

ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های آزیلوپس واجد ژنوم D با استفاده از

نشانگرهای SCoT و TRAP

Evaluation of genetic diversity in *Aegilops* populations possessing D genome using SCoT and TRAP markers

جعفر احمدی^{۱*}، صدیقه فابریکی اورنگ^۱، علیرضا پورابوقداره^۲

۱- استاد، دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۲- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

Ahmadi J^{*1}, Fabriki-Ourang S¹, Pour-Aboughadareh A²

1. Professor, Associate Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

2. Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: j.ahmadi@eng.ikiu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۵/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۲۷)

چکیده

اهداف اصلی این مطالعه ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در ۵۳ توده آزیلوپس متعلق به سه گونه *Aegilops tauschii*، *Ae. cylindrica* و *Ae. crassa* و همچنین مقایسه کارایی دو نشانگر مولکولی (TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) و SCoT (Start codon targeted) بود. در مجموع ۱۵ آغازگر SCoT و شش جفت آغازگر TRAP به ترتیب ۱۶۵ و ۲۰۱ قطعه چند شکل تکثیر کردند. متوسط شاخص‌های تعداد قطعات چندشکل تکثیری، شاخص نشانگری و قدرت تمایز آغازگر برای آغازگرهای TRAP بیشتر از SCoT بود. با این حال متوسط شاخص محتوای اطلاعات چندشکل در آغازگرهای SCoT بیشتر از TRAP بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) انجام شده بر اساس هر یک از سیستم‌های نشانگری متفاوت از هم بود به طوری که بر اساس داده‌های SCoT بیشترین سهم تنوع ژنتیکی مربوط به تنوع درون گونه‌ای بود و بر عکس داده‌های TRAP بیشترین میزان تنوع ژنتیکی را در بین گونه‌ها نشان دادند. آغازگرهای SCoT نسبت به TRAP مقادیر بالاتری برای کلیه پارامترهای ژنتیکی نشان دادند و بر اساس آغازگرهای SCoT و TRAP بیشترین مقادیر پارامترهای ژنتیکی به ترتیب در گونه *Ae. tauschii* و *Ae. cylindrica* مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس هر یک از سیستم‌های نشانگری و هم‌چنین ترکیب داده‌های حاصل از هر دو نشانگر کلیه توده‌های مورد بررسی را در سه گروه اصلی تفکیک نمود. الگوی گروه‌بندی به وجود آمده بر اساس آغازگرهای SCoT نسبت به TRAP واضح‌تر بود. از این‌رو استفاده از نشانگرهای SCoT در بررسی ساختار جمعیت و گروه‌بندی توده‌های مختلف و استفاده از نشانگرهای TRAP در اشباع نقشه‌های ژنتیکی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی

آزیلوپس

تجزیه واریانس مولکولی

توالی‌های بیان شونده بر چسب‌دار

نشانگرهای مولکولی هدفمند

یکی از مهم‌ترین پیامدهای منفی استفاده از ارقام اصلاح شده در سیستم‌های کشاورزی مدرن کاهش فرسایش ژنتیکی و ضعیف شدن پایه ژنتیکی بسیاری از ارقام گیاهان زراعی است. در سال‌های اخیر، وقوع تغییرات گسترده اقلیمی سبب بروز دامنه وسیعی از تنش‌های غیرزنده شده که این امر به نوبه خود تولید محصولات کشاورزی را با خطر جدی روبرو می‌کند. از این‌رو، استفاده از ذخایر ژنتیکی گیاهان زراعی می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی مطلوب جهت بهره‌گیری از پتانسیل آل‌های موجود در آن‌ها به اصلاح‌گران نبات در توسعه ارقام جدید و مقاوم به انواعی از تنش‌های محیطی کمک نماید (Warschefsky et al. 2014; Pour-Aboughadareh et al. 2018). با توجه به مطالعات صورت گرفته بر روی خویشاوندان وحشی گونه‌های زراعی، بیشترین مطالعات مربوط به اجداد وحشی گندم می‌باشد (Maxted and Kell 2009).

خویشاوندان وحشی گندم حاوی ژن‌های مفیدی بوده و دارای سازگاری بالایی به تنش‌های حاصل از تغییر شرایط آب و هوایی هستند و نیز منبع ژنتیکی مهمی برای بهبود صفات کمی و کیفی مختلف محسوب می‌شوند (Hajjar and Hodgking 2007). از این‌رو، وجود چنین خویشاوندانی می‌تواند به‌عنوان ژرم پلاسما مفید در برنامه‌های به‌نژادی گندم مورد استفاده اصلاح‌گران قرار گیرد (Hajjar and Hodgking 2007; Schneider et al. 2008; Pour-Aboughadareh et al. 2017b). گونه‌های مختلف دو جنس *Aegilops* و *Triticum* مهم‌ترین خویشاوندان وحشی گندم زراعی را تشکیل می‌دهند که سه گونه *T. urartu*، *Ae. tauschii* و *Ae. speltoides* به ترتیب به‌عنوان گونه‌های بخشنده ژنوم A، B و D معرفی شده‌اند (Dvorak et al. 1993; Kihara 1944; Blake et al. 1999). اگرچه نواحی مختلفی در دنیا به‌عنوان زیستگاه گونه‌های وحشی گندم شناسایی شده‌اند، با این حال این منابع ژرم‌پلاسمی در مناطق جغرافیایی بین ۲۰ و ۴۰ درجه شرقی و ۳۵ و ۴۵ درجه شمالی پراکنده هستند و در بین آن‌ها نواحی غربی ایران واقع در بخش شرقی حوضه هلال حاصلخیز به‌عنوان مرکز اصلی پراکنش خویشاوندان وحشی گندم شناخته شده‌است (Feldman and Sears 1981). بنابراین به‌نظر می‌رسد ارزیابی و توجه به این

