر یک از ضرایب بکار گرفته شد. برای انتخاب الگوریتم گروه بندی و ضریب تشابه مناسب، از ضریب همبستگی

Archive of SID

www.SID.ir

کوفنتیک استفاده شد. محاسبه ضرایب تشابه، گروه بندی لاین ها و ضریب همبستگی کوفنتیک با استفاده از نرم افزار NTSYS (Rohlf, 1998) انجام گرفت. . برای تعیین تعداد مناسب گروه ها از ۱۰۰۰ بار تکرار (Permutation) و ۵ دور (Iteration) برای هر گروه در نرم افزار STRUCTURE (Pritchard *et al*., 2000) استفاده شد. تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نرم افزار NTSYS (Rohlf, 1998) انجام شد.

جدول ۱- نام آغازگرها، دمای اتصال، تعداد نوار تکثیر شده و چندشکل، درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات چندشکلی در لاین های آفتابگردان مورد مطالعه.

Table 1- Name, annealing temperature, amplified fragments, polymorph fragments, percentage of polymorphism and polymorphism information content in studied sunflower lines.

محتوی اطلاعات چندشکلی Polymorphism information content	درصد چندشکلی Percent of polymorphism	تعداد نوار چندشکل Number of polymorph bands	تعداد نوار تکثیر شده Number of amplified bands	دمای اتصال (°C) Annealing temperature	آغازگر Primer
0.26	0.57	4	7	48	UBC810
0.33	0.83	5	6	48	UBC880
0.35	0.75	3	4	51	UBC808
0.26	0.5	3	6	51	UBC820
0.34	0.8	4	5	51	UBC873
0.15	0.33	1	3	41	UBC854
0.33	0.75	3	4	57	UBC849
0.34	0.8	4	5	57	UBC881
0.40	0.8	4	5	47	UBC807
0.21	0.5	3	6	47	UBC827
0.22	0.5	2	4	38	UBC845
0.20	0.5	2	4	39	UBC886
0.31	0.33	1	3	38	UBC887
0.23	0.5	2	4	42	UBC836
0.16	0.5	2	4	42	UBC840
0.27	0.59	2.8	4.6		میانگین

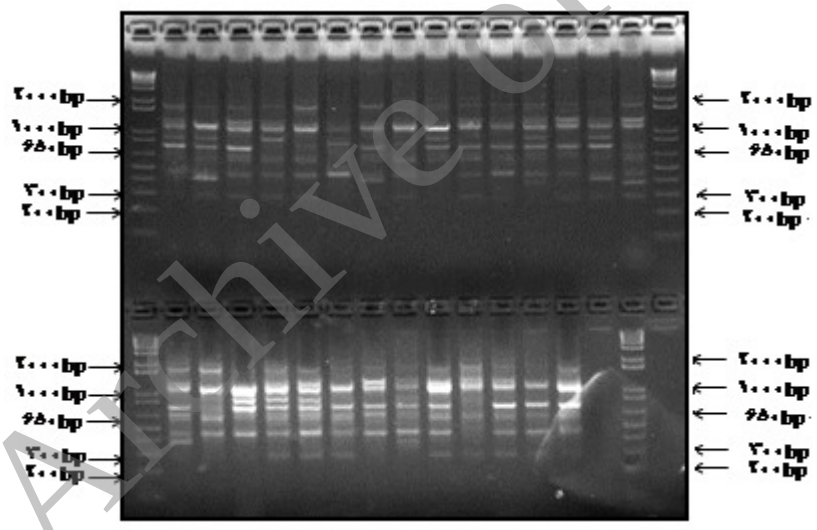
Archive of SID

www.SID.ir

نتایج و بحث

چندشکلی نشانگرهای ISSR

از ٢١ آغازگر ISSR مورد مطالعه ١٥ آغازگر چندشکلی نشان دادند (جدول١). شش آغازگر دیگر، یا اصلا محصولی تولید نکردند و یا اینکه الگوی باندی واضحی نداشتند. پانزده آغازگر ISSR در مجموع تعداد ٧٠ نوار تکثیر نمودند که از بین آن‌ها تعداد ٢٧ نوار در بین تمام لاین‌ها یک شکل و ٤٣ نوار چندشکلی نشان دادند (جدول ١). در شکل ١ الگوی نواربندی محصولات تکثیری ٢٩ لاین با آغازگر UBC ٨١٠ نشان داده شده است. بیشترین تعداد نوار چندشکل (پنج عدد) مربوط به آغازگر UBC ٨٨٠ و کمترین تعداد نوار چندشکل (یک عدد) مربوط به آغازگرهای UBC ٨٥٤ و UBC ٨٨٧ بودند. در مطالعه قبلی که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی توده های وحشی و لاین های اصلاحی آفتابگردان با استفاده از نشانگرهای SSR و ISSR انجام گرفت، تعداد نوارهای تکثیر شده توسط آغازگرهای ISSR بین ٨ تا ١٦ متغیر بود (Garayalde *et al*., 2011).



