الكشف عن مؤشرات جزيئية RAPD مرتبطة ببعض الحموض الدسمة في زيت دوار الشمس (*Helianthus annuus* L.)

د. لبنى مقراني*

الملخص

تمّ استخدام تقنية RAPD في الكشف عن مؤشرات جزيئية مرتبطة بمواقع وراثية مسؤولة عن إنتاج بعض الحموض الدسمة في زيت بذور دوار الشمس، وذلك عن طريق دراسة 29 نمطاً وراثياً محليّاً ومُدخلاً. اعتمدنا في هذا البحث على نتائج 13 مرئسة والمتمثّلة في 74 مؤشراً جزيئياً، أظهر 60 مؤشراً منها تبايناً واضحاً، وهي التي تمّت دراسة ارتباطها الإحصائي بنتائج تحليل زيت بذور دوار الشمس. أبدت الأنماط الوراثية المدروسة تبايناً ملحوظاً في محتواها من الحموض الدسمة التي خصّها البحث بالدراسة نظراً لأهميّتها، وهي: حمض الأوليك، حمض اللينولييك، حمض البالميتيك، وحمض الستياريك، حيث تراوحت النسب بين 17.10% و77.30% بالنسبة لحمض الأوليك، بين 9.17% و68.20% بالنسبة لحمض اللينولييك، من 3.40% إلى 15.30% بالنسبة لحمض الستياريك وأخيراً من 4.49% إلى 14.40% بالنسبة لحمض البالميتيك. سمح هذا التباين بالكشف عن مؤشرات جزيئية مرتبطة بالمواقع الوراثية المتحكّمة في إنتاج هذه الحموض الدسمة باستعمال طريقة تحليل المؤشرات الجزيئية المستقلّة Single Marker Analysis

* مدرّسة في قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم –جامعة دمشق.

(SMA)، التي أظهرت نتائجها أربعة مؤشرات جزيئية مرتبطة بحمض الأوليك وثلاثة مؤشرات جزيئية مرتبطة بحمض البالميتيك. يمكن الاستفادة من هذه النتائج في أبحاث لاحقة تهدف إلى التحسين الوراثي لنبات دوّار الشمس، لا سيما زيادة نسبة حمض الأوليك؛ بالاعتماد على المؤشرات الجزيئية القريبة من المواقع الوراثية المتحكّمة فيها.

الكلمات المفتاحية: دوّار الشمس، RAPD، حموض دسمة، مواقع وراثية لصفات كمّية.

Detection of RAPD molecular markers related to some fatty acids in sunflower oil

Dr. Loubna Mokrani*

Abstract

RAPD (Random Amplified DNA) technique was employed to detect molecular markers associated with some fatty acids in sunflower oil seeds. This research was based on 29 local and introduced genotypes. Results of 13 RAPD primers revealed 74 molecular markers, 60 of which were polymorphic and suitable for loci detection. The next step consists in oil seeds analysis. It focused on the most important fatty acids which are: oleic, linoleic, stearic and palmitic acids. A considerable variability was observed among genotypes in their contents for the aforementioned fatty acids. Values ranged between 17.10% and 77.30% for oleic acid, between 9.17% and 68.20% for linoleic acid, from 3.40% to 15.30% for stearic acid and finely from 4.49% to 14.40% for palmitic acid. This variability facilitated markers detection and increased the authenticity of the results. Single Marker Analysis (SMA), based on T-test, was used as statistical method for the detection of markers associated with fatty acids. Four markers were correlated with oleic acid and three others with palmitic acid. These results may be useful in marker assisted selection for genotypes with specific fatty acids composition and in any preliminary study prior to future breeding programs.

Key words: sunflower, RAPD, fatty acids, Single Marker Analysis.

* Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

مقدمة:

يعود أصل نبات دوار الشمس إلى أمريكا الشمالية، وهو أول نبات سنوي يزرع خصيصاً من أجل زيته. استغرق تطور زراعة دوار الشمس سنوات طويلة، ولم يعرف ازدهاراً إلا بعد اكتشاف ظاهرة العقم النووي– السيتوبلازمي (1969) Leclercq، الذي يعود إليه الفضل في إنتاج معظم الهجن المسوّقة حالياً.