منابع ارزشمند طبیعی، مسیر تازه‌ای در بهره‌مندی از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی گندم ایجاد نماید. نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA یکی از مهم‌ترین ابزارهای ژنتیکی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های طبیعی بشمار می‌آیند و گزارش‌های متنوعی از کاربرد انواع نشانگرها در ارزیابی ژرم‌پلاسما گندم در اختیار است (Mousavifard et al. 2015; Etmnan et al. 2016; Hamidi et al. 2014; Moradkhani et al. 2010; Naghavi et al. 2015, 2012). یکی از مهم‌ترین نشانگرهای مورد استفاده در ارزیابی تنوع ژنتیکی¹ TRAP می‌باشد که در سال ۲۰۰۳ برای نخستین بار در گیاه آفتابگردان مورد استفاده قرار گرفت (Hu and Vick 2003). فعالیت این سیستم نشانگری بر اساس توالی‌های بیان شونده برچسب‌دار (EST²) بوده و شامل یک آغازگر ثابت بر مبنای توالی EST و یک آغازگر تصادفی می‌باشد. مشخص شده‌است که آغازگرهای این نشانگر به طور متوسط قادر به تکثیر ۳۰ تا ۵۰ قطعه چندشکل هستند و به همین دلیل TRAPها جزو نشانگرهای دقیق و برخوردار از درجه چندشکلی بالا محسوب می‌شوند. در سال‌های اخیر چندین سیستم نشانگری جدید مبتنی بر ژن نیز توسعه یافته است که نشانگرهای SCOT³ از جمله آن‌ها می‌باشد. این سیستم بر اساس نواحی کوتاه حفاظت شده اطراف رمز آغاز ATG در ژن‌های گیاهی طراحی شده است. در این سیستم نشانگری از یک آغازگر ۱۸ نوکلئوتیدی استفاده می‌شود و آشکارسازی چندشکلی توالی بین رمزهای آغاز (ATG) در ژن‌های گیاهی را ممکن می‌کند. نشانگرهای SCOT از چندشکلی و تکرارپذیری بالایی برخوردار هستند به طوری که در طراحی آغازگرهای این نشانگر به اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی ژنوم نیاز نیست (Collard and Mackill 2009).

اگرچه تاکنون مطالعات فراوانی در رابطه با ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در بین و درون گونه‌های خویشاوندی گندم با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف صورت گرفته است با این حال، در این مطالعه علاوه بر بررسی تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های *Ae. crassa tauschii* و *Ae. cylindrica* کارایی

¹ Target Region Amplification Polymorphism

² Expressed Sequence Tags

³ Start Codon-Targeted polymorphism

سیستم نشانگری TRAP شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، ۵ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت ۵۰ ثانیه در دمای بهینه‌سازی شده برای هر آغازگر مربوطه و توسعه آغازگر (پلیمریزاسیون) به مدت ۷۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت ۵۰ ثانیه در دمای بهینه‌سازی شده برای آغازگر مربوطه و توسعه آغازگر (پلیمریزاسیون) به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. در نهایت واکنش‌ها جهت تکمیل فرآیند پلیمریزاسیون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از انجام واکنش‌های تکثیر، محصولات PCR مربوط به آغازگرهای SCoT با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک و رنگ‌آمیزی ژل‌ها با Safeview انجام و عکس‌برداری از آن‌ها صورت گرفت. همچنین مطالعه و مشاهده محصولات تکثیری مربوط به آغازگرهای TRAP حاصل از PCR در دو ژل آگارز (برای تعیین مقدار بارگذاری محصول) و ژل اکریل‌امید (به منظور افزایش کیفیت وضوح و تفکیک بهتر باندها) صورت گرفت. برای رنگ‌آمیزی ژل‌های پلی‌اکریل‌امید از نیترات نقره استفاده شد. امتیازدهی الگوهای باندها براساس معیار صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) انجام شد و بر اساس آن‌ها مقادیر هر یک از شاخص‌های تعیین‌کننده کارایی سیستم نشانگری مانند تعداد کل قطعات تکثیر شده (NTB^1)، تعداد قطعات چندشکل (NPB^2)، محتوای چندشکلی (PIC^3)، شاخص نشانگری (MI^4) و قدرت تفکیک (Rp^5) برای هر آغازگر محاسبه شد. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) و محاسبه شاخص‌های تنوع ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار GenAEx ver. 6.503 انجام شد (Peakall and Smouse 2012).

نشانگرهای TRAP و SCoT از نظر برآورد پارامترهای ژنتیکی و گروه‌بندی توده‌های ارزیابی شده نیز مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق شامل ۵۳ توده *Aegilops* از گونه‌های *Ae. tauschii*، *Ae. cylindrica* و *Ae. crassa* بود که بذور آن‌ها از بانک ژن غلات دانشگاه ایلام (IUGB) تهیه و مشخصات آن در جدول ۱ ارایه شده‌است. پس از کشت بذرها و تولید گیاهچه، استخراج DNA ژنومی از بافت برگ‌های جوان بر اساس روش CTAB انجام شد (Doyle and Doyle 1987). کیفیت DNA استخراجی با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nanodrop, Thermo Scientific) مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های مختلف از تعداد ۱۵ آغازگر SCoT و شش جفت آغازگر TRAP استفاده شد که تمامی آن‌ها قادر به تولید قطعات چندشکل و قابل امتیازدهی بودند. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۲ ذکر شده‌است.

پس از بهینه‌سازی شرایط تکثیر و تعیین دمای اتصال آغازگرهای SCoT، اجزای واکنش PCR برای سیستم نشانگری SCoT شامل ۱۰ میکرولیتر Master mix (AMPLIQON) (2x)، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، دو میکرولیتر آغازگر SCoT (۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و شش میکرولیتر آب دیونیزه در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. برنامه دمایی PCR در سیستم نشانگری SCoT شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشته‌سازی به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت یک دقیقه در دمای بهینه‌سازی شده برای آغازگر مربوطه و توسعه آغازگر (پلیمریزاسیون) به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. اجزای واکنش PCR برای آغازگرهای TRAP شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (AMPLIQON) (2x)، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۰/۴ میکرومولار آغازگر ثابت (M1, M2, M3) و ۰/۴ میکرومولار آغازگر اختیاری (CAT, MnSOD) و ۹/۵ میکرولیتر آب دیونیزه در حجم واکنش نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. برنامه دمایی PCR

¹ Total amplified bands

² Number of polymorphic bands

³ Polymorphism information content

⁴ Marker index

⁵ Resolving power

جدول ۱- اطلاعات مربوط به ۵۳ توده آزیلوپس متعلق به گونه‌های *Ae. tauschii*، *Ae. cylindrica* و *Ae. crassa* ارزیابی شده در این مطالعه

