



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

نشانه‌های ISSR

حمید حاتمی ملکی^{۱*}، رضا درویش زاده^۲، زینب محسنی^۳

^۱ استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه.

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

^۳ 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 گروه بندی تعدادی از لاین های پیشرفته اصلاحی آفتابگردان حاصل از برنامه های اصلاحی مختلف، با استفاده از نشانه‌های ISSR انجام شد. تعداد ۱۵ آغازگر ISSR از میان ۲۱ آغازگر با تکثیر مناسب در واکنش زنجیره ای پلی مرز 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 ۴۳ نوار چندشکل بودند. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار محتوای اطلاعات چندشکل مربوط به آغازگر ۸۰۷ UBC (۰/۴) و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر ۸۰۴ UBC (۰/۱۵) می باشد. با استفاده از ضریب شباهت دایس، کمترین شباهت (۰/۶۵) 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: نشانه‌های ISSR، محتوای اطلاعات چندشکلی، تجزیه خوشه ای، تجزیه به مختصات اصلی.

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 ۶ 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 $2n=2x=34$ 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

آفتابگردان گیاهی یکساله، دگرگرده افشان، دیپلوئید ($2n=2x=34$) و بومی آمریکای شمالی می باشد (Dry & Burdon, 1986; Muller *et al.*, 2009). این گیاه با داشتن مقادیر بالای روغن در دانه (۵۰-۴۰٪)، از اهمیت ویژه ای در تغذیه جوامع انسانی برخوردار بوده و در سطح وسیعی کشت می گردد (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 می گیرد (Saffari, 2006). ارقام هیبرید آفتابگردان برای اولین بار در اوایل دهه هفتاد میلادی از طریق تلاقی لاین های نرعقیم سیتوپلاسمی و لاین های برگرداننده باروری معرفی شدند که نقطه عطفی در اصلاح آفتابگردان به شمار می رود (Fick & Zimmer, 1974). ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه بندی افراد به عنوان یکی از ارکان اصلی به نژادی گیاهی، می تواند بر پایه نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی DNA صورت گیرد. در این میان، نشانگرهای مولکولی DNA به دلیل عدم تأثیر پذیری از شرایط محیطی، وراثت پذیری و فراوانی بالا از ابزارهای مؤثر برای دستیابی به درک بهتر تنوع ژرم پلاسم می باشند (Beckmann & Soller, 1983). یکی از انواع نشانگرهای DNA نشانگر ISSR می باشد که توسط Zietkiewicz *et al.* (1994) معرفی گردیده است. در مطالعه ای Garayalde *et al.* (2011)، تنوع ژنتیکی ۱۰ توده وحشی به همراه ۶ لاین

کلرید منیزیم ۵۰ mM، ۰/۳ μl آنزیم DNA پلیمرز (۵U)، ۱۱/۲ μl آب دوبار تقطیر، ۱ μl آغازگر ISSR با غلظت ۱۰ μM و ۵ μl DNA با غلظت ۵ ng/μl انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل واسرشته سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۴ چرخه شامل واسرشته سازی به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال آغازگر به مدت ۱ دقیقه در دمای مناسب اتصال برای هر آغازگر (جدول ۱)، مرحله توسعه رشته جدید به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت توسعه نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. محصولات PCR در ژل آگارز ۲٪ 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 (Polymorphic Information Content) PIC براساس فرمول زیر محاسبه شد (Anderson *et al.*, 1992).

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

در این رابطه، P_i فراوانی ال i ام و n تعداد ال 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

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 DNA 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 DNA ژنومی از گیاهچه های ۱۰ تا ۱۵ 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 ۰/۸٪ تعیین گردید. به منظور انگشت نگاری مواد گیاهی مورد مطالعه از ۲۱ نشانگر ISSR طراحی شده در دانشگاه بریتیش کلمبیا (University of British Columbia; UBC) استفاده شد. برای شناسایی دمای اتصال بهینه برای آغازگرهای مورد بررسی از PCR گرادینت استفاده گردید. واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) در حجم نهایی ۲۵ μl شامل ۲/۵ μl بافر ۱۰x، ۴ μl dNTP با غلظت ۲۵ mM، ۱ μl

کوفتتیک استفاده شد. محاسبه ضرایب تشابه، گروه بندی لاین ها و ضریب همبستگی کوفتتیک 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.

