

شناسایی نشانگرهای IRAP مرتبط با صفات مورفولوژیکی-زراعی در آفتابگردان دانه روغنی (*Helianthus annuus L.*) تحت شرایط آبیاری معمولی و محدود

نسرین اکبری و رضا درویش‌زاده*

ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۸



چکیده

تنش خشکی از عمده‌ترین عوامل تأثیرگذار محیطی بر رشد، عملکرد و کیفیت محصولات کشاورزی است. متأسفانه تغییرات اقلیمی حاکم بر جهان و مدیریت‌های نادرست، زمینه گسترش دامنه اراضی خشک و نیمه خشک جهان را فراهم کرده است. در این بین آفتابگردان از جمله گیاهان روغنی مهم با مقاومت نسبی به تنش خشکی است. این پژوهش بمنظور شناسایی نشانگرهای ملکولی پیوسته با ژن‌های کنترل کننده صفات مورفولوژیکی-زراعی تحت شرایط تنش خشکی جهت استفاده در برنامه اصلاحی و تسریع گزینش ارقام مقاوم به خشکی انجام گرفت. تعداد ۱۰۰ لاین آفتابگردان دانه روغنی در قالب طرح لاتیس ساده ۱۰ × ۱۰ با دو تکرار در هریک از شرایط معمولی و محدودیت آبیاری طی دو سال متوالی ارزیابی شدند. پروفیل مولکولی لاین‌ها با ۷ ترکیب آغازگر IRAP تهیه شد. براساس مدل خطی مخلوط تحت شرایط معمولی ۱۲ و در شرایط تنش محدودیت آبیاری ۱۰ نشانگر مولکولی با صفات مورد بررسی ارتباط معنی‌دار ($P \geq 0.01$) نشان دادند. نشانگر 61655 با صفت روغن تحت هر دو شرایط آبیاری معمولی و محدود، دو نشانگر 616510 و 61655 در شرایط آبیاری معمولی و نشانگر CfcR1 تحت شرایط آبیاری محدود با چندین صفت ارتباط معنی‌دار نشان دادند که می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل صفات فوق باشد. نشانگر "616510" پیوسته با ژن‌های کنترل کننده عملکرد و نشانگر "CfcR1" پیوسته با ژن‌های کنترل کننده دو صفت قطر طبق و قطر ساقه از اجزای مهم عملکرد، بعد از تأیید و اعتبارسنجی به ترتیب می‌تواند برای گزینش ژنوتیپ‌های مطلوب در شرایط معمولی و محدودیت آبیاری استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون، تنش خشکی، تجزیه ارتباط

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۹۷۳۴۴۵۸، پست الکترونیکی: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

مقدمه

آن را برای مصارف غیر تغذیه‌ای مانند تهیه رنگ و پلاستیک‌های زیستی (Bioplastics) به عنوان گزینه‌ای مطلوب مطرح می‌نماید. سطح زیرکشت و عملکرد جهانی آفتابگردان با روند رو به رشدی همراه است؛ بطوری که سطح زیر کشت آن از ۲۵ میلیون هکتار با عملکرد سالیانه ۳۶/۶ میلیون تن در سال ۲۰۱۲ به ۲۶/۵ میلیون هکتار با عملکرد سالیانه ۴۷/۹ میلیون تن در سال ۲۰۱۷ رسیده است. در ایران سطح زیرکشت آفتابگردان از ۷۰ هزار هکتار با میزان تولید دانه ۷۸ هزار تن در سال ۲۰۱۲ به

دانه‌های روغنی از عمده‌ترین منابع تأمین کننده انرژی و پروتئین در جوامع بشری هستند. در این بین دانه آفتابگردان (*Helianthus annuus L.*) با داشتن ۲۶ تا ۵۰ درصد روغن با کیفیت عالی و ۱۵ تا ۲۱ درصد پروتئین نقش بسزایی در تغذیه جهانی داشته (۳۱) و پنجمین محصول روغنی مهم جهان بعد از سویا، کلزا، پنبه دانه و بادام‌زمینی (۴۴) بشمار می‌رود، که بیش از ۵۰ درصد روغن رومیزی (Tableoil) (consumption) جهان را فراهم می‌کند (۲۰). علاوه بر این، تجزیه‌پذیری زیستی (Biodegradability) بالای روغن آن،

روش‌های متداول مطالعه با نشانگرهای مولکولی DNA می‌توان به پلی‌مورفیسم طولی قطعات حاصل از برش (RFLP) (Restriction fragment length polymorphism)، پلی‌مورفیسم طولی قطعات تکثیر شده (AFLP) (Amplified fragment length polymorphism)، تکرار توالی ساده (SSR)، چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) (Single nucleotide polymorphism)، نشانگرهای مبتنی بر فناوری آرایه (DArT) (Diversity arrays technology) (۲۷) و نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها اشاره کرد. هر یک از تکنیک‌های فوق دارای مزایا و معایب خاص خود هستند. رتروترانسپوزون‌ها بیشترین عناصر ژنتیکی متحرک حاضر در ژنوم یوکاریوت‌ها بوده که در سراسر ژنوم گسترده شده و هزاران نسخه از بعضی خانواده‌های آن‌ها مشاهده شده است (۲۸). رتروترانسپوزون‌ها در اندازه، ساختار و تنوع ژنوم مشارکت دارند؛ بعلاوه بطور گسترده-ای عملکرد ژن‌ها را تحت تأثیر قرار داده و درصد بالایی از ژنوم را پوشش می‌دهند (۲۱). از نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها می‌توان به نشانگر IRAP (Inter retrotransposon amplified polymorphism) اشاره کرد که توسط Klender و همکاران توسعه داده شده است (۲۹). تعیین تعداد و نوع عمل ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی از قبیل عملکرد و صفات کیفی گام اساسی در به‌نژادی گیاهان است. نشانگرهای مولکولی یکی از ابزارهای متداول و مطرح در زمینه نقشه‌یابی ژن‌ها می‌باشند. امروزه از نشانگرهای ژنتیکی برای شناسایی ژن‌ها در محصولات عمده از جمله ذرت (۹) و سیب‌زمینی (۴۶) به وفور استفاده می‌شود. اهمیت استفاده از نشانگرها در گزینش و ارزیابی تنوع ژنتیکی در آفتابگردان نیز در مطالعات مختلف نشان داده شده است. به عنوان نمونه Friedt و Dehmer در بررسی خود موفق به شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با درصد اسید اولئیک بالا در آفتابگردان شدند و بیان کردند که دو آغازگر (AC10-765, F15-690) و (OP-AC10, OP-) (F15) در ارقام با درصد اسید اولئیک متفاوت نوارهای