No.	Code	Species	No.	Code	Species	No.	Code	Species
1	IUGB-00149	<i>Ae. crassa</i>	19	IUGB-00168	<i>Ae. cylindrica</i>	37	IUGB-00164	<i>Ae. tauschii</i>
2	IUGB-00170	<i>Ae. crassa</i>	20	IUGB-00172	<i>Ae. cylindrica</i>	38	IUGB-00193	<i>Ae. tauschii</i>
3	IUGB-00280	<i>Ae. crassa</i>	21	IUGB-00185	<i>Ae. cylindrica</i>	39	IUGB-00196	<i>Ae. tauschii</i>
4	IUGB-00284	<i>Ae. crassa</i>	22	IUGB-00188	<i>Ae. cylindrica</i>	40	IUGB-00198	<i>Ae. tauschii</i>
5	IUGB-00319	<i>Ae. crassa</i>	23	IUGB-00189	<i>Ae. cylindrica</i>	41	IUGB-00222	<i>Ae. tauschii</i>
6	IUGB-00334	<i>Ae. crassa</i>	24	IUGB-00200	<i>Ae. cylindrica</i>	42	IUGB-00223	<i>Ae. tauschii</i>
7	IUGB-00379	<i>Ae. crassa</i>	25	IUGB-00210	<i>Ae. cylindrica</i>	43	IUGB-00224	<i>Ae. tauschii</i>
8	IUGB-00408	<i>Ae. crassa</i>	26	IUGB-00221	<i>Ae. cylindrica</i>	44	IUGB-00245	<i>Ae. tauschii</i>
9	IUGB-00817	<i>Ae. crassa</i>	27	IUGB-00236	<i>Ae. cylindrica</i>	45	IUGB-00247	<i>Ae. tauschii</i>
10	IUGB-00830	<i>Ae. crassa</i>	28	IUGB-00267	<i>Ae. cylindrica</i>	46	IUGB-00260	<i>Ae. tauschii</i>
11	IUGB-00881	<i>Ae. crassa</i>	29	IUGB-00359	<i>Ae. cylindrica</i>	47	IUGB-00261	<i>Ae. tauschii</i>
12	IUGB-01267	<i>Ae. crassa</i>	30	IUGB-00373	<i>Ae. cylindrica</i>	48	IUGB-00275	<i>Ae. tauschii</i>
13	IUGB-01564	<i>Ae. crassa</i>	31	IUGB-00403	<i>Ae. cylindrica</i>	49	IUGB-00325	<i>Ae. tauschii</i>
14	IUGB-01582	<i>Ae. crassa</i>	32	IUGB-00097	<i>Ae. cylindrica</i>	50	IUGB-00365	<i>Ae. tauschii</i>
15	IUGB-00189	<i>Ae. cylindrica</i>	33	IUGB-01747	<i>Ae. cylindrica</i>	51	IUGB-00366	<i>Ae. tauschii</i>
16	IUGB-00034	<i>Ae. cylindrica</i>	34	IUGB-00269	<i>Ae. tauschii</i>	52	IUGB-00369	<i>Ae. tauschii</i>
17	IUGB-00150	<i>Ae. cylindrica</i>	35	IUGB-00020	<i>Ae. tauschii</i>	53	IUGB-00402	<i>Ae. tauschii</i>
18	IUGB-00156	<i>Ae. cylindrica</i>	36	IUGB-00107	<i>Ae. tauschii</i>			

IUGB: Ilam university genbank

نتایج و بحث

مقادیر فواصل ژنتیکی بین جفت نمونه‌ها بر اساس ضریب فاصله جاکارد محاسبه و به منظور گروه‌بندی نمونه‌ها، تجزیه خوشه‌ای به روش Neighbor-joining با استفاده از نرم‌افزار DARwin صورت گرفت (Perrier et al. 2003).

TRAP، هر یک از شاخص‌های فوق برای آغازگرهای استفاده شده محاسبه شد و نتایج آن در جدول ۲ نشان داده شده است. دو سیستم نشانگری مورد استفاده در مجموع ۳۶۷ قطعه تکثیر و از بین آن‌ها ۳۶۶ قطعه چندشکل بودند. از مجموع ۱۶۶ قطعه تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای SCoT تنها یک قطعه فاقد چندشکلی بوده و تعداد قطعات چندشکل بین ۸ (SCoT-1) و SCoT-2) تا ۱۳ (SCoT-6 و SCoT-9) با میانگین ۱۱ متغیر بود. شاخص PIC با متوسط ۰/۴۷ بین ۰/۴۵ تا ۰/۴۹ متغیر بود که این نتیجه بیانگر قابلیت آغازگرهای مورد استفاده در ارائه سطح چندشکلی در نمونه‌های ارزیابی شده می‌باشد. شاخص MI بین ۳/۷۷ و ۶/۴۳ با میانگین ۵/۲۴ متغیر بود به طوری که کمترین و بیشترین میزان این شاخص به ترتیب برای آغازگرهای SCoT-3 و SCoT-9 تخمین زده شد. با بررسی مقادیر Rp مشاهده شد آغازگرهای SCoT استفاده شده در این بررسی دارای قدرت تمایز متفاوتی می‌باشد و کمترین و بیشترین قدرت تمایز آغازگری به ترتیب مربوط به آغازگرهای SCoT-3 (۶/۱۱) و SCoT-9 (۱۱/۶۶) بود.

یکی از مهم‌ترین اقدامات اولیه در شناسایی نشانگرهای مفید و کارآمد جهت استفاده از آن‌ها در ارزیابی تنوع ژنتیکی و بررسی روابط فیلولوژنیک و همچنین تعیین ساختار جمعیت، بررسی میزان کارایی آغازگرهای آن‌ها در ارائه سطح چندشکلی موجود در نمونه‌های مورد بررسی است. در دو دهه اخیر چندین شاخص مبتنی بر داده‌های مولکولی مانند محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، قدرت تفکیک (Rp)، شاخص نشانگر (MI)، تعداد کل قطعات تکثیری (NTB) و تعداد قطعات تکثیری چند شکل (NPB) معرفی شده است (Anderson et al. 1993; Powell et al. 2009; Altintas et al. 2008; Kumar et al. 1996). در این مطالعه جهت بررسی و مقایسه دو سیستم نشانگری SCoT و

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای SCoT و TRAP به همراه شاخص‌های آگاهی بخش محاسبه شده آنها