تحوي بذور دوار الشمس بشكل عام ما بين 40% و50% من الزيت (Skoric and Marinkovic, 1986)، وتختلف نسب الحموض الدسمة المكوّنة له بين الأنماط البرية والأصناف الكلاسيكية المزروعة. يقدّم التركيب البيوكيميائي للزيت معلومات مهمّة متعلّقة بنوعيّته وقيمته الغذائية وإمكانات استخدامه في الصناعات الغذائية، خاصّة نسب الحموض الدسمة المشبعة، مثل: حمض البالميتيك Palmitic acid، وحمض الستياريك Stearic acid، وغير المشبعة (حمض الأوليبيك Oleic acid، وحمض اللينولييك Linoleic acid) (Shahbaz and Fayyaz, 2000). تتكوّن بذور الأصناف الكلاسيكية من 11% حموض مشبعة (حمض الستياريك وحمض البالميتيك)، 20% حمض الأوليبيك و 69% حمض اللينولييك، وهذا الأخير سائد في معظم الأصناف المزروعة (Dorrell and Vick, 1997). غير أنّه يوجد تنوّع وراثي مهم من حيث تركيب الحموض الدسمة لدى بذور هذا النبات، كما أظهر Cummins *et al.* (1967) و Simpson and George (1985). بناءً على حاجة السوق لنوعية زيت متحمّلة للحرارة، وأقل احتواء على الحموض الدسمة المشبعة تمّ تطوير أصناف جديدة من دوّار الشمس ذات نسبة عالية من حمض الأوليبيك (Pacureanu-Joita *et al.* 2005). وكان أوّل مصدر لمثل هذه الأصناف صنف Pervenets الذي تحصّل عليه الباحث الروسي Soldatov سنة 1976 بوساطة عملية تطفير، وبلغت نسبة حمض الأوليبيك في زيت بذوره حوالي 85%. كما أسهمت الأنماط البرية في تحسين هذا

النبات من حيث تركيبه من الحموض الدسمة خاصة (Dorrell and Whelan 1978; Thompson et al. 1981; Seiler 1985, 1994, 1998).

يمثّل البحث عن المواقع الوراثية المسؤولة عن نسب الزيت والحموض الدسمة المكوّنة له قيمة علمية بالغة؛ فضلاً عن الأهمية التطبيقية المتمثلة في تسهيل عمليات الانتخاب، وجعلها أكثر دقة وسرعة.

يتمّ البحث عن المواقع الوراثية باستخدام خريطة وراثية في كثير من الأحيان Eyvaznejad and Darvishzadeh (2014), Vanitha *et al*. (2014)، ويرى Liu (1998) أن لهذه الأخيرة ميزات كثيرة، خاصة باتباع طريقة المؤشرات المتعددة Zeng Composite interval (1994) Mapping، فهي تعطي دقّة للنتائج ومعلومات وراثية مهمّة مقارنة بباقي الطرائق Rachid-Al-Chaarani *et al*. (2001), Mokrani *et al*. (2002) Flores-Berios *et al*. (2000).

لا يمكن في جميع الحالات إنشاء خريطة وراثية للنوع النباتي المدروس، لذلك تعد طريقة المؤشرات المستقلة إحدى الوسائل الإحصائية المتستخدمة في هذا المجال. بينت كثير من الدراسات أهمية هذا الأسلوب، وبرهنت على فاعليّته Coffman *et al*. (2003)، وقد استخدم في أبحاث كثيرة لدراسة العديد من الصفات الكمية لدى الجزر Santos and Simon (2002) والقمح Parasad *et al*. (2003) والشعير Potokina *et al*. (2006) ودوّار الشمس Anandhan *et al*. (2010).