سطح زیرکشت ۴۰۰۰۰ هزار هکتار با میزان تولید دانه ۴۰۰۰۰ هزار تن در سال ۲۰۱۷ رسیده است (۱۷ و ۱۸). مصرف سالیانه روغن در ایران حدود ۹۰۰ هزار تن می‌باشد، که ۹۰ درصد آن از طریق واردات تأمین می‌شود (۵). این امر بر اهمیت مطالعه و گزینش ارقام آفتابگردان روغنی سازگار به تنش‌ها بخصوص خشکی تأکید می‌نماید. تنش خشکی در گیاه با توسعه کمبود آب در بافت‌های گیاهی همراه است که سبب عدم ایجاد و حفظ تورژانس کامل و به تبع آن بسته شدن روزنه‌ها و وقفه در فتوسنتز می‌شود. در نتیجه این نارسایی‌ها؛ رشد، توسعه و عملکرد گیاه تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۴۷). ایران در زمره مناطق خشک جهان طبقه‌بندی می‌شود. بنابراین عملکرد محصولات زراعی بخصوص آفتابگردان که نیمه متحمل به خشکی است در چنین شرایطی تحت تأثیر قرار می‌گیرد؛ البته تأثیرپذیری عملکرد آفتابگردان بستگی به ژنوتیپ رقم مورد کشت (۲۳) و مرحله‌ی رشدی که گیاه با تنش مواجه می‌شود، دارد. تنش خشکی سبب کاهش تعداد برگ، قطر طبق، سطح برگ، وزن هزار دانه، عملکرد دانه، محتوای نسبی آب برگ (RWC)، پتانسیل آب برگ (LWP) و عملکرد مطلوب کوانتوم در آفتابگردان می‌شود (۲۳). در مقابل از پاسخ‌های سازگاری آفتابگردان در برابر تنش خشکی می‌توان به افزایش طول ریشه، نسبت ریشه به شاخه و کاهش طول ریشه‌های جانبی، پیری زودرس برگ‌ها اشاره کرد (۴۱). جمع‌آوری و حفاظت منابع ژنتیکی و مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام گیاهی جدید با عملکرد بالاتر، کیفیت بهتر، سازگار و کارآمد در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده یکی از مأموریت‌های اساسی متخصصین ژنتیک و به‌نژادی گیاهی است. روش‌های بررسی تنوع عمدتاً در دو گروه "کلاسیک" از قبیل بررسی توسط صفات مورفولوژیک و "مولکولی" مانند بررسی‌های آیزوایمی، سیتولوژیکی و استفاده از نشانگرهای DNA طبقه‌بندی می‌شوند. معرفی نشانگرهای ژنتیکی خصوصاً DNA بی‌شک از پیشرفت‌های مهم مطالعات ژنتیک گیاهی هست (۳۰). از

با توجه به قرارگرفتن کشور در منطقه خشک و نیمه‌خشک جهان و تأمین بخش زیادی از روغن خوراکی از طریق واردات، اهمیت تولید و توسعه ارقام متحمل به خشکی خصوصاً در گیاهان دانه روغنی مانند آفتابگردان که روغنی با ارزش غذایی بالا و با کیفیت تولید می‌کند بیش از پیش آشکار است. خوشبختانه تولید آفتابگردان در ایران روند رو به رشدی داشته و ارزش تولید ناخالص آن از ۲۲۸۴۳۴۵۳۸۴ تومان در سال ۲۰۱۲ به ۲۸۷۷۵۵۷۱۳۳ تومان در سال ۲۰۱۹ رسیده است. این پژوهش در راستای شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مرتبط با عملکرد و درصد روغن در شرایط آبیاری محدود انجام گرفت. شناسایی چنین نشانگرهایی کمک شایانی به اصلاح ارقام متحمل به تنش خشکی با عملکرد بالا در آفتابگردان خواهد کرد. اغلب ژنوتیپ‌های بررسی شده در این تحقیق در شرایط تنش شوری (۴)، تنش کمبود فسفر (۴۰) و بیماری اسکروتینیا (۳۶) نیز بررسی شده‌اند. نتایج تحقیقات گذشته به‌مراه تحقیق حاضر کمک شایانی به گزینش و معرفی ژنوتیپ‌های مطلوب و مقاوم به تنش‌های مختلف خواهد نمود.

مواد و روشها

مواد گیاهی و ارزیابی فنوتیپی: در این مطالعه ۱۰۰ ژنوتیپ تهیه شده از مراکز مختلف تحقیقاتی آفتابگردان در جهان (جدول ۱) در قالب طرح لاتیس ساده ۱۰×۱۰ با دو تکرار در ۱۰ بلوک ناقص و هر بلوک شامل ۱۰ کرت زراعی در هر یک از شرایط آبیاری معمولی و محدود طی دو سال در روستای قزلجه (۳۸ درجه ۱۱ دقیقه ۵۰ ثانیه شمالی، ۴۴ درجه ۴۵ دقیقه و ۵۵ ثانیه شرقی) از توابع شهر سلماس، آذربایجان غربی کشت شدند. در هر سال تا مرحله ۸ برگی آبیاری هر ۲ آزمایش بصورت معمولی (۹۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A) انجام گرفت. آبیاری آزمایش آبیاری معمولی تا انتهای فصل رشد به‌مین صورت ادامه یافت. در آزمایش آبیاری محدود از مرحله ۸ برگی به بعد