شکل١- الگوی نواری حاصل از تکثیر DNA ی ٢٩ لاین آفتابگردان با استفاده از آغازگر UBC ٨١٠.

Figure 1- Banding pattern produced by primer UBC 810 in 29 sunflower lines.

نتایج این تحقیق نشان داد که متوسط درصد چندشکلی ٥٩٪ (به طور متوسط ٤/٦ نوار به ازای هر آغازگر). می‌باشد (جدول ١). درصد چندشکلی نسبتاً بالا در مطالعه حاضر نیز بیانگر وجود تنوع ژنتیکی در بین لاین ها و قابلیت نشانگرهای ISSR در شناسایی آن می‌باشد. چندشکلی بالای نشانگرهای ISSR توسط محققین دیگر در گیاهان دیگری مانند آفتابگردان (Garayalde *et al*., 2011)، زیتون (Terzopoulos *et al*., 2005)، توتون

Archive of SID

www.SID.ir

(Mohsenzadeh Golfezani *et al*., 2012) و پسته ایرانی (Tagizad *et al*., 2011) نیز گزارش شده است. محتوای اطلاعات چندشکل برای هر آغازگر ISSR محاسبه گردید (جدول ۱). بیشترین مقدار PIC مربوط به آغازگر UBC ۸۰۷ (۰/٤) و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر UBC ۸۰٤ (۰/۱۵) بود. با توجه به میزان PIC می‌توان بیان نمود که از بین آغازگرهای مورد بررسی، آغازگر UBC ۸۰۷ مناسبترین آغازگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی لاین های آفتابگردان مورد مطالعه بوده است. Darvishzadeh *et al*. (2010) تنوع ژنتیکی ۲۸ لاین آفتابگردان را با ۳۸ آغازگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار دادند و میزان دامنه PIC در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بین ۰/۰۹ تا ۰/٦۲ با میانگین ۰/٤۱ بود.