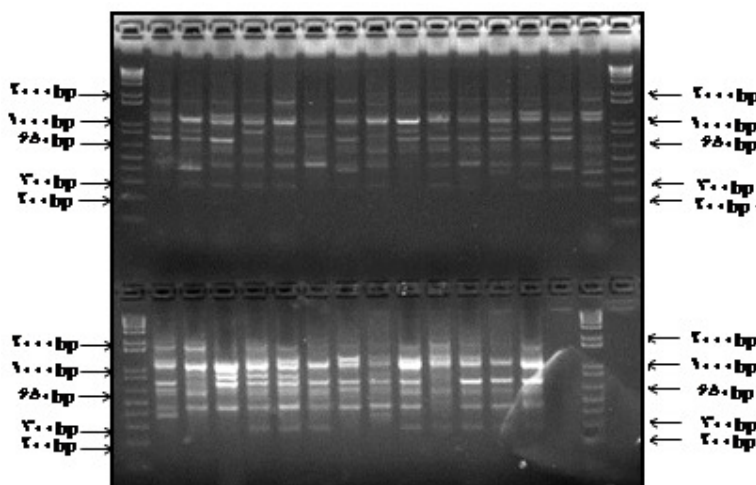
محتوی اطلاعات چندشکلی Polymorphism information content	درصد چندشکلی Percent of polymorphism	تعداد نوار چندشکل Number of polymorph bands	تعداد نوار تکثیر شده Number of amplified bands	دمای اتصال (°C) Annealing temperature	آغازگر Primer
0.26	0.57	4	7	48	UBC810
0.33	0.83	5	6	48	UBC880
0.35	0.75	3	4	51	UBC808
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

نتایج و بحث

چندشکلی نشانگرهای ISSR

از ۲۱ آغازگر ISSR مورد مطالعه ۱۵ آغازگر چندشکلی نشان دادند (جدول ۱). شش آغازگر دیگر، یا اصلاً محصولی تولید نکردند و یا اینکه الگوی بانندی واضحی نداشتند. پانزده آغازگر ISSR در مجموع تعداد ۷۰ نوار تکثیر نمودند که از بین آنها تعداد ۲۷ نوار در بین تمام لاین‌ها یک شکل و ۴۳ نوار چندشکلی نشان دادند (جدول ۱). در شکل ۱ الگوی نواریندی محصولات تکثیری ۲۹ لاین با آغازگر UBC ۸۱۰

نشان داده شده است. بیشترین تعداد نوار چندشکل (پنج عدد) مربوط به آغازگر UBC ۸۸۰ و کمترین تعداد نوار چندشکل (یک عدد) مربوط به آغازگرهای UBC ۸۵۴ و UBC ۸۸۷ 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 ۸ تا ۱۶ متغیر بود (Garayalde *et al.*, 2011).



شکل ۱- الگوی نواری حاصل از تکثیر DNA ی ۲۹ لاین آفتابگردان با استفاده از آغازگر UBC ۸۱۰.
Figure 1- Banding pattern produced by primer UBC 810 in 29 sunflower lines.

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

نتایج این تحقیق نشان داد که متوسط درصد چندشکلی ۵۹٪ (به طور متوسط ۴/۶ نوار به ازای هر آغازگر). می‌باشد (جدول ۱). درصد چندشکلی نسبتاً بالا در مطالعه حاضر نیز بیانگر وجود تنوع ژنتیکی در بین لاین ها و قابلیت