آغازگر	توالی آغازگر	TAB	NPB	PIC	MI	Rp
SCoT-1	CAACAATGGCTACCACCC	۸	۸	۰/۴۸	۳/۸۹	۶/۷۱
SCoT-2	CAACAATGGCTACCACCG	۱۰	۱۰	۰/۴۸	۴/۸۲	۸/۱۵
SCoT-3	CAACAATGGCTACCACGA	۸	۸	۰/۴۷	۳/۷۷	۶/۱۱
SCoT-4	CAACAATGGCTACCACGC	۱۱	۱۱	۰/۴۶	۵/۱۵	۸/۲۶
SCoT-5	CAACAATGGCTACCACGC	۱۲	۱۲	۰/۴۷	۵/۶۶	۹/۱۶
SCoT-6	ACGACATGGCGACCAACG	۱۳	۱۳	۰/۴۷	۶/۱۹	۱۰/۱۸
SCoT-7	ACGACATGGCGACCATCG	۱۱	۱۱	۰/۴۹	۵/۴۱	۹/۶۲
SCoT-8	ACGACATGGCGACCACGC	۱۱	۱۱	۰/۴۹	۵/۴۰	۹/۵۴
SCoT-9	ACGACGTGGCGACCGCGA	۱۳	۱۳	۰/۴۹	۶/۴۳	۱۱/۶۶
SCoT-10	CCATGGCTACCACCGGCC	۱۲	۱۲	۰/۴۸	۵/۸۰	۹/۸۴
SCoT-11	CATGGCTACCACCGGCC	۱۱	۱۱	۰/۴۵	۴/۹۶	۷/۵۸
SCoT-12	ACCATGGCTACCACCGCC	۱۱	۱۱	۰/۴۶	۵/۰۴	۷/۸۴
SCoT-13	GCAACAATGGCTACCACC	۱۳	۱۲	۰/۴۶	۵/۷۵	۹/۵۸
SCoT-24	AACCATGGCTACCAACGC	۱۲	۱۲	۰/۴۷	۵/۷۵	۹/۵۸
SCoT-15	CACCATGGCTACCACCAT	۱۰	۱۰	۰/۴۷	۴/۷۵	۷/۷۷
میانگین		۱۱/۰۷	۱۱	۰/۴۷	۵/۲۴	۸/۷۷
TRAP-1	M1 GACTGCGTACGAATTCAC CAT TGTACTACTCGGACGACAAG	۳۰	۳۰	۰/۴۲	۱۲/۸۶	۱۸/۶۷
TRAP-2	M1 GACTGCGTACGAATTCAC SOD CAGAGGGTGCTGCTTTACAA	۳۷	۳۷	۰/۴۴	۱۶/۳۹	۲۴/۵۲
TRAP-3	M2 GACTGCGTACGAATTGAC CAT TGTACTACTCGGACGACAAG	۲۶	۲۶	۰/۴۶	۱۱/۹۲	۱۸/۵۲
TRAP-4	M2 GACTGCGTACGAATTGAC SOD CAGAGGGTGCTGCTTTACAA	۵۳	۵۳	۰/۴۴	۱۱/۹۲	۱۸/۵۲
TRAP-5	M3 GACTGCGTACGCACGCGAC CAT TGTACTACTCGGACGACAAG	۲۹	۲۹	۰/۴۳	۱۲/۶۶	۱۸/۶۷
TRAP-6	M3 GACTGCGTACGCACGCGAC SOD CAGAGGGTGCTGCTTTACAA	۲۶	۲۶	۰/۴۵	۱۱/۹۰	۱۸/۴۵
میانگین		۳۳/۵۰	۳۳/۵۰	۰/۴۴	۱۲/۹۴	۱۹/۵۶

TAB, NPB, PIC, MI و Rp: به ترتیب بیانگر تعداد کل قطعات تکثیری، تعداد قطعات تکثیری چندشکل، محتوای چندشکلی، شاخص نشانگری و قدرت تفکیک می‌باشند

نمودند و همچنین مقادیر بالاتری از شاخص‌های MI و Rp نشان دادند با این حال، میانگین شاخص PIC در آغازگرهای SCoT بالاتر بود. در واقع این نتیجه می‌تواند به مکانسیم عمل نشانگر SCoT برگردد زیرا این نشانگر مبتنی بر نواحی حفاظت شده‌ای از ژنوم در ناحیه کدون آغاز بوده و تنها چند شکلی موجود در این ناحیه را نشان می‌دهد. از این رو پایین بودن قطعات چندشکل و مقادیر پایین هر یک از شاخص‌های MI و Rp نیز در این سیستم دور از انتظار نیست. پیش از این در بسیاری از مطالعات برتری نشانگر SCoT از نظر ارائه سطوح قابل توجهی از میزان چندشکلی نسبت به سایر نشانگرهای مولکولی گزارش شده است

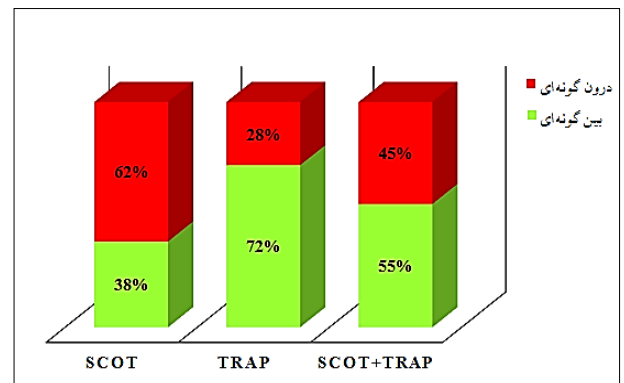
آغازگرهای TRAP استفاده شده در این مطالعه در مجموع ۲۰۱ قطعه چندشکل با دامنه تغییراتی بین ۳۰ (TRAP-1) و ۵۳ (TRAP-4) تکثیر نمودند. شاخص PIC دارای میانگین ۰/۴۴ بود و کمترین و بیشترین مقدار به ترتیب برای آغازگرهای TRAP-1 (۰/۴۲) و TRAP-3 (۰/۴۶) محاسبه شد. شاخص Rp با میانگین ۱۹/۵۶ دارای دامنه تغییراتی بین ۱۸/۵۲ (TRAP-3 و TRAP-4) و ۲۴/۵۲ (TRAP-2) بود. شاخص MI نیز دارای میانگین ۱۲/۹۴ بود و دو آغازگر TRAP-2 و TRAP-6 به ترتیب کمترین (۱۱/۹۰) و بیشترین (۱۶/۳۹) میزان MI را نشان دادند. اگرچه آغازگرهای TRAP نسبت به SCoT تعداد قطعات چندشکل بیشتری تکثیر

قطعات چندشکل باشد. زیرا همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود هر یک از جفت آغازگرهای TRAP استفاده شده در این سیستم تعداد قطعات تکثیری بسیار بیشتری نسبت به آغازگرهای SCoT تولید کردند. از این رو یکی از دلایل احتمالی در مشاهده چنین نتیجه‌ای به پروفایل بانندی ایجاد شده توسط آغازگرهای TRAP برمی‌گردد. با این حال نتایج به دست آمده در زمینه بالا بودن سهم واریانس بین گونه‌ای نسبت به درون گونه‌ای با نتایج برخی از محققان متفاوت بود (ZeinalzadehTabrizi et al. 2015; Fabriki-Ourang and Yousefi-Azarkhanian 2018).