وتجدر الإشارة إلى دور تقنية RAPD في هذا المجال؛ إذ تمّ استخدامها في الكشف عن المواقع الوراثية Loci المسؤولة عن إنتاج السكروز لدى البطيخ (Park *et al*. 2007)، وفي دراسة المواقع الوراثية المتحكّمة في نوعية الخشب لدى شجر الأوكاليبتوس Eucalyptus Rocha *et al*. (2006)، كما استخدمت في دراسة

محتوى نبات الفول من الحموض الدهنية Sallam and Martsch (2016) وغيرها من الأبحاث.

تمت دراسة المواقع الوراثية للعديد من الصفات الكمية لدى دوّار الشمس سواء من خلال دراسات في الزجاج *in vitro* لأهداف علمية بحتة (Flores Berios *et al*. 2000) أو في الحقل كصفات المردود والتبكير ونسبة الزيت Mokrani *et al*. (2002)، كما ركزت دراسات أخرى على الجانب الوراثي للتركيب الكيميائي للزيت Lacombe *et al*. (2000). هذا على المستوى العالمي، أما محلياً فلا يتجاوز الاهتمام بهذا النبات حدّ عمليات الأقلمة لبعض الأصناف المستوردة. لذلك كان اهتمامنا بهذا المحصول المهم ورغبتنا في فهم الآليات الوراثية المتحكمة في عدد من الصفات التي نرغب في تحسينها؛ وذلك بالاعتماد على الأصناف الموجودة لدينا والتي تنتمي إلى مواقع جغرافية مختلفة؛ فضلاً عن الأصناف المدخلة.

1. المواد والطرائق

1.1 المادة النباتية:

تم الحصول على بذور 29 نمطاً وراثياً من نبات دوار الشمس، 19 منها من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية و10 من الأسواق المحلية (4 أنماط من حلب – 5 أنماط من منطقة الغاب – نمط واحد من دمشق). تجدر الإشارة إلى عدم تمتّع الأنماط المدروسة بخاصية العقم النووي السيتوبلازمي. أضيفت عيّنتان بعيدتان وراثياً كشاهدين من أجل مصداقية دراسة القرابة الوراثية، هما: الأقحوان *Calendula officinalis*، والقطيفة *Tagets sp* (جدول1) .

2.1 تحليل الدنا الجينومي

1.2.1 استخلاص الدنا

جرى استخلاص الدنا من أوراق النبات باستخدام طريقة CTAB (1987) Doyle.

2.2.1 تقنية RAPD

بلغ الحجم النهائي لوسط التفاعل بعد الأمثلة 12.5 ميكروليتراً وتضمّن الآتي: [100mM Tris-HCl (pH 8.8 عند درجة حرارة 25ºC)، $(NH4)_2SO_4$ 50mM ، بوفين سيروم البومين - 20 Tween 0.00002%] - ($MgSO_4$ 3.2 mM، 0.25 mM لكل قاعدة (dCTP, dGTP, dTTP, dATP) صنع شركة Roche، 1 وحدة من Taq DNA Polymerase صنع شركة Fermentas ، 42 نانوغرام من الـ DNA و60 نانوغرام من كل مرئسة primer [27 مرئسة (صنع شركة OPERON)، و5 مرئسات (صنع شركة GE Life Sciences)].

وكان برنامج تفاعلات البلمرة المتسلسلة PCR على النحو الآتي:

- تمسخ (Denaturation) أولي لفصل جديلتي الدنا، وذلك عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، ولمدة دقيقة واحدة، أتبعت بـ 45 دورة تضمنت كل منها:
- تمسخ (Denaturation) عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، ولمدة عشر ثوان.
- التحام (Annealing) عند درجة حرارة 35 درجة مئوية، ولمدة عشر ثوان.
- استطالة (Extension) عند درجة حرارة 72 درجة مئوية، ولمدة دقيقة وعشر ثوان. تلا ذلك استطالة نهائية، ولدورة واحدة عند درجة حرارة 72 ولمدة دقيقتين، وأبقيت نواتج التفاعل عند درجة حرارة 4 درجة مئوية.