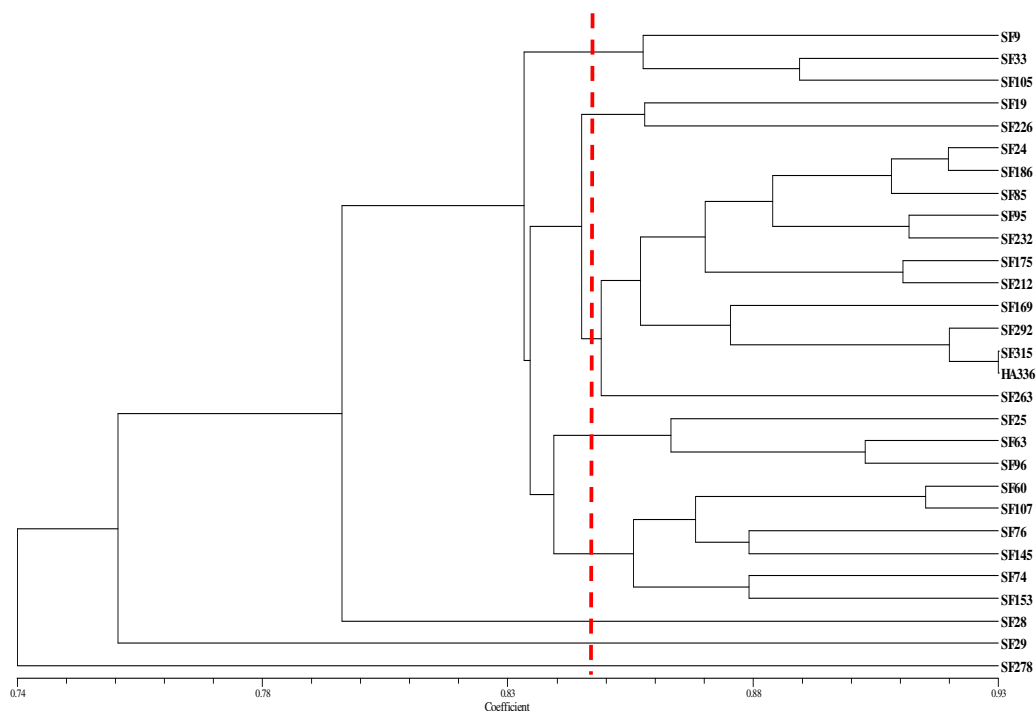
بیشترین شباهت (۰/۹۳) بین دو لاین HA336 و SF315 مشاهده شد. گروه بندی لاین‌های مورد مطالعه با استفاده از الگوریتم UPGMA در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به تغییرات مقدار ΔK به ازای تعداد مختلف گروه‌ها (K) (شکل ۳) در نرم افزار STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) جمعیت لاین‌های پیشرفته مورد مطالعه می‌توانند در سه یا هشت گروه قرار بگیرند. با توجه به حداکثر بودن مقدار پیک نمودار در $K=8$ ، تعداد ۸ گروه مطلوب می‌باشد (Evanno *et al.*, 2005). این در حالی است که وجود تنوع ژنتیکی فراوان در کلکسیون هسته آفتابگردان که لاین‌های مذکور از آن انتخاب شده‌اند، در مطالعات قبلی توسط Coque *et al.* (2008) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره به اثبات رسیده است. در یک بررسی، Garayalde *et al.* (2012) تنوع ژنتیکی موجود در ۱۰ توده وحشی آفتابگردان را به همراه ۶ لاین اصلاحی با استفاده از ۱۰ نشانگر ISSR و ۱۴ نشانگر SSR ارزیابی نمودند. آنها نشان دادند که تنوع ژنتیکی موجود در توده‌های وحشی ۶۰ درصد بیشتر از تنوع ژنتیکی موجود در لاین‌های اصلاحی بوده و از طرفی برخلاف توده‌های وحشی، الل یا نوار اختصاصی SSR یا ISSR در لاین‌های مورد مطالعه وجود ندارد (Garayalde *et al.*, 2011). در مطالعه دیگری، با استفاده از صفات زراعی و مورفولوژیک، تنوع بالایی را در یک ژرم پلاسما آفتابگردان شامل ۴۹ لاین اصلاحی گزارش شد و لاین‌های مورد مطالعه با استفاده از تجزیه خوشه

(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 (۰/۴) و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر UBC ۸۰۴ (۰/۱۵) بود. با توجه به میزان می‌توان بیان نمود که از بین آغازگرهای مورد بررسی، آغازگر UBC ۸۰۷ مناسبترین آغازگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی لاین‌های 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 ۰/۶۲ با میانگین ۰/۴۱ بود.