مقادیر میانگین هر یک از شاخص‌های ژنتیکی همچون تعداد آلل‌های مشاهده شده (N_a)، تعداد آلل‌های مؤثر (N_e)، شاخص شانون (I') و تنوع ژنی نی (H_e)، بر اساس الگوی قطعات به دست آمده از هر یک سیستم‌های نشانگری محاسبه و در جدول ۳ نشان داده شده‌است. همانگونه که ملاحظه می‌شود میانگین کلیه پارامترهای ژنتیکی برآورد شده بر اساس آغازگرهای SCoT نسبت به TRAP بیشتر است. علاوه بر این از نقطه نظر تنوع بین گونه‌ای، بر اساس داده‌های SCoT گونه *Ae. cylindrica* به دو گونه دیگر دارای مقادیر بالاتری از نظر تمامی شاخص‌های ژنتیکی بود ولی در مقابل بر اساس آغازگرهای TRAP گونه *Ae. tauschii* از نظر تمامی پارامترها بالاتری داشت. اگرچه هر دو سیستم نشانگری نتایج متفاوتی ارائه دادند، با این حال در بسیاری از مطالعات دو گونه فوق به عنوان متنوع‌ترین منابع ژرم‌پلاسمی گندم شناسایی شده و از نظر دارار بودن انواعی از ژن‌های دارای اهمیت برای استفاده در اصلاح گندم به‌عنوان مهم‌ترین منابع تنوع در برنامه‌های اصلاحی شناسایی شده‌اند (Arabbeigi et al. 2014; Hairat and Khurana 2015; Kiani et al. 2015; Saisho et al. 2016; Pour-Aboughadareh et al. 2018; Ahmadi et al. 2017a).

(Etmninan et al. 2016; Tiwari et al. 2016; Etmninan et al. 2019; Qaderi et al. 2018).

بر اساس تجزیه واریانس ملکولی تنوع ژنتیکی مشاهده شده در گونه‌های مورد ارزیابی به دو بخش تنوع بین و درون گونه‌ای تفکیک شد که نتایج آن در شکل ۱ نشان داده شده‌است. بر اساس آغازگرهای SCoT میزان تنوع درون گونه‌ای نسبت به بین گونه‌ای بیشتر بود (۶۲ در مقابل ۳۸ درصد). در مقابل نتایج به دست آمده از آغازگرهای TRAP و مجموع داده‌های ادغام شده هر دو سیستم نشانگری متفاوت از حالت قبل بود به طوری که میزان تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای (TRAP = ۷۲٪ و Pooled data = ۵۵٪) بیشتر از تنوع درون گونه‌ای (TRAP = ۲۸٪ و Pooled data = ۴۵٪) بود.



شکل ۱- برآورد نسبت واریانس‌های ژنتیکی بین و درون گونه‌ای در گونه‌های مختلف *Aegilops* بر اساس نشانگرهای SCoT، TRAP و SCoT + TRAP

بالا بودن واریانس درون گونه‌ای مشاهده شده با استفاده از آغازگرهای SCoT می‌تواند ناشی از وجود تنوع ژنتیکی بالا در هر یک از گونه‌های آزیلوپس مطالعه شده باشد زیرا خواستگاه هر یک از نمونه‌های مورد بررسی مربوط به نواحی جغرافیایی متفاوتی بوده و با توجه به سازگاری که آن‌ها به شرایط رویشگاه خود داشته‌اند ممکن است از نظر محتوی ژنتیکی متفاوت از هم باشند که این تفاوت خود می‌تواند سبب بروز سطح بالایی از چندشکلی درون گونه‌ای شود. از طرف دیگر بالا بودن واریانس بین گونه‌ای مشاهده شده توسط آغازگرهای TRAP ممکن است به ماهیت این سیستم نشانگری بواسطه استفاده از ترکیب آغازگرهای تصادفی و ثابت و همچنین تولید تعداد زیادی از

¹ The observed number of alleles

² Effective number of alleles

³ Shannon's information index

⁴ Nei's gene diversity

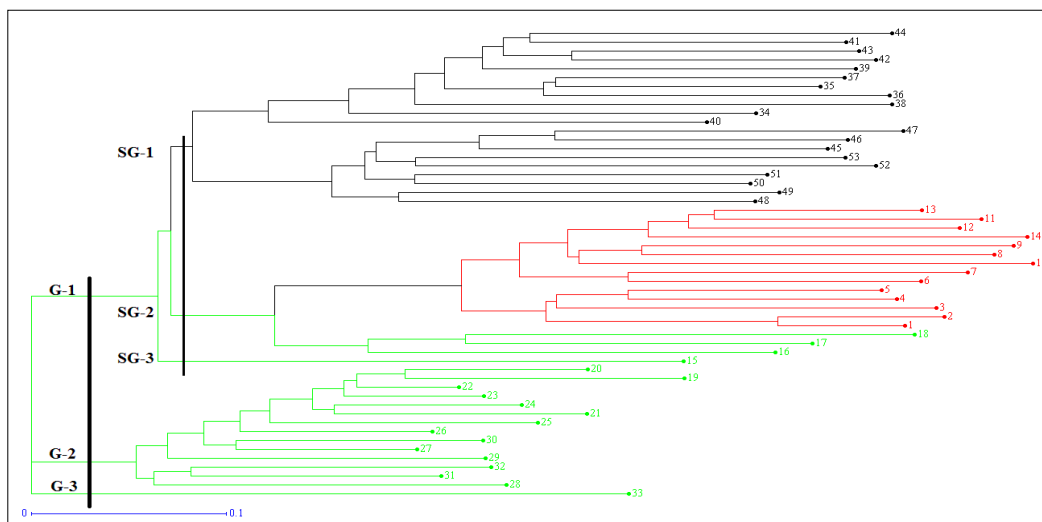
جدول ۳- مقادیر پارامترهای ژنتیکی برآورده شده در هر یک از گونه‌های *Aegilops*