تمّ فصل نواتج تفاعل الـ PCR بوساطة هلامة أغاروز 1.2% (صنع شركة Q-Biogene) ضمن محلول واق TBE 0.5X، وقد أضيف للهلامة إثيديوم بروميد (صنع شركة Fluka)، لكشف حزم الـ DNA. تمّت قراءة النتائج بعد

تعريضها للأشعّة فوق البنفسجية UV، وقد استعمل معلم (100 bp Ladder) (صنع شركة Vivantis) لبيان الأوزان الجزيئية للحزم.

3.2.1 التحليل الكيميائي للزيت:

تمّ تحليل الزيت بطريقة الكروماتوغرافيا الغازية المتّبعة من قبل Perez-Vich et al. (1999).

4.2.1 التحليل الإحصائي:

تمّ الكشف عن المؤشرات الجزيئية المرتبطة بإنتاج الحموض الدسمة باستخدام طريقة Single Marker Analysis (SMA) التي تعتمد على اختبار T- test analysis، حيث جرى الربط بين نسب الحموض الدسمة المختلفة، ونتائج التحليل الجزيئي، والبحث عن فروق معنوية بين القيم التابعة للوجود والقيم التابعة للغياب.

جدول1: الأنماط الوراثية المستخدمة في البحث ومصادرها

المسار	الأنماط الوراثية	رمز الأنماط	ملاحظات	المصدر
1	بلدي حلب	A	-	السوق المحلي—حلب
2	برازيلي	B	-	السوق المحلي—حلب
3	سرغايا 4	**C**	صنف محلي	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
4	تركيبي القنيطرة	D	صنف محلي	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
5	Hysum33	E	هجين أسترالي	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
6	434	**F**	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
7	436	G	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
8	440	H	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
9	441	**I**	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
10	443	J	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
11	KASOL	K	إيطالي	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
12	7182	**L**	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
13	7183	M	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
14	7184	N	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية

15	7185	**O**	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
16	7186	P	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
17	7187	Q	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
18	7189	**R**	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
19	7190	S	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
20	7191	T	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
21	7192	**U**	هجين يوناني	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
22	بلدي قرطبة	V	-	السوق المحلي--دمشق
23	غاب 1	W1	-	السوق المحلي-الغاب
24	غاب 2	W2	-	السوق المحلي-الغاب
25	غاب 3	W3	-	السوق المحلي-الغاب
26	غاب 4	W4	-	السوق المحلي-الغاب
27	غاب 5	W5	-	السوق المحلي-الغاب
28	سفيرة حلب	X	-	السوق المحلي-حلب
29	مضخ حلب	Y	-	السوق المحلي-حلب
30	الأقحوان		-	دوبايا- يعفور
31	القطيفة		-	دوبايا- يعفور

2. النتائج والمناقشة:

2. 1 تحليل الزيت:

تركّز اهتمامنا على أربعة حموض دسمة، وهي: حمض الأوليبك، وحمض اللينولييك، وحمض البالميتيك، وحمض الستياريك. وقد أظهرت النتائج تبايناً واضحاً بين الأنماط الوراثية المدروسة مع مستويات مختلفة لنسب الحموض الدسمة؛ مما يسمح باعتبار مجموع الأنماط الوراثية مجتمعاً صغيراً كافياً لمثل هذه الدراسة (جدول 2). تراوحت نسبة حمض الأوليبك بين 17.10% و77.30% من أجل النمطين بلدي قرطبة و7189 على الترتيب، وقد أعطى النمط 7189 وبشكل منفرد أعلى نسبة من حمض الأوليبك. ثاني أعلى نسبة من حمض الأوليبك وجدت لدى نمط الغاب 1 (58.50%). من ناحية أخرى سجّل بلدي قرطبة أعلى نسبة في حمض