متمایز نشان می‌دهند (۱۳). شناسایی نشانگرهای مرتبط با خشکی با توجه به شرایط جوی و گرم شدن زمین دارای اهمیت بالقوه بوده و نوید بخش بهبود بازده انتخاب در برنامه‌های به‌نژادی و گزینه‌ای کلیدی جهت توسعه ارقام با مقاومت پایدار به تنش خشکی است (۳۷). در این راستا در گیاهان مختلف بخصوص گیاهان روغنی اقدام به شناسایی QTLs مرتبط با تنش خشکی شده است. به عنوان نمونه در سویا ۶۵ QTL مرتبط با مقاومت به تنش خشکی معرفی شده است (۴۲). همچنین نشانگرهای IRAP-4361 و IRAP-4377 با بیشترین رابطه منفی و نشانگرهای iPBS-2399، IRAP-4341 و IRAP-4368 با بیشترین رابطه مثبت با تحمل خشکی در سویا شناسایی و معرفی شده‌اند (۳۴). در بررسی دیگر تعداد ۵۵ QTL مرتبط با محتوای روغن دانه، عملکرد دانه، پروتئین دانه، وزن هزار دانه و ارتفاع بوته در سویا تحت تنش خشکی شناسایی گردیده است (۱۵). در آفتابگردان با استفاده از نشانگرهای ISSR ۱۶ نشانگر مرتبط با قطر ساقه، ۴ نشانگر مرتبط با تعداد برگ، ۱۲ نشانگر مرتبط با قطر طبق، ۲۷ نشانگر مرتبط با تعداد روز تا گلدهی و ۱۷ نشانگر مرتبط با تعداد روز تا رسیدگی معرفی شدند (۱۰). در بسیاری از مطالعات کارایی فتوستنز تحت شرایط تنش خشکی ارزیابی و QTLs مرتبط با پارامترهای فلورسانس کلروفیل، محتوای کلروفیل و فعالیت فیتوشیمیایی PSII شناسایی شدند (۳۵). در جمعیت‌های یونجه زراعی با استفاده از نشانگرهای ISSR، ۷ نشانگر مرتبط با کلروفیل شناسایی شدند که ۸۲ درصد از تغییرات این صفت را تبیین می‌کردند (۲). در برنج نیز QTL qCHLa1.1 واقع بر روی گروه پیوستگی I برنج به عنوان یک QTL جدید برای شرایط تنش خشکی معرفی شده است (۷). محتوای نسبی آب برگ بعنوان یک نشانگر فیزیولوژیکی و یکی از معیارهای شاخص و معتبر در ارزیابی مقاومت به تنش خشکی بوده (۴۰) و متأثر از خشکی محیط است (۲۳). در آفتابگردان ۱۷ نشانگر ISSR مرتبط با محتوای نسبی آب برگ گزارش شده است (۱۰).

میکرولیتر، حاوی ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر (500 mM KCl, 500 mM Tris-HCl pH 8.4)، ۰/۷ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار (MgCl₂ 50 mM) (شرکت سیناژن)، ۰/۲۵ میلی‌مول از هر داکسی‌ریبونوکلوئوتید (dNTP)، ۱/۱ واحد آنزیم تک پلی‌مراز (شرکت سیناژن) و ۱۰ میکرولیتر از هر آغازگر به همراه آب دیونیزه در دستگاه ترمال‌سایکلر انجام گرفت. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) بصورت: ۴ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۳۶ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد (جهت واسرشت‌سازی)، ۴۰ ثانیه در ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (جهت اتصال اختصاصی) و ۷۲ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (جهت بسط) و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۰ دقیقه بود. آشکارسازی باندهای تکثیری با استفاده از ژل ۱/۸ درصدی و بافر TBE ۰/۵ برابر با ولتاژ ۷۵ ولت بمدت ۳ ساعت انجام و رنگ-آمیزی با اتیدیوم بروماید (1.0 mg ml⁻¹) انجام گرفت. برای تعیین اندازه‌ی باندها نیز از نشانگر اندازه‌ی O'GeneRuler™ (شرکت فرمنتاز) استفاده شد.

آبیاری بعد از ۱۸۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A انجام گرفت. بعد از گلدهی و پس از برداشت دانه صفات مختلف مورفولوژیکی-زراعی شامل ارتفاع بوته (سانتی-متر)، قطر ساقه (سانتی‌متر)، تعداد برگ، طول پهنک برگ (سانتی‌متر)، عرض پهنک برگ (سانتی‌متر)، طول دم‌برگ (سانتی‌متر)، قطر طبق (میلی‌متر)، تعداد روز تا گلدهی (روز) و تعداد روز تا رسیدگی (روز)، محتوای روغن دانه (گرم)، کلروفیل، محتوای نسبی آب برگ (درصد)، عملکرد تک بوته (گرم) اندازه‌گیری شدند.

ارزیابی مولکولی: در راستای ارزیابی مولکولی، DNA مربوط به ۷۸ لاین از ۱۰۰ لاین مورد بررسی (جدول ۱) بروش CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) (۱۴) از بافت تازه برگ‌گی استخراج شد و جهت ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، بترتیب از الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد و اسپکتروفتومتری استفاده شد. برای تهیه پروفایل مولکولی لاین‌های مورد مطالعه از ۷ آغازگر مبتنی بر رتروترانسپوزون IRAP (جدول ۲) شامل آغازگرهای (LTR 1061, LTR 1062, LTR 1063, LTR 1064, LTR 1065,) های PCR (Polymerase chain reaction) در حجم نهایی ۲۰

جدول ۱- کد شناسه و منشأ ۱۰۰ لاین آفتابگردان دانه روغنی مورد بررسی در آزمایش تنش خشکی