نشانگر	گونه	Na	Ne	I	He	PPL %
SCoT	<i>Ae. crassa</i>	۱/۴۲	۱/۳۸	۰/۳۴	۰/۲۲	۶۸/۶۷
	<i>Ae. cylindrica</i>	۱/۶۰	۱/۴۴	۰/۳۹	۰/۲۶	۷۷/۷۱
	<i>Ae. tauschii</i>	۱/۵۱	۱/۳۸	۰/۳۵	۰/۲۳	۷۲/۲۹
	میانگین	۱/۵۱	۱/۴۰	۰/۳۶	۰/۲۴	۷۲/۸۹
TRAP	<i>Ae. crassa</i>	۰/۷۶	۱/۱۶	۰/۱۴	۰/۱۰	۲۹/۸۵
	<i>Ae. cylindrica</i>	۰/۸۳	۱/۱۷	۰/۱۵	۰/۱۰	۳۲/۸۴
	<i>Ae. tauschii</i>	۰/۹۱	۱/۱۷	۰/۱۶	۰/۱۱	۳۶/۸۲
	میانگین	۰/۸۳	۱/۱۷	۰/۱۵	۰/۱۰	۳۳/۱۷
SCoT+TRAP	<i>Ae. crassa</i>	۱/۰۶	۱/۲۶	۰/۲۳	۰/۱۵	۴۷/۴۱
	<i>Ae. cylindrica</i>	۱/۱۷	۱/۲۹	۰/۲۶	۰/۱۷	۵۳/۱۳
	<i>Ae. tauschii</i>	۱/۱۸	۱/۲۷	۰/۲۵	۰/۱۶	۵۲/۸۶
	میانگین	۱/۱۳	۱/۲۷	۰/۲۴	۰/۱۶	۵۱/۱۴

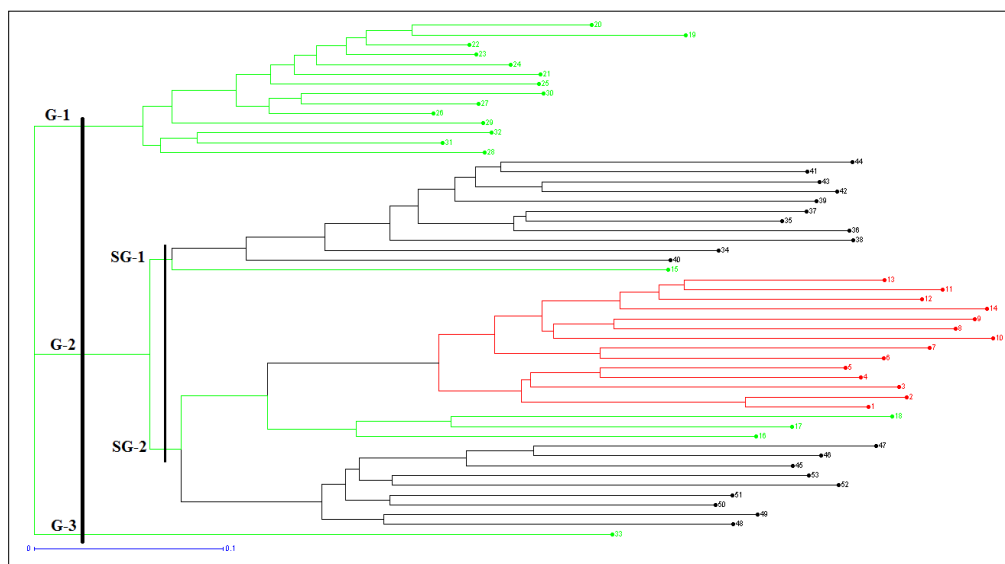
He, I, Ne, Na و PPL: به ترتیب نشان‌دهنده تعداد آل‌های مشاهده شده، تعداد آل‌های مؤثر، شاخص شانون، تنوع ژنی نی و درصد مکان‌های چندشکلی می‌باشند.

شامل کلیه نمونه‌های مربوط به گونه *Ae. crassa* و سه نمونه از گونه *Ae. cylindrica*، و زیر گروه سوم شامل یک نمونه از گونه *Ae. cylindrica* بود. سایر نمونه‌های مربوط به گونه *Ae. cylindrica* در گروه‌های دوم و سوم قرار گرفتند (شکل ۲). دندروگرام به دست آمده بر اساس داده‌های TRAP کلیه توده‌های بررسی شده را در سه گروه اصلی تفکیک کرد. در گروه اول ۱۴ نمونه از گونه *Ae. cylindrica* قرار داشت. توده‌های موجود در گروه دوم در سه زیر گروه قرار گرفتند به طوری که زیر گروه اول شامل ۱۱ نمونه از گونه *Ae. tauschii* به همراه یک نمونه از *Ae. cylindrica* بود. کلیه توده‌های *Ae. crassa* سه نمونه از *Ae. cylindrica* و ۹ نمونه از گونه *Ae. tauschii* در زیر گروه دوم قرار گرفتند. یک نمونه از گونه *Ae. cylindrica* به تنهایی گروه سوم را تشکیل داد (شکل ۳). تجزیه خوشه‌ای بر اساس ترکیب داده‌های به دست آمده از آغازگرهای SCoT و TRAP نیز الگوی کلی مشابهی از تفکیک توده‌های ارزیابی شده را نشان داد به نحوی که با توجه به دندروگرام به دست آمده کلیه نمونه‌ها در سه گروه اصلی قرار گرفتند. گروه اول در برگیرنده دو زیر گروه بود که کلیه توده‌های مربوط به گونه‌های *Ae. crassa* و *Ae. tauschii* به صورت جدا از یکدیگر قرار گرفتند. گروه‌های دوم و سوم نیز شامل نمونه‌های مربوط به گونه *Ae. cylindrica* بود (شکل ۴).