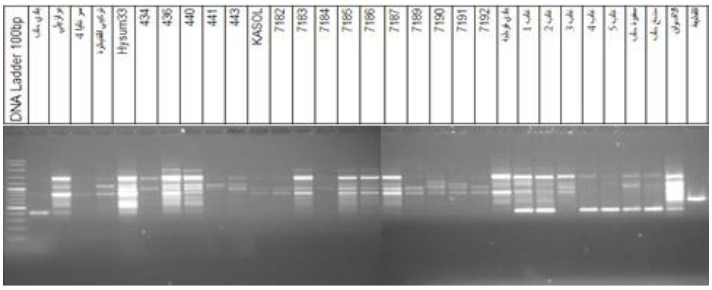
اللينولييك (66.80%)، في حين وجدت أدنى نسبة له لدى النمط 7189 (9.17%). بيّنت النتائج أن الأنماط الوراثية ذات النسب العالية من حمض الأولييك تحتوي على نسب منخفضة من حمض اللينولييك والعكس صحيح، ويعود ذلك إلى ارتباط إنتاج كلّ منهما بنفس الإنزيم Δ12- ديستراز (Δ12-desaturase). وقد أظهرت نتائج Lacombe and Berville (2000) أن تثبيط هذا الإنزيم يؤدي إلى زيادة نسبة حمض الأولييك، وخفض نسبة حمض اللينولييك. شكّل حمض البالميتيك وحمض الستياريك نسباً صغيرة من زيت بذور دوّار الشمس، كما هو متوقّع وتوافقاً مع نتائج Dorrel and Vick (1997). تراوحت قيم حمض الستياريك بين 3.40% (مضخ حلب) و15.30% (سرغايا 4)، في حين سجّلت نسب بين 4.49% لدى النمط 7189 و14.40% لدى النمط سرغايا 4 من أجل حمض البالميتيك.

2.2 المؤشرات الجزيئية المرتبطة بالحموض الدسمة:

يبين الجدول (3) المرئسات الثلاث عشرة المستخدمة في دراسة الأنماط الوراثية لدوار الشمس وتسلسلاتها؛ فضلاً عن عدد المؤشرات الجزيئية الناتجة وتباينها. كما يظهر الشكل1 صورة إحدى الهلامات الناتجة عن استخدام المرئسة OP-R04. أعطى مجموع هذه المرئسات 74 معلماً جزيئياً، من بينها 60 معلماً متبايناً؛ ممّا يشير إلى درجة التباين العالية التي أعطتها تقنية RAPD والمرئسات المستخدمة في البحث. تمّ الاعتماد على هذه المؤشرات المتباينة في المرحلة اللاحقة من البحث.

جدول 2: نسب الحموض الدسمة في زيت بذور الأنماط الوراثية المدروسة من دوّار الشمس.

الأنماط الوراثية	حمض الأوليبك	حمض اللينوليك	حمض البالميتيك	حمض الستياريك
7183	27.30	57.26	6.78	6.70
7185	33.40	50.40	7.79	6.09
7186	25.40	56.30	7.15	5.59
7189	77.30	9.17	4.49	3.49
7191	37.05	48.72	6.21	4.27
7187	30.20	53.66	7.50	6.80
7190	34.20	50.60	8.40	3.60
7192	44.10	40.40	7.60	5.40
440	18.20	58.90	9.60	8.30
443	20.70	53.60	8.70	8.90
7182	28.30	36.60	9.60	8.80
7184	31.80	37.50	10.70	10.10
Kasol	44.90	41.00	6.30	4.35
تركيبي القنيطرة	22.50	63.10	6.75	4.35
436	23.50	60.30	6.40	3.85
غاب 2	24.70	56.90	4.80	8.09
تركيبي قرطبة	17.10	66.80	6.10	6.60
441	20.30	68.20	5.60	5.40
بلدي	35.00	54.59	5.70	3.60
برازيلي	44.70	45.50	5.02	3.60
مضخ حلب	28.60	58.60	5.90	3.40
غاب 1	58.50	16.40	13.70	6.80
غاب 5	51.60	32.32	9.13	4.18
سرغايا 4	26.10	39.10	14.40	15.30
Hysum33	32.10	50.60	7.40	6.30
غاب 3	51.30	30.30	10.10	5.16
غاب 4	47.50	28.10	10.90	5.00
سفيرة حلب	51.30	26.50	12.70	6.30



الشكل1: نواتج التضخيم باستخدام المرئسة OP-R04 المطبقة على الأنماط الوراثية المدروسة على هلامة أغاروز.