کد	نام لاین	نام کشور	کد	نام لاین	نام کشور	کد	نام لاین	نام کشور
۱	H100A/83HR4	فرانسه	۳۵	H603R	فرانسه	۶۹	H156A/RHA274	فرانسه
۲	H209A/LC1064	فرانسه	۳۶	4	ایران	۷۰	SDB1	آمریکا
۳	H205A/H543R	فرانسه	۳۷	703-CHLORINA	فرانسه	۷۱	HAR-4	آمریکا
۴	AS5306	فرانسه	۳۸	NSF ₁ -A ₄ *R ₅	فرانسه	۷۲	AS5305	فرانسه
۵	RHA858	آمریکا	۳۹	28	ایران	۷۳	RHA274	آمریکا
۶	H209A/83HR4	فرانسه	۴۰	30	ایران	۷۴	H158A/H543R	فرانسه
۷	AS3211	فرانسه	۴۱	F1250/03	مجارستان	۷۵	H100A/RHA274	فرانسه
۸	254-ENSAT	فرانسه	۴۲	SDR18	آمریکا	۷۶	H209A/H566R	فرانسه
۹	AS5304	فرانسه	۴۳	LP-SCYB	فرانسه	۷۷	ASO-1-POP-A	فرانسه
۱۰	1009329.2(100K)	فرانسه	۴۴	803-1	صربستان	۷۸	AS6305	فرانسه
۱۱	270-ENSAT	فرانسه	۴۵	1009370-1(100K)	فرانسه	۷۹	B-FIPOP	فرانسه
۱۲	AS613	فرانسه	۴۶	CSWW2S	فرانسه	۸۰	D34	آمریکا
۱۳	A-FLPOPA	فرانسه	۴۷	1009370-3(100K)	فرانسه	۸۱	CAY	فرانسه
۱۴	OES	فرانسه	۴۸	H158A/H543R	فرانسه	۸۲	346	ایران
۱۵	H100A/LC1064	فرانسه	۴۹	H100A	فرانسه	۸۳	NS-F ₁ -A ₅ *R ₅	فرانسه

ایران	36	۸۴	فرانسه	15031	۵۰	آمریکا	RHA266	۱۶
ایران	38	۸۵	فرانسه	H250A/83HR4	۵۱	فرانسه	PAC2	۱۷
فرانسه	SDB2	۸۶	آمریکا	RHA265	۵۲	فرانسه	H157/LC1064	۱۸
	H158A/LC1064	۸۷		PM1-3	۵۳	فرانسه	5DES20QR	۱۹
فرانسه	H156A/H543R	۸۸	فرانسه	RT948	۵۴	فرانسه	15038	۲۰
فرانسه	H543R/H543R	۸۹		283-ENSAT	۵۵	فرانسه	1009337(100K)	۲۱
فرانسه	H543R	۹۰		QHP-1	۵۶	فرانسه	AS3232	۲۲
فرانسه	SF076	۹۱	آمریکا	SDR19	۵۷		12AASB3	۲۳
	B-FIPOPB	۹۲	آمریکا	HA337B	۵۸		8ASB2	۲۴
فرانسه	SF085	۹۳	فرانسه	H100B	۵۹		9CSA3	۲۵
	SF092	۹۴	مجارش	B454/03	۶۰		H049+FSB	۲۶
			تان					
	A-CONTROLPLASTIPIC	۹۵	آمریکا	HA304	۶۱		SSD-580	۲۷
ایران	59-1	۹۶	فرانسه	RT931	۶۲	فرانسه	5AS-F1/A2*R5AS-29- F1/A2*R2	۲۸
فرانسه	H-100A-90RL8	۹۷	آمریکا	HA335B	۶۳	فرانسه	7CRI=PRH6	۲۹
	SF109	۹۸	فرانسه	NS_B5	۶۴	فرانسه	ENSAT699	۳۰
فرانسه	SF105	۹۹	آمریکا	SDB3	۶۵	فرانسه	SSD-581	۳۱
	SF-023	۱۰۰	فرانسه	LC1064C	۶۶	فرانسه	TMB-51	۳۲
			فرانسه	NS-R5	۶۷	ایران	11*12	۳۳
			آمریکا	DM-2	۶۸	ایران	110	۳۴

جدول ۲- توالی آغازگرهای IRAP مورد استفاده در تهیه پروفیل مولکولی ژنوتیپ‌های آفتابگردان دانه روغنی

آغازگر	توالی (5'→3')	آغازگر	توالی (5'→3')
1061 LTR	GAGGGGAATGTGGGGGTTCC	CF	GGTTTAGGTTTCGTAATCCTCCGCG
1062 LTR	TCTCTATTTATAGCCGGAGAGGTG	CR	ACAGACACCAGTGGCACCAAC
1063 LTR	GATCCGGTTTCACGGGACTTAC	UF(U81)	TAACGGTGTTCGTTTTGCAGG
1064 LTR	CGAAGAACAACCGAATCAC	UR1(U82)	AGAGGGGAATGTGGGGGTTCC
1065 LTR	AGCCTCTGAAAGACTCGTTCG		

بار Burn-in (دوره گرم کردن) و ۱۰۰۰۰ بار تکرار MCMC (Markov chain monte carlo) جهت حصول منحنی حداکثر درست‌نمایی استفاده شد. مقادیر زیرجمعیت فرضی اولیه (K) بین ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت، ۵ تکرار برای هر K در نظر گرفته شد و در نهایت تعداد زیرجمعیت‌های احتمالی (K بهینه) براساس روش (ΔK) delta K تعیین شد (۱۶). برای K بهینه یک ماتریس که شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هریک از زیرجمعیت‌هاست (ماتریس Qst) محاسبه شد. جهت شناسایی نشانگرهای دارای ارتباط معنی‌دار با صفات مورد ارزیابی، از مدل خطی مخلوط (MLM) وابسته به $Q +$

تجزیه‌های آماری: گروه‌بندی لاین‌ها براساس داده‌های مولکولی با الگوریتم Neighbor Joining (۴۳) در نرم‌افزار DARWin 6.0.21 انجام شد. اتصال همسایه (Neighbor Joining) در مقایسه با روش‌هایی مانند UPGMA که خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی تجمعی مبتنی بر روش پیوند متوسط هستند؛ یک روش خوشه‌بندی تکراری براساس معیار حداقل تکامل است. جهت برآورد تنوع بین و درون گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای، تجزیه واریانس مولکولی در نرم‌افزار GenAlix انجام گرفت. تجزیه ساختار جمعیت بروش بیزین با استفاده از نرم‌افزار Structure 2.3.3 انجام گرفت. از مدل Admixture با ۱۰۰۰۰