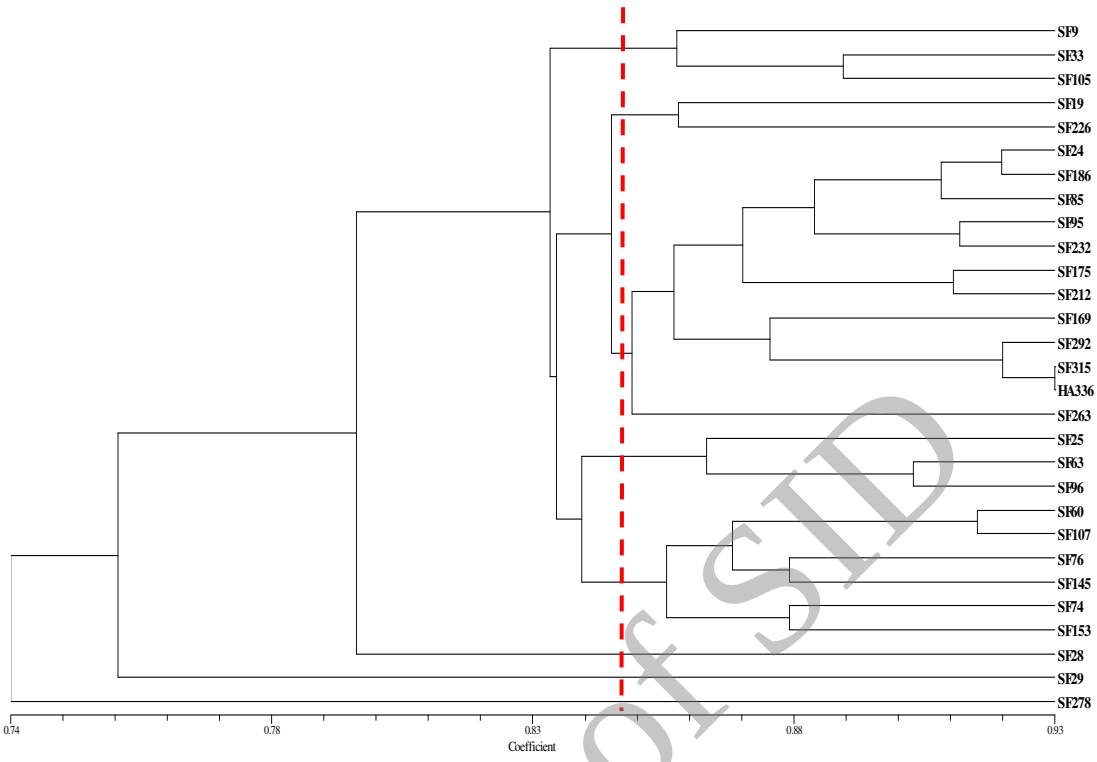
گروه بندی لاین‌های آفتابگردان

گروه بندی لاین های اصلاحی پیش نیاز برنامه های دورگ گیری است. شباهت ژنتیکی لاین‌های آفتابگردان با سه ضریب تشابه تطابق ساده، جاکارد و دایس، محاسبه گردید و سپس گروه بندی لاین ها با استفاده از الگوریتم های UPGMA و WARD انجام گرفت. بر اساس ضریب همبستگی کوفنتیک (r=۰/۸۱) مناسبترین روش از بین روش های برای گروه‌بندی لاین‌های مورد مطالعه، گروه‌بندی بر اساس ضریب تشابه دایس با الگوریتم UPGMA بود (شکل ۲). کمترین شباهت (۰/٦۵) که بیانگر بیشترین واگرایی است بین لاین های SF25 با SF278 و بیشترین شباهت (۰/۹۳) بین دو لاین HA336 و SF315 مشاهده شد. گروه بندی لاین‌های مورد مطالعه با استفاده از الگوریتم UPGMA در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به تغییرات مقدار ΔK به ازای تعداد مختلف گروه ها (K) (شکل ۳) در نرم افزار STRUCTURE (Pritchard *et al*., 2000)، جمعیت لاین های پیشرفته مورد مطالعه می توانند در سه یا هشت گروه قرار بگیرند. با توجه به حداکثر بودن مقدار پیک نمودار در K=۸، تعداد ۸ گروه مطلوب می باشد (Evanno *et al*., 2005). این در حالی است که وجود تنوع ژنتیکی فراوان در کلکسیون هسته آفتابگردان که لاین های مذکور از آن انتخاب شده اند، در مطالعات قبلی توسط Coque *et al*. (2008) با استفاده از نشانگر های ریزماهواره به اثبات رسیده است. در یک بررسی، Garayalde *et al*. (2012) تنوع ژنتیکی موجود در ۱۰ توده وحشی آفتابگردان را به همراه ٦ لاین اصلاحی با استفاده از ۱۰ نشانگر ISSR و ۱٤ نشانگر SSR ارزیابی نمودند. آنها نشان دادند که تنوع ژنتیکی موجود در توده های وحشی ٦۰ درصد بیشتر از تنوع ژنتیکی موجود در لاین های اصلاحی بوده و از طرفی برخلاف توده های وحشی، الل یا نوار اختصاصی SSR یا ISSR در لاین های مورد مطالعه وجود ندارد (Garayalde *et al*. 2011). در مطالعه دیگری، با استفاده از صفات زراعی و مورفولوژیک، تنوع بالایی را در یک ژرم پلاسم آفتابگردان شامل ٤۹ لاین اصلاحی گزارش شد و لاین های مورد مطالعه با استفاده از تجزیه خوشه

Archive of SID

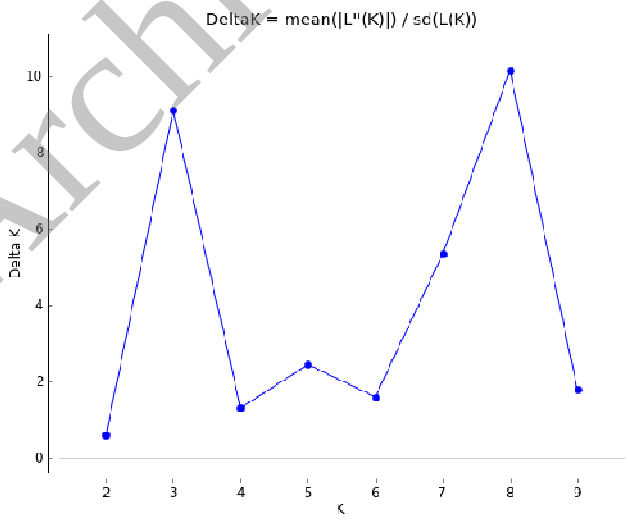
www.SID.ir

ای در دو گروه نرعقیم و نربارور گروه بندی شدند (Ahmadi Avin, 2007).



شکل۲- گروه بندی لاین های آفتابگردان با استفاده از ضریب تشابه Dice و الگوریتم UPGMA.