جدول 3: مرئسات RAPD وتسلسلاتها. وعدد المؤشرات الجزيئية الناتجة عن استخدامها وتباينها.

المرئسات	التسلسل	عدد المؤشرات الجزيئية	عدد المؤشرات الجزيئية المتباينة
OP-D08	GTGTGCCCCA	4	4
OP-E01	CCCAAGGTC	4	3
OP-E12	TTATCGCCCC	7	7
OP-E18	GGACTGCAG	6	5
OP-R04	CCCGTAGCA	11	11
OP-R07	ACTGGCCTG	6	5
OP-R08	CCCGTTGCCT	5	3
OP-R11	GTAGCCGTCT	7	7
OP-R15	GGACAACGA	7	3
OP-Z 03	CAGCACCGC	4	3
OP-Z 13	GACTAAGCC	5	4
OP-Z 14	TCGGAGGTTC	2	0
OP-Z 19	GTGCGAGCA	6	5
المجموع		74	60

سمحت نتائج التحليل الجزيئي من جهة، ونتائج نسب الحموض الدسمة من جهة أخرى بالكشف عن المؤشرات الجزيئية المرتبطة بإنتاج الحموض الدسمة. يدل هذا

الارتباط الإحصائي على القرب المحتمل من مواقع وراثية مسؤولة عن إنتاج الحموض الدسمة المدروسة. أظهرت قيم T-test فروقاً معنوية بين النسب المئوية للحموض الدسمة الخاصة بالأنماط الوراثية المظهرة للحزم وتلك التي تغيب فيها، وذلك من أجل عدد من المؤشرات الجزيئية. تمّ الكشف عن 4 مؤشرات جزيئية مرتبطة بحمض الأوليك و3 مؤشرات أخرى ارتبطت بحمض البالميتيك (جدول 4). تجدر الإشارة إلى عدم وجود مؤشرات جزيئية تشترك في ارتباطها بحمضي الأوليك والبالميتيك، غالباً بسبب اختلاف المسار المؤدّي لإنتاج كلّ منهما؛ مما يسهّل عمليات الانتخاب في أبحاث لاحقة؛ إذ يمكن اختيار الأنماط الوراثية الموافقة من حيث الوجود أو الغياب للمؤشرات الجزيئية المرتبطة بحمض الأوليك بشكل مستقل عن تلك المنتجة لنسبة عالية من حمض البالميتيك. لا شكّ في أنّ للخرائط الوراثية مزايا عديدة في الكشف عن مواقع الصفات الكمية Quantitative Trait Loci (QTL)، خاصة من حيث تحديد المسافة التي تبعد بها المؤشرات الجزيئية عن مواقع الصفات ذات الأهميّة (Wills and Burke, 2007). غير أن طريقة المؤشرات المستقلّة لا تقلّ أهميّة عن الأساليب الإحصائية الأخرى التي تستوجب خريطة وراثية، كما أنّها مناسبة في الأبحاث التي لا تعتمد على مجتمعات مندلية كالمجتمعات البرية أو أي أنماط وراثية متباينة في الصفات المدروسة (Coffman et al. 2003; Tuyen and Prasad, 2008; Gomez Selfaraj et al. 2009).

تتميّز معظم الأصناف الزراعية لنبات دوّار الشمس بنسبة عالية من حمض الأوليك، ذلك لأنها صفة مطلوبة صناعياً وغذائياً بفضل الخصائص الفيزيائية والكيميائية التي يتمتّع بها هذا النوع من الزيت، وهي بسبب ذلك محتكرة من قبل الشركات متعددة الجنسيات المنتجة للبذور. وهنا تكمن أهميّة تحسين أصناف محلية ذات نسبة عالية من حمض الأوليك، ومنخفضة من الحموض الدسمة المشبعة؛ فضلاً عن صفات زراعية أساسية في عملية الإنتاج.