به منظور گروه‌بندی توده‌های ارزیابی شده و انجام مقایسه کارایی دو سیستم نشانگری استفاده شده در این مطالعه تجزیه خوشه‌ای به روش Neighbor-joining و بر اساس ماتریس ضرایب فاصله انجام شد. بر اساس داده‌های مربوط به آغازگرهای SCoT این ضریب بین ۰/۱۳ و ۰/۸۳ با میانگین ۰/۶۲ متغیر بود. دو نمونه از گونه *Ae. cylindrica* دارای بیشترین تشابه ژنتیکی با یکدیگر بودند و در مقابل کمترین میزان تشابه و یا بیشترین فاصله ژنتیکی بین دو نمونه از گونه *Ae. crassa* و *Ae. tauschii* مشاهده شد. داده‌های حاصل از آغازگرهای TRAP ضرایب فاصله مشابه داده‌های به دست آمده از آغازگرهای SCoT را نشان دادند و مشابهاً دو نمونه از گونه *Ae. cylindrica* و دو نمونه از گونه‌های *Ae. crassa* و *Ae. tauschii* به ترتیب دارای کمترین و بیشترین فاصله ژنتیکی از یکدیگر بودند. زمانی که ضرایب فاصله ژنتیکی بر اساس ترکیبی از داده‌های مولکولی انجام شد، ضرایب فاصله بین ۰/۰۸ (بین دو نمونه از گونه *Ae. cylindrica*) و ۰/۷۷ (بین دو توده از *Ae. crassa* و *Ae. tauschii*) با متوسط ۰/۵۸ متغیر بود. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس آغازگرهای SCoT کلیه توده‌های ارزیابی شده را در سه گروه اصلی و هر یک به ترتیب شامل ۳۷، ۱۵ و ۱ توده بودند. توده‌های موجود در گروه اول در سه زیر گروه تفکیک شدند: به طوری که زیر گروه اول شامل کلیه نمونه‌های مربوط به گونه *Ae. tauschii* زیر گروه دوم



شکل ۲- دندروگرام ترسیم شده با استفاده از ضرایب جاکارد و روش Neighbor-joining بر اساس آغازگرهای SCoT



شکل ۳- دندروگرام ترسیم شده با استفاده از ضرایب جاکارد و روش Neighbor-joining بر اساس آغازگرهای TRAP

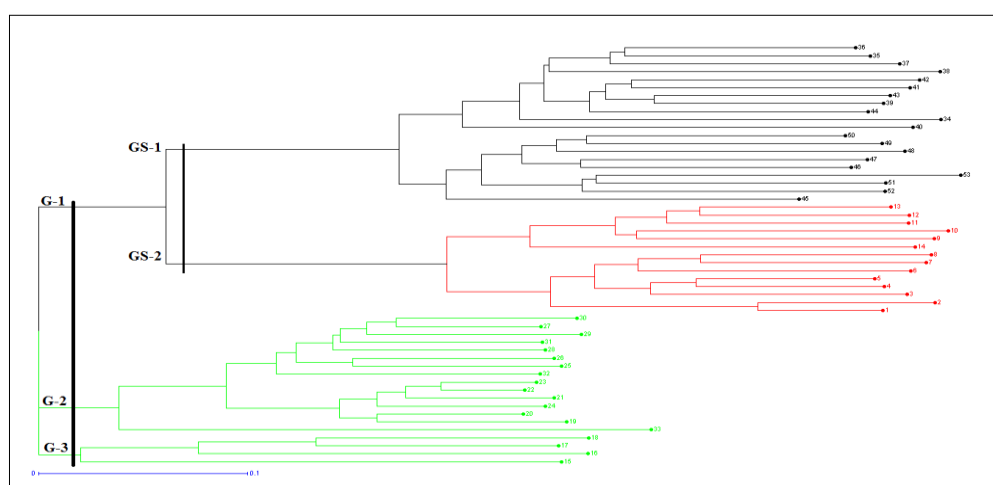
برای قابلیت بالای این سیستم در تولید قطعات تکثیری زیادتر در مقایسه با سیستم SCoT باشد (Menzo et al. 2013). با این حال، یکی از مهم‌ترین پارامترهای تعیین کننده سودمندی یک سیستم نشانگری شاخص PIC است که در این رابطه نشانگر SCoT نمود بهتری داشت و این برتری در بسیاری از مطالعات به خوبی منعکس شده است. از نقطه نظر جزءبندی واریانس ژنتیکی، نشانگر SCoT به خوبی قادر به نشان دادن تنوع درون گونه‌ای بود به طوری که مقادیر پارامترهای ژنتیکی همچون H_e و I نیز تأیید کننده این نتیجه بودند. در جمع بندی الگوی گروه بندی توده‌های مختلف *Aegilops* نشان داد که آغازگرهای

به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه مشخص شد که آغازگرهای TRAP نسبت به SCoT قابلیت بالاتری در تولید قطعات چندشکل دارند که بواسطه این توانایی مقادیر شاخص‌هایی همچون MI و Rp نیز در مقایسه با آغازگرهای SCoT بالاتر بود. در واقع بالاتر بودن مقادیر این شاخص‌ها و یا به عبارت دیگر حصول تعداد قطعات تکثیری چند شکل در این سیستم نشانگری دورانتظار نیست زیرا استفاده از توالی‌های تصادفی در ترکیب با توالی‌های ثابت بیان شونده سبب تکثیر برخی قطعات از نواحی مختلف ژنوم شده است. همچنین در نظر گرفتن دماهای پایین‌تر برای اتصال اولیه آغازگر نیز می‌تواند دلیلی

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی و معنوی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) انجام شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

SCoT توانایی بالایی در تفکیک توده‌های مربوط به هر گونه دارند. از این رو با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می‌رسد که استفاده از نشانگر SCoT در مطالعات ساختار جمعیت و بررسی روابط فیلوژنتیکی نتایج بهتری را ارائه دهد و در مقابل نشانگر TRAP به واسطه تولید تعداد بالایی از قطعات چندشکل به خوبی در مطالعات مرتبط با اشباع نقشه‌های ژنتیکی ایفای نقش کند.



شکل ۴- دندروگرام ترسیم شده با استفاده از ضرایب جاکارد و روش Neighbor-joining بر اساس ترکیب آغازگرهای SCoT و TRAP

منابع

Ahmadi J, Pour-Aboughadareh A, Fabriki-Ourang S, Mehrabi AA, Siddique KHM (2018) Screening wheat germplasm for seedling root architectural traits under contrasting water regimes: potential sources of variability for drought adaptation. *Archives of Agronomy and Soil Science* 64: 1351–1365.

Altintas S, Toklu F, Kafkas S, Kilian B, Brandolini A, Ozkan H (2008) Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding* 127:9–14.

Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181–186.

Arabbeigi M, Arzani A, Majidi MM, Kiani R, Tabatabaei BES, Habibi F (2014) Salinity tolerance of *Aegilops cylindrica* genotypes collected from hyper-saline shores of Uremia salt lake using physiological traits and SSR markers. *Acta Physiologiae Plantarum* 36:2243–2251.

Blake NK, Leffeldt BR, Lavin M, Talbert LE (1999) Phylogenetic reconstruction based on low copy DNA sequence data in an allopolyploid: the B genome of wheat. *Genome* 42:351–360.

Collard BCY, Mackill DJ (2009) Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 27:86–93.

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

Dvorak J, Diterlizzi P, Zhang H-B, Resta P (1993) The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36:21–31.

Etmnian A, Pour-Aboughadareh A, Noori A, Ahmadi-Rad A, Shoostari L, Mahdavian Z, Yousefi-Azarkhanian M (2018) Genetic relationships and diversity among wild *Salvia* accessions revealed by ISSR and SCoT markers. *Biotechnology and Biotechnology Equipment* 32:610–617.

Fabriki-Ourang S, Yousefi-Azarkhanian M (2018) Genetic variability and relationships among *Salvia* ecotypes/species revealed by TRAP-CoRAP markers. *Biotechnology and Biotechnology Equipment* 32:1486–1495.

Feldman M, Sears ER (1981) The wild gene resources of wheat. *Scientific American* 244:98–109.

- Hairat S, Khurana P (2015) Evaluation of *Aegilops tauschii* and *Aegilops speltoides* for acquired thermo tolerance: implications in wheat breeding programs. *Plant Physiology and Biochemistry* 95:65–74.
- Hajjar R, Hodgking T (2007) The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. *Euphytica* 156:1–13.
- Hamidi H, Talebi R, Keshavarz F (2014) Comparative efficiency of functional gene based markers, start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved DNA-derived Polymorphism (CDDP) with ISSR markers for diagnostic fingerprinting in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Research Communications* 42:558–567.
- Hu J, Vick BA (2003) Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter* 21:289–294.
- Kiani R, Arzani A, Habibi F (2015) Physiology of salinity tolerance in *Aegilops cylindrica*. *Acta Physiologiae Plantarum* 37:135–145.
- Kihara H (1944) Discovery of the DD-analyzer, one of the ancestors of *Triticum vulgare*. *Agriculture and Horticulture* 19:13-14.
- Kumar M, Mishra GP, Singh R, Kumar J, Naik PK, Singh SB (2009) Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of trans-Himalayas. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 15:225–236.
- Maxted N, Kell S (2009) CWR in crop improvement: To what extent are they used? *Crop Wild Relative Newsletter* 7:7–8.
- Menzo V, Giancaspro A, Giove S, Nigro D, Zacheo S, Colasuonno P, Marcotuli I, Incerti O, Blanco A, Gadaleta A (2013) TRAP molecular markers as a system for saturation of the genetic map of durum wheat. *Euphytica* 194:151–160.
- Moradkhani H, Mehrabi AA, Etminan A, Pour-Aboughadareh A (2015) Molecular diversity and phylogeny of *Triticum-Aegilops* species possessing D genome revealed by SSR and ISSR markers. *Plant Breeding and Seed Science* 71:82–95.
- Moradkhani H, Pour-Aboughadareh AR, Mehrabi AA, Etminan A (2012) Evaluation of genetic relationships of *Triticum-Aegilops* species possessing D genome in different ploidy levels using microsatellites. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 23:1746–1751.
- Mousavifard SS, Saeidi H, Rahiminejad MR, Shamsadini M (2015) Molecular analysis of diversity of diploid *Triticum* species in Iran using ISSR markers. *Genet Resources and Crop Evolution* 62:387–394.
- Naghavi MR, Hajikram M, Taleei AR, Aghaei MJ (2010) Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of *Aegilops tauschii* Coss. in northern Iran. *Genet Resources and Crop Evolution* 57:423–430.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology* 6:288–295.
- Perrier X, Flori A, Bonnot F (2003) Data Analysis Methods. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC, editors. Genetic diversity of cultivated tropical plants. Boca Raton, FL (USA): CRC Press; 2003. p. 360.
- Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Moghaddam M, Etminan E, Siddique KHM (2017a) Physiological responses to drought stress in wild relatives of wheat: implications for wheat improvement. *Acta Physiologiae Plantarum* 39:49.
- Pour-Aboughadareh A, Mohmoudi M, Moghaddam M, Ahmadi J, Mehrabi AA, Alavikia SS (2017b) Agromorphological and molecular variability in *Triticum boeoticum* accessions from Zagros Mountains, Iran. *Genet Resources and Crop Evolution* 64:545–556.
- Pour-Aboughadareh A, Omid M, Etminan A, Mehrabi AA (2018) The importance of wild wheat germplasm in breeding for resistance to abiotic stresses. *Modern Genetics Journal* 51:489–504. (In Persian).
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2, 225–238.
- Qaderi A, Omid M, Pour-Aboughadareh A, Poczai P, Shaghghi J, Mehrfarin A, Nohooji M, Etminan A (2019) Molecular diversity and phytochemical variability in the Iranian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.): A baseline for conservation and utilization in future breeding programs. *Industrial Crops and Products* 130:237–247.
- Saisho D, Takumi S, Matsuoka Y (2016) Salt tolerance during germination and seedling growth of wild wheat *Aegilops tauschii* and its impact on the species range expansion. *Scientific Reports* 6:38554.
- Schneider A, Molnar I, Molnar-Lang M (2008) Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica* 163:1–19.
- Tiwari G, Singg R, Singh N et al. (2016) Study of arbitrarily amplified (RAPD and ISSR) and gene targeted (SCoT and CBDP) markers for genetic diversity and population structure in Kalmegh [*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees]. *Industrial Crops and Products* 86:1–11.
- Warschefsky E, Penmetsa RV, Cook DR, von Wettberg EJB (2014) Back to the wilds: tapping evolutionary adaptations for resilient crops through systematic hybridization with crop wild relatives. *American Journal of Botany* 101:1791–1800.
- Zeinalizadeh Tabrizi H, Kamil H, Haghighati Ahmad R (2016) Genetic diversity of sunflower genotypes (*Heliantus annuus* L.) using TRAP markers. *Journal of Crop Biotechnology* 12:39–53.