در مطالعه انجام شده بر روی ۴۷ رقم لوبیا صفات مورفولوژیکی ساقه مانند ارتفاع، قطر و محتوی رطوبت ساقه بعد از سه هفته اعمال تنش خشکی و شوری، ارتباط ضعیفی با تنش خشکی نشان دادند (۶). همچنین Darbani و همکاران (۱۰) بیان داشتند که قطر طبق تحت تأثیر خشکی قرار نمی‌گیرد. این اختلاف در گزارش‌ها می‌تواند ناشی از نحوه و مرحله و طول مدت اعمال تنش باشد. کاهش تعداد و سطح برگ تحت تنش خشکی قبلاً نیز گزارش شده است (۸). بیشترین ضریب تغییرات در شرایط آبیاری معمولی در صفات عملکرد، قطر طبق، عرض برگ، طول دم‌برگ، تعداد برگ و قطر ساقه و در شرایط آبیاری محدود در صفات عملکرد، عرض برگ، قطر طبق، تعداد برگ و قطر ساقه مشاهده شد. در مقایسه دو شرایط، پنج صفت عملکرد، قطر طبق، عرض برگ، قطر ساقه و تعداد برگ تحت هر دو شرایط بیشترین ضریب تغییرات را نشان دادند. در مقابل چهار صفت کلروفیل، روز تا گلدهی، روز تا رسیدگی و درصد روغن کمترین ضریب تغییرات را در هر دو شرایط داشتند؛ که احتمالاً نشان می‌دهد صفات اخیر بشدت تحت کنترل ژنتیک بوده و از وراثت‌پذیری بالایی برخوردار می‌باشند. هم راستا با نتایج بدست آمده برای صفت عملکرد وجود تنوع بالا تحت هر دو شرایط نرمال و خشکی در آفتابگردان قبلاً نیز گزارش شده است (۱۹). جمع‌بندی نتایج نشان می‌دهد در تمام صفات مورد مطالعه بغیر از صفت تعداد برگ، بیشترین مقادیر ضریب تغییرات صفات تحت شرایط آبیاری معمولی مشاهده شد. در رابطه با صفت تعداد برگ ضریب تغییرات تحت شرایط آبیاری معمولی برابر ۲۲/۹ در مقابل ۳۳/۳ تحت شرایط آبیاری محدود بود. در توجیه این امر می‌توان بیان کرد که کاهش سطح برگ یک مکانیزم دفاعی در جهت کاهش سطح تعرق است؛ این امر با کاهش ابعاد برگ و گاه با تغییر تعداد برگ حاصل می‌شود و در این بین، ژنوتیپ‌ها واکنش متفاوتی بروز می‌دهند.

K (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت + ماتریس روابط خویشاوندی) در نرم‌افزار TASSEL 3.1 استفاده شد. از نرم‌افزار TASSEL 3.1 همچنین برای محاسبه میزان عدم تعادل پیوستگی (LD) استفاده شد (۵۳ و ۵۴).

نتایج و بحث

ارزیابی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت: نتایج آماره‌های توصیفی شامل میانگین، انحراف معیار، ضریب تغییرات، حداقل و حداکثر مقادیر صفات تحت شرایط آبیاری معمولی و محدود در جدول ۳ خلاصه شده است. نتایج حاکی از کاهش میانگین همه صفات مورد ارزیابی بجز کلروفیل تحت شرایط آبیاری محدود در مقایسه با شرایط آبیاری معمولی می‌باشد. میانگین کلروفیل تحت شرایط آبیاری محدود ۴۰/۴۳۹۶ در مقایسه با ۳۸/۳۷۷ در شرایط آبیاری معمولی بود. بیشترین کاهش میانگین تحت شرایط آبیاری محدود در مقایسه با شرایط آبیاری نرمال در عملکرد دانه مشاهده شد. بعد از عملکرد دو صفت ارتفاع بوته و محتوای نسبی آب برگ بیشترین کاهش میانگین را تحت شرایط آبیاری محدود نسبت به شرایط معمولی نشان دادند (جدول ۳). این صفات جزو صفات کمی با وراثت پیچیده هستند. از خصوصیات بارز صفات مذکور این است که بیشتر تحت تأثیر محیط و اثر متقابل ژنوتیپ در محیط قرار می‌گیرند. کاهش ارتفاع بوته یکی از پاسخ‌های گیاه به تنش خشکی در طی مرحله رویشی می‌باشد. قطر طبق به‌مراه صفت ارتفاع بوته بعنوان بهترین و مناسب‌ترین صفات مورفولوژیکی جهت گزینش ژنوتیپ‌های مناسب آفتابگردان تحت تنش شوری معرفی شده‌اند (۲۲). همچنین براساس گزارشی (۱۲) ارتباط مستقیم بین صفت قطر طبق با عملکرد در آفتابگردان وجود دارد و این صفت بعنوان اثر گذارترین صفت معرفی شده است. این یافته‌ها بر اهمیت شناسایی QTLs مرتبط با صفات فوق بجهت استفاده در برنامه‌های اصلاح آفتابگردان تأکید می‌کنند. البته این مورد در تمام گیاهان مشاهده نشده است. بعنوان نمونه

جدول ۳- آمارهای توصیفی صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های آفتابگردان دانه روغنی