تسهم النتائج الحالية في تحقيق هذا الهدف، وتمثّل خطوة أولى في مشاريع التحسين الوراثي، والانتخاب المعتمد على المؤشرات الجزيئية.

جدول 4: المؤشرات الجزيئية المرتبطة بالحموض الدسمة المدروسة:

الحموض الدسمة	المرئسات	المؤشرات الجزيئية المرتبطة
حمض الأوليك	CCCAAGGTCC CCCAAGGTCC CCCAAGGTCC GTAGCCGTCT	RAPD 20 RAPD 21 RAPD 22 RAPD 40
حمض البالميتيك	CCCGTTGCCT CCCGTTGCCT GGACAACGAG	RAPD 38 RAPD 39 RAPD 42

المراجع:

1- Anandhan T, Manivannan N, Vindhiyavarman P and. Jeyakumar P 2010. Single marker analysis in sunflower (Helianthus annuus L.). Electronic Journal of Plant Breeding, 1(4): 1227-1234.

2- Coffman CJ, Doerge RW, Wayne ML and McIntyre LM. 2003. Intersection tests for single marker QTL analysis can be more powerful than two marker QTL analysis BMC Genetics 4:10.

3- Cummins DG, Marion JE, Craigmiles JP, Burns RE. 1967. Oil content, fatty acid composition and other agronomic characteristics of sunflower introductions. J. Am.Oil Chem. Soc., 44: 581-582.

4- Dorrell DG. and. Whelan EDP. 1978. Chemical and morphological characterization of seeds of some sunflower species. Crop Sci. 18:969–971.

5- Dorrel DG and Vick BA. 1997. Properties and processing of oilseed sunflower. In. Shneiter A (ed) Sunflower technology and production. ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin: 441-495.

6- Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19:11-15.

7- Flores Berrios E, Gentzbittel L, Kayyal H, Alibert G and Sarrafi A. 2000. AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (Helianthus annuus L). Theor Appl Genet 101:1299–1306.

8- Eyvaznejad N and Darvishzadeh R 2014. Identification of QTLs for grain yield and some agro-morphological traits in sunflower (Helianthus annuus L.) using SSR and SNP markers. Journal of Plant Molecular Breeding (JPMB) Vol. 2/No .2, 68-87.

9- Gomez Selvaraj M, Narayana A, Schubert M, Jamie L, Ayers MR, Baring M and Burow D. 2009. Identification of QTLs for pod and kernel traits in cultivated peanut by bulked segregant analysis Michael Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458 Vol.12 No.2.

10- Lacombe S, Berville A. 2000. Analysis of desaturase transcript accumulation in national and in high oleic oil sunflower

development seeds.- 15th International Sunflower Conference- 12-15 June- Toulouse-France.

11- Leclercq P (1969). Une stérilité cytoplasmique chez le tournesol. Ann. Amélior. Plant. 19 : 99-106.

12- Liu B. 1998. Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis. CRC Press, Boca Raton. Tranksley SD. 1993. Mapping polygenes. Annu. Rev. Genet. 27: 205-233.

13- Mokrani L, Gentzbittel L, Azanza F, Fitamant L, Al-Chaarani G and. Sarrafi A. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil content and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (Helianthus annuus L.). Theor Appl Genet 106:149–156.

14- Pacureanu-Joita M, Stanciu D, Petcu E, Raranciuc S, Sorega I. 2005. Sunflower genotypes with high oleic acid content. Romanian Agricultural Research. Number 22.

15- Park S. O, Sinclair J. W, Crosby K. M and Yoo K. S 2007. Identification and Confirmation of RAPD Markers and Andromonoecious Associated with QTL for Sucrose in Musk melon.Genomics of Hort. Plants. Ed.-in-Chief: R. Drew, 191-196.

16- Perez-Vich, BR, Garce´ S and. Ferna´ndez-Mart´ınez JM. 1999. Genetic control of high stearic acid content in the seed oil of sunflower mutant CAS-3. Theor. Appl. Genet. 99:663–669.