Figure 2- Classification of sunflower lines by using Dice similarity coefficient and UPGMA algorithm.



شکل ۳- تعیین تعداد مناسب گروه از طریق تغییرات مقادیر ΔK.

Figure 3- Determination of optimum number of groups using variation in ΔK values.

Archive of SID

www.SID.ir

تجزیه به مختصات اصلی جهت کاهش حجم داده‌ها و تجزیه و تحلیل بهتر نتایج صورت گرفت (جدول ۲). با توجه به نتایج تجزیه به مختصات اصلی، دو مولفه اول ۲۳/۱٤٪ و ده مولفه اول ۷۲/۸۵٪ از تغییرات داده ها را توجیه می نمایند. توجیه درصد کمی از تغییرات توسط هر مولفه در این مطالعه، می تواند بیانگر پوشش ژنومی مناسب نشانگرهای ISSR انتخاب شده می باشد. در این مطالعه، گروه بندی لاین ها با استفاده از دو مولفه اول تا حدودی با نتایج تجزیه خوشه ای در توافق بود (شکل ٤). تطابق بین گروه بندی حاصل از تجزیه خوشه ای با تجزیه به مختصات اصلی توسط Sabzalian *et al.* (2009) در زعفران نیز گزارش شده است.

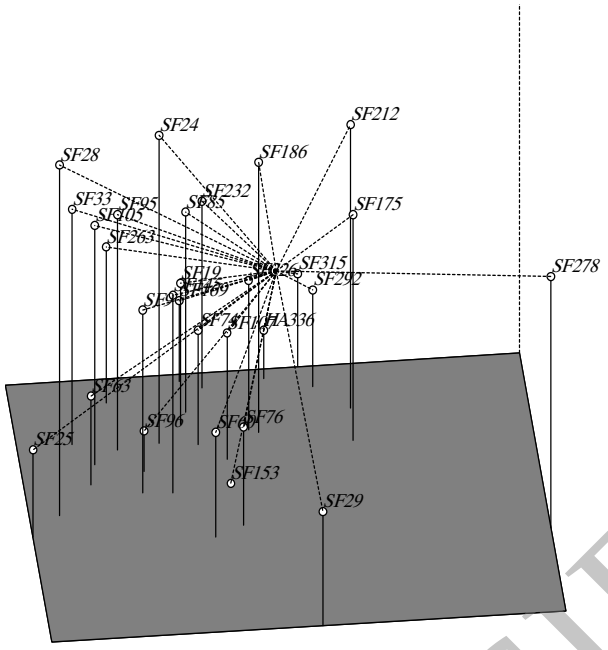
جدول ۲- مقدار ویژه، درصد واریانس و درصد واریانس تجمعی مربوط به ده مولفه اول.

Table 2- Eigen value, percentage of variance and accumulative percentage of variance related to 10 first components.

درصد واریانس تجمعی Cumulative percent of variance	درصد واریانس Percent of variance	مقدار ویژه Eigen value	مولفه component
12.31	12.31	0.59	1
23.14	10.82	0.51	2
32.89	9.75	0.46	3
41.08	8.19	0.39	4
48.22	7.14	0.34	5
54.26	6.03	0.29	6
59.72	5.47	0.26	7
64.46	4.73	0.23	8
68.88	4.43	0.21	9
72.85	3.97	0.19	10

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ٤- پراکنش لاین های مورد مطالعه بر اساس دو مولفه اول حاصل از تجزیه به مختصات اصلی.

Figure 4- Distribution of studied sunflower lines based on 2 first components produced from principle coordinate analysis.

نتیجه گیری

علیرغم گزارشات کم در مورد استفاده از نشانگرهای ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی آفتابگردان، این نشانگرها می توانند به نحو مطلوبی برای شناسایی تنوع موجود در نواحی بین ریزماهواره ای در ژنوم آفتابگردان و شناسایی افراد با فاصله ژنتیکی زیاد (گروه های هتروتیک) بکار روند. از میان آغازگرهای ISSR مورد بررسی در این مطالعه، آغازگر UBC ٨٨٠ دارای کارایی بالایی در تمایز لاین های مورد مطالعه بود. گروهبندی لاین های آفتابگردان نشان داد که کلکسیون هسته مورد بررسی در این تحقیق که از طریق نشانگرهای ریزماهواره تشکیل یافته است (Coque *et al*. 2008)، دارای حداکثر تنوع بوده و می تواند به نحو مطلوبی در برنامه های به نژادی آفتابگردان مورد استفاده قرار بگیرد.