صفات	آبجاری معمولی				آبجاری محدود				
	میانگین	کمترین	بیشترین	انحراف	ضریب تغییرات	میانگین	کمترین	بیشترین	انحراف
				معیار	معیار	معیار	معیار	معیار	ضریب تغییرات
				وارianس (درصد)	وارianس (درصد)	وارianس (درصد)	وارianس (درصد)	وارianس (درصد)	وارianس (درصد)
کلروفیل	۳۸/۶۷۷	۲۸/۴۰	۵۸/۵۰	۴/۰۸۹	۱۰/۶	۴۰/۴۳۹۶	۲۷/۸۵	۴۹/۹۵	۳/۸۲۳
روز تا گلدهی	۷۴/۳۳۶	۶۱/۵۰	۹۵/۵۰	۴/۵۸۴	۶/۲	۶۹/۴۰۰	۵۷	۸۴/۵۰	۴/۳۰۹
روز تا رسیدگی	۱۰۷/۱۴۸	۸۲/۲۵	۱۳۳	۵/۴۱۰	۵/۴	۱۰۲/۲۹۰	۵۴/۲۵	۱۳۱	۶/۱۴۱
قطر طبق	۱۳/۲۳۶	۷/۲۵	۲۲/۳۳	۳/۳۷۰	۲۵/۵	۱۰/۵۸۵	۵/۲۵	۱۷/۳۴	۲/۴۷۶
طول برگ	۱۶/۶۸۶	۱۰	۲۴/۰۵	۳/۰۸۱	۱۸/۹	۱۳/۰۹۰	۸/۲۵	۲۳/۰۵	۲/۴۹۹
تعداد برگ	۱۷/۱۸۱	۸/۱۰	۲۸/۳۰	۳/۸۳۲	۲۲/۹	۱۶/۳۶۶	۷	۳۶/۶۰	۴/۹۴۶
عرض برگ	۱۴/۳۵۳	۷/۹۵	۲۶/۷۵	۳/۸۳۱	۲۴	۱۱/۵۲۳	۶/۹۰	۲۲	۲/۴۸۷
درصد روغن	۴۷/۰۹۹	۳۷/۵۹	۵۵/۵۸	۳/۹۶۷	۸/۴	۴۵/۵۵۹	۳۶/۰۹	۵۳/۳۱	۴/۲۰۵
ارتفاع بوته	۱۰۸/۶۷۶	۶۹/۷۰	۱۶۴/۹۰	۱۹/۱۷۸	۱۷/۷	۱۰۰/۵۲۱	۵۴/۸۰	۱۴۴/۸۰	۱۸/۱۷۶
طول دمبرگ	۹/۲۶۴	۴/۵۰	۱۶/۶۵	۲/۲۲۴	۲۴/۳	۶/۰۵۸۶	۳/۶۵	۱۱/۶۰	۱/۱۶۷
محتوای نسبی آب برگ	۷۰/۹۰۱۹	۴۷/۷۴	۹۶/۸۱	۸/۷۲۹	۱۲/۳	۶۲/۴۵۲	۴۱	۸۶/۱۷	۸/۳۴۹
قطر ساقه	۴/۸۴۴	۲/۶۵	۹/۷۰	۱/۱۲۲	۲۳/۴	۴/۱۴۵	۲/۵۰	۶/۷۰	۰/۸۴۱
عملکرد	۴۱/۶۰۸	۳/۷۵	۱۳۹/۸۹	۲۳/۰۶۲	۵۸/۸	۲۲/۵۰۴	۳/۷۵	۶۷/۸۶	۱۱/۷۹۱

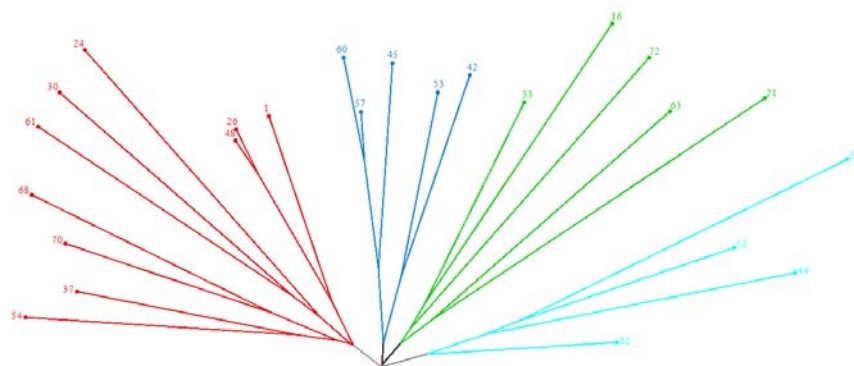
روابط خویشاوندی بالا بین آنها است. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد ۸۹ درصد از تغییرات به درون گروه و ۱۱ درصد به بین گروه‌ها مربوط است (جدول ۴). سهم کم از تنوع کل برای منبع "بین گروه‌ها" به احتمال زیاد به دلیل تبادلات منابع ژرم‌پلاسم مشترک بین مراکز تحقیقاتی مختلف باشد. سهم زیاد از تنوع کل برای منبع "درون گروه‌ها" به احتمال زیاد بدلیل تفاوت در طبقه و روش استفاده از منابع ژرم‌پلاسم مشترک در راستای توسعه لاین-های خالص است بطوری که منجر به ایجاد ترکیبات متنوع در داخل گروه‌ها (مراکز) شده است. نتایج تجزیه واریانس حاکی از تنوع ژنتیکی بالا در درون گروه‌ها می‌باشد. مشاهده واریانس درون گروهی بالا با استفاده از نشانگر RFLP (۲۴) و SSR (۵۱) هم راستا با نتایج مطالعه حاضر است. مقدار PhiPT برابر ۰/۱۱۲۶۲ برآورد شد که بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است و تأییدی بر عدم تفکیک ژنوتیپ‌ها در تجزیه بردار اصلی است. همچنین مقادیر میانگین مربعات درون هر گروه، درصد چندشکلی،

میانگین سه آماره‌ی ضریب تنوع ژنتیکی، شاخص شانون و چندشکلی برای نشانگرهای مورد مطالعه بترتیب ۰/۳۱، ۰/۴۵۹ و ۸۴/۹۶ درصد برآورد گردید. بر این اساس نشانگر UF14 بترتیب با دارا بودن مقادیر ۰/۴۹۴ و ۰/۶۸۷ و نشانگر ۶۲۱ با مقادیر ۰/۰۱۷ و ۰/۰۳۹ از لحاظ آماره‌های ضریب تنوع ژنتیکی و شاخص شانون بترتیب بالاترین و پایین‌ترین میزان تنوع را به خود اختصاص دادند. بر پایه نتایج تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار DARwin ژنوتیپ‌ها در ۴ گروه گروه‌بندی شدند (شکل ۱). هر گروه شامل ژنوتیپ-هایی از مناطق جغرافیای متفاوت بود. نتایج تجزیه به بردارهای اصلی نشان داد سه مؤلفه اول، دوم و سوم به ترتیب ۳۴/۴۰، ۱۸/۵۰ و ۱۴/۵۴ درصد و در مجموع ۶۷/۴۵ درصد از کل تغییرات را تبیین می‌کنند که نشان از پوشش مناسب ژنوم توسط نشانگرها می‌باشد (شکل ۲). تجزیه بردار اصلی نیز قادر به تفکیک کامل ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مجزا نگردید. این امر نشان از وجود اجداد مشترک در مسیر تکامل ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی و وجود