17- Potokina E; Parasad M; Malisheva L; Roder M S; Graner A (2006). Expression genetics and hoplotypes analysis reveal cis regulation of serine carboxypeptidase I (cxp 1)، a condidate gene for malting quality in Barley (*Hordium vulgare L*). Funct Integr Genomics 6: 25-35.

18- Parasad M; Kumer N; Kulwal P L; Roder M S; Balyan S; Dhaliwal H S; Gupta P K (2003). QTL analysis for grain protein content using SSR markers and validation studies using NILs in bread wheat. Theor Appl Genet (2003) 106:659–667

19- Rachid Al-Chaarani G;، Roustaee L; Gentzbittel L; Mokrani L;، Barrault G; Dechamp-Guillaume G; Sarrafi A (2001). A QTL analysis of suflower partial resistance to downy mildew (Plasmopara halstedii) and black stem (Phoma macdonaldii) by

the use of recombinant inbred lines (RILs). Theor Appl Genet 104:490-496.

20- Rocha R. B, Barros E. G, Cruz C. D and Antônio Marcos Rosado A. M, De Araújo E. F 2006. Mapping of QTLs related with wood quality and developmental characteristics in hybrids (Eucalyptus grandis X Eucalyptus urophylla). R. Árvore, Viçosa-MG, v.31, n.1, p.13-24

21- Sallam A and Martsch R 2016. Validation of RAPD markers associated with frost tolerance in winter faba bean (Vicia faba L.). Turkish Journal of Botany, 40: 488-495

22- Santos C A F & Simon P W (2002). QTL analyses reveal clustered loci for accumulation of major provitamin A carotenes and lycopene in carrot roots. Mol Genet Genomics (2002) 268: 122–129

23- Seiler GJ. 1985. Evaluation of seeds of sunflower species for several chemical and morphological characteristics. Crop Sci. 25:183–187.

24- Seiler GJ. 1994. Oil concentration and fatty acid composition of achenes of North American Helianthus species. Econ. Bot. 48:272–279.

25- Seiler GJ. 1998. The potential use of wild Helianthus species for selection of low saturated fatty acids in sunflower oil. p. 109–110. In: A.M de Ron (ed.), International. Symposium on Breeding of Protein and Oil Crops. EUCARPIA, Pontevedra, Spain.

26- Shahbaz A, and Fayyaz UH. 2000. Oil yield and fatty acid composition of spring sunflower, Pakistan journal of Biological Sciences 3 (12):2063-2064.

27- Simpson BW and George DL. 1985. Potential for selection of fatty acids on a single seed basis in sunflower (Helianthus annuus L.). Proc. 11th Intern. Sunflower Conf., Mar del Plata, Argentina, Vol. II: 791-796.

28- Skoric D and Marinkovic R. 1986. Most Recent Results in Sunflower Breeding. International Symposium on Sunflower. Budapest. 118-119.

29- Soldatov KI. 1976. Chemical mutagenesis in sunflower breeding. In Processing of the 7th International Sunflower Conference. Krasnodar, Russia: 352-357.
30- Thompson TE, Zimmerman DC and Rogers CE. 1981. Wild Helianthus as a genetic resource. Field Crops Res. 4:333–343.
31- Tuyen DD and Prasad DT. 2008. Evaluating difference of yield trait among rice genotypes (Oryza sativa L.) under low moisture condition using candidate gene. Omonrice 16: 24-33.
32- Vanitha J, Manivannan N and Chandirakala R 2014. Quantitative trait loci analysis for seed yield and component traits in sunflower. African Journal of Biotechnology Vol. 13(6), pp. 754-761.
33- Wills DM and Burke JM. 2007. Quantitative Trait Locus Analysis of the Early Domestication of Sunflower Genetic Analysis of Seed-Oil Concentration across Generations and Environments in Sunflower. Genetics 176: 2589–2599.
34- Zeng ZB (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136 : 1457-1468