گروه بندی لاین‌های آفتابگردان

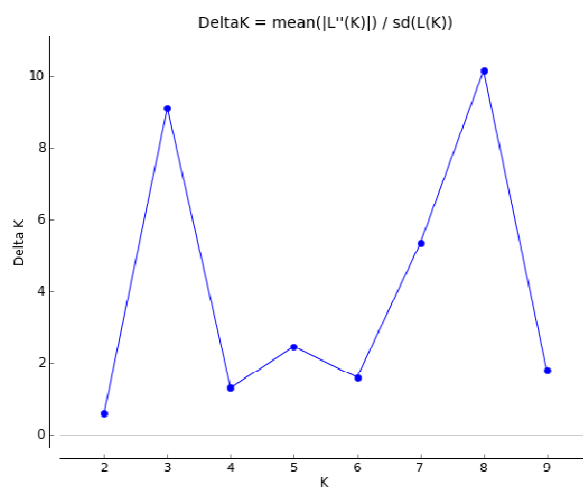
گروه بندی لاین‌های اصلاحی پیش نیاز برنامه‌های دورگ‌گیری است. شباهت ژنتیکی لاین‌های آفتابگردان با سه ضریب تشابه تطابق ساده، جاکارد و دایس، محاسبه گردید و سپس گروه بندی لاین‌ها با استفاده از الگوریتم‌های UPGMA و WARD انجام گرفت. بر اساس ضریب همبستگی کوفنتیک ($r=0/81$) مناسبترین روش از بین روش‌های برای گروه‌بندی لاین‌های مورد مطالعه، گروه‌بندی بر اساس ضریب تشابه دایس با الگوریتم UPGMA بود (شکل ۲). کمترین شباهت (۰/۶۵) که بیانگر بیشترین واگرایی است بین لاین‌های SF25 با SF278 و

ای در دو گروه نرعیتم و نر بارور گروه بندی شدند (Ahmadi Avin, 2007).



شکل ۲- 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.

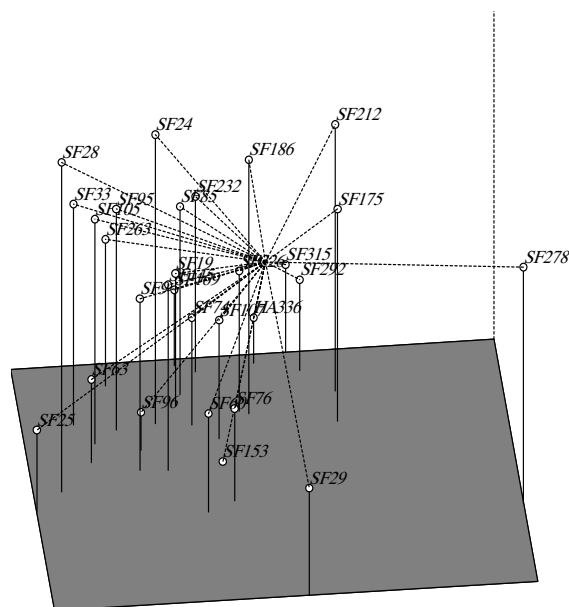
ژنومی مناسب نشانگرهای ISSR انتخاب شده می باشد. در این مطالعه، گروه بندی لاین ها با استفاده از دو مولفه اول تا حدودی با نتایج تجزیه خوشه ای در توافق بود (شکل ۴). تطابق بین گروه بندی حاصل از تجزیه خوشه ای با تجزیه Sabzalian *et al.* (2009) در زعفران نیز گزارش شده است.

تجزیه به مختصات اصلی جهت کاهش حجم داده ها و تجزیه و تحلیل بهتر نتایج صورت گرفت (جدول ۲). با توجه به نتایج تجزیه به مختصات اصلی، دو مولفه اول ۲۳/۱۴٪ 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

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.

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



شکل ۴- 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 هترووتیک) بکار روند. از میان آغازگرهای ISSR مورد بررسی در این مطالعه، آغازگر UBC ۸۸۰ دارای کارایی بالایی در تمایز لاین های مورد مطالعه بود. گروه بندی لاین های آفتابگردان نشان داد که کلکسیون هسته مورد بررسی در این تحقیق که از طریق نشانگرهای ریزماهواره تشکیل یافته است

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 هترووتیک) بکار روند. از میان آغازگرهای ISSR مورد بررسی در این مطالعه، آغازگر UBC ۸۸۰ دارای کارایی بالایی در تمایز لاین های مورد مطالعه بود. گروه بندی لاین های آفتابگردان نشان داد که کلکسیون هسته مورد بررسی در این تحقیق که از طریق نشانگرهای ریزماهواره تشکیل یافته است

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.

- 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, Pirezad 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 Martinez 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.

- 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.

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

Hatami Maleki H.^{1*}, Darvishzadeh R.^{2,3}, Mohseni Z.⁴

¹Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

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

³Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.

⁴M. 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 programs. 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.