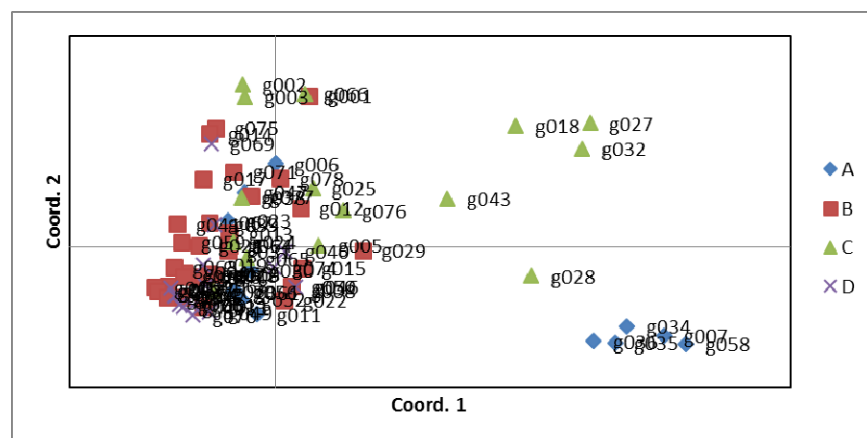
در این گیاه است (۳۲). البته گزارشی از وسیع بودن پایه ژنتیکی آفتابگردان نیز ارائه شده است (۵۱). نتایج تجزیه واریانس مؤید نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه بردار اصلی است.

عدم تعادل پیوستگی (LD): برطبق نتایج حاصل از تجزیه ساختار ژنتیکی، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ۲ زیرجمعیت احتمالی ($K=2$) قرار گرفتند و $K=2$ بعنوان K بهینه در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس سهم عضویت افراد در هر خوشه (ماتریس Q) در نظر گرفته شد.

شاخص شانون و ضریب تنوع هر یک از گروه‌ها بترتیب (۳۰/۷۱۹، ۸۵/۱۶، ۰/۴۶۱، ۰/۳۱۱) برای گروه اول، (۲۴/۵۱۵۱، ۸۹/۰۶، ۰/۴۸۵، ۰/۳۲۶) برای گروه دوم، (۳۱/۰۷۶، ۸۳/۰۵۹، ۰/۴۳۴، ۰/۲۹۰) برای گروه سوم و (۲۲/۸۵۰، ۸۲/۰۳، ۰/۴۵۸، ۰/۳۱۱) برای گروه چهارم برآورد شد. در بررسی تنوع ژنتیکی بین برخی از جمعیت‌های گیاه خار مریم تنوع درون گروه ۸۹ درصدی و بین گروهی ۱۱ درصدی گزارش شده است (۵۲). نتایج حاصل از مطالعات بررسی تنوع با نشانگرهای متعدد بر روی ژنوتیپ‌های آفتابگردان حاکی از باریک بودن پایه ژنتیکی



شکل ۱- دندروگرام ژنوتیپ‌های مختلف آفتابگردان دانه روغنی مورد مطالعه به روش Neighbor Joining براساس ۷ ترکیب آغازگری IRAP



شکل ۲- نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌های آفتابگردان دانه روغنی براساس دو بردار حاصل از تجزیه بردار اصلی روی داده‌های نشانگر IRAP

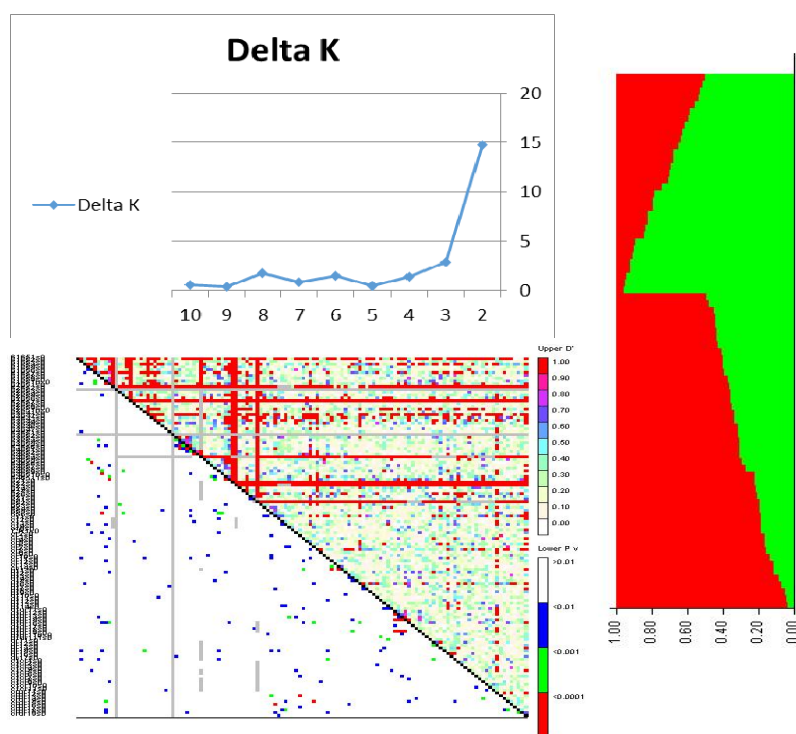
جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس مولکولی بین و درون گروهی
ژنوتیپ‌های آفتابگردان دانه روغنی مورد مطالعه

منبع تغییرات	میانگین مربعات	برآورد واریانس	درصد واریانس
بین گروه	۸۸/۴۹	۳/۳۶۰	٪ ۱۱
درون گروه	۲۶/۴۷۱	۲۶/۴۷۱	٪ ۸۹

نتایج تجزیه خوشه‌ای و تجزیه ساختار با هم مطابقت کامل ندارند که این عدم تطابق را می‌توان به عملکرد متفاوت تجزیه خوشه‌ای سلسله مراتبی و تجزیه ساختار جمعیت بر اساس مدل بی‌زین مرتبط دانست (۱۱).

تجزیه ارتباط نشانگر-صفات: استفاده از نشانگرهای مولکولی اهمیت زیادی در تسهیل برنامه‌های اصلاح آفتابگردان دارند. در معرفی نشانگر برای صفات مهم اقتصادی چون عملکرد و روغن از تجزیه پیوستگی و تجزیه ارتباط استفاده می‌شود، که هر دو بر پایه عدم تعادل پیوستگی‌اند. در مقایسه، تجزیه ارتباط از مزایایی همچون افزایش وضوح تجزیه QTL و افزایش پوشش آلی (۵۰) برخوردار است. شناسایی و استفاده از نشانگرهای مرتبط با تنش در برنامه اصلاحی مطلوب‌تر هستند (۱). برای تجزیه ارتباط معمولاً از دو مدل خطی عمومی (GLM) و مدل خطی مخلوط (MLM) استفاده می‌شود (۲۵).

بر پایه نتایج بارپلات حاصل (شکل ۳)، با احتمال بیشتر از ۷۰ درصد، ۲۲ فرد متعلق به زیر ساختار اول (قرمز) و ۱۸ فرد متعلق به زیر ساختار دوم (سبز) بودند. بنابراین در مجموع ۵۱/۲۸ درصد افراد مورد مطالعه دارای درصد عضویت بیشتر و مساوی ۰/۷ و ۴۸/۷۱ درصد افراد دارای سهم عضویت کمتر از ۰/۷ می‌باشند که گروه اخیر بعنوان ژنوتیپ‌های مخلوط در نظر گرفته می‌شوند.



شکل ۳- الف- بررسی تغییرات Delta K. ب- تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر مدل Bayesian برای ۷۸ ژنوتیپ آفتابگردان مورد مطالعه بر اساس ۱۲۸ نشانگر IRAP (K=۲). ج- بار پلات عدم تعادل پیوستگی ایجاد شده با نرم‌افزار TASSEL؛ قسمت بالا قطر نشان دهنده میزان عدم تعادل پیوستگی بر اساس آماره D' و پایین قطر نشان دهنده P-value می‌باشد.

(طول برگ، عرض برگ، ارتفاع بوته و عملکرد) و نشانگر 61655 با ۲ صفت (تعداد برگ و درصد روغن) و در شرایط آبیاری محدود نشانگر CfcCr1 با ۲ صفت (قطر ساقه، قطر طبق) و نشانگر ۶۱۶۵۵ با صفت درصد روغن دانه تحت هر دو شرایط آبیاری ارتباط معنی‌دار در سطح یک درصد نشان دادند. شناسایی چنین نشانگرهای از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد؛ زیرا زمینه لازم برای درک درست از روابط صفات و ارتباطات بین مکان‌های ژنی را میسر و امکان‌پذیر می‌کند (۳). شناسایی نشانگرهایی که تحت شرایط محیطی مختلف ارتباط معنی‌داری با صفت مورد نظر دارند (نشانگرهای پایدار)، از اهمیت و کارایی بالا در برنامه‌های گزینشی برخوردار هستند. انتخاب با این نشانگرها در یک محیط باعث بهبود صفت در محیط‌های دیگر نیز می‌شود، این امر باعث افزایش کارایی انتخاب به کمک نشانگر (MAS) و پیشرفت ژنتیکی می‌شود، بنابراین کاربرد آنها در برنامه اصلاحی سودمند است (۴۵). صفت درصد روغن تحت هر دو شرایط آبیاری محدود و معمولی با نشانگرهای ۶۱۶۵۵ ارتباط نشان داد که حاکی از عدم تأثیرپذیری این صفت از شرایط محیطی است. در این راستا Yao و همکاران (۴۸) در سویای وحشی و زراعی برای صفات محتوا و ترکیب روغن دانه بترتیب ۲۲ و ۶۶ نشانگر شناسایی کردند. در آفتابگردان فقط یک QTL مرتبط با محتوای روغن در یک طیف وسیع منابع ژنتیکی گزارش شده است (۳۳). همچنین در مطالعه دیگر ۱۲ نشانگر با مدل GLM و ۴ نشانگر با مدل MLM با صفت عملکرد روغن ارتباط نشان دادند (۱۰).

باتوجه به یافته‌های تحقیق حاضر در شرایط معمولی صفاتی چون ارتفاع بوته، عرض برگ، طول برگ و روز تا رسیدگی و در شرایط آبیاری محدود صفاتی مانند قطر ساقه و قطر طبق بیشترین ارتباط مؤثر را بر عملکرد داشتند.

باتوجه به نتایج تجزیه ساختار جمعیت و مشاهده رابطه خویشاوندی بالا بین ژنوتیپ‌ها، استفاده از مدل MLM که ماتریس K و روابط خویشاوندی بین افراد جمعیت را مد نظر قرار می‌دهد (۴۹) قابلیت اطمینان و اعتبار نشانگرهای شناسایی شده را افزایش می‌دهد. حذف اثرات ساختار جمعیت و خویشاوندی بین افراد منجر به کاهش ارتباط دروغین بین نشانگر و صفت می‌گردد، در نتیجه احتمال ارتکاب اشتباه نوع اول کاهش می‌یابد (۴۹). در مجموع ۱۲ نشانگر تحت شرایط آبیاری معمولی و ۱۰ نشانگر تحت شرایط آبیاری محدود با صفات مورد مطالعه ارتباط معنی‌دار ($P \geq 0.01$) نشان دادند. در تجزیه ارتباط با استفاده از مدل MLM تحت شرایط آبیاری معمولی ۳ نشانگر (۶۱۶۵۱۰، ۶۴