سپاسگذاری

از محققین بخش تحقیقات آفتابگردان واقع در مرکز تحقیقات کشاورزی فرانسه (INRA) آقایان دکتر احمد صرافی و دکتر ونکور به خاطر در اختیار قرار دادن لاین ها تشکر می گردد. از دانشگاه مراغه به خاطر همکاری صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل می آید.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

Ahmadi Avin F (2007). Genetic diversity of advance inbred lines of sunflower by using morphological traits. Master of Science Thesis, Islamic Azad University of Karaj.

Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1992). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome 36: 181–186.

Beckmann JS, Soller M (1983). Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theoretical Applied Genetics 67: 35–43.

Coque M, Mesnildrey S, Romestant M, Grezes-Besset B , Vear F, Langlade N, Vincourt P. (2008). Sunflower line core collections for association studies and phenomics. Proceeding of 17th International Sunflower Conference, Cordoba, Spain, 725-728.

Darvishzadeh R, Pirzad A, Hatami Maleki H, Poormohammad Kiani S, Sarrafi A (2010). Evaluation of the reaction of sunflower inbred lines and their F1 hybrids to drought conditions using various stress tolerance indices. Spanish Journal of Agricultural Research 8: 1037–1046.

Doyle J, Doyle J, (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bulletin 19: 11–15.

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

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology 14: 2611–2620.

Fick GN, Zimmer DE (1974). Parental lines for production of confection sunflower hybrids. North Dakota Farm Research 31:15–16.

Garayalde AF, Poverene M, Cantamutto M, Carrera AD (2011). Wild sunflower diversity in Argentina revealed by ISSR and SSR markers: an approach for conservation and breeding programmes. Annals of Applied Biology 158: 305–317.

Mohsenzadeh Golfezani M, Samizadeh Lahiji H, Alami A, Shoadeilami M, Talesh Sasani S (2012). Genetic diversity of several flue cured tobacco genotypes using ISSR and Retro-transposon markers. Iranian Journal of Field Crop Science 43: 371-380.

Muller ME, Delieux F, Fernandez Martınez JM, Garric B, Lecomte V, Anglade G, Leflon M, Motard C, 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.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 2 945–959.

Rohlf FJ (1998). NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version2.02. Exter Software, Setauket, New York.

Sabzalian MR, Mirlohi AF, Saeidi G, Rabbani MT (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.

Saffari M (2006). Effects of planting date on seed yield, and yield components of six sunflower cultivars in Kerman. Pajouhesh and Sazandegi 73: 139-144.

Tagizad A, Ahmadi J, Haddad R, Zarrabi M (2011). Genetic diversity of Iranian *Pistacia* using some ISSR markers. Journal of Horticultural Science 25: 453-460.

Terzopoulos PJ, Kolano B, Bebeli PJ, Metzidakis I (2005.) Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. Scientia Horticulturae 105: 45 – 51.

Archive of SID

www.SID.ir

Wangsomnuk PP, Khampa S, Jogloy S, Srivong T, Patanothai A, Fu YB (2011). Assessing Genetic Structure and Relatedness of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) Germplasm with RAPD, ISSR and SRAP Markers. American Journal of Plant Sciences 2: 753-764.

Yang J, Tang L, Guan YL, Sun WB (2012). Genetic diversity of an alien invasive plant Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) in China. Weed Science 60: 552–557.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of genetic diversity and classification of advanced sunflower lines using ISSR markers

Hatami Maleki H.[1*], Darvishzadeh R.[2, 3], Mohseni Z.[4]

[1]Asistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
[3]Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.
[4]M. Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

Sunflower is one of the most important oilseed crops. Evaluation of genetic diversity and grouping of genotypes and lines are computed as important agents for plant breeding programms. In this study, the genetic diversity and classification of some advanced inbred lines of sunflower developed during different breeding programs were studied using ISSR markers. Among 21 primers, 15 ISSR primers were selected for their reproducibility. A total of 70 bands were produced through ISSR primers which 27 and 43 bands out of them were monomorphic and polymorphic, respectively. Results revealed that primer UBC 807 (0.4) had the highest polymorphism information content value and primer UBC 804 (0.15) had the lowest value. Using Dice similarity coefficient the lowest amount of genetic similarity (0.65) was observed between breeding lines SF25 with SF278 and the highest ones (0.93) was observed between lines HA336 and SF315. Cluster analysis using UPGMA algorithm was divided the studied lines into 8 separate groups. Regarding to principal coordinates analysis; each component accounts a small percentage of the total variation which emphasis on good genomic distribution of selected ISSR primers.

Keywords: ISSR marker, polymorphism information content, cluster analysis, principal coordinate analysis.

Archive of SID

www.SID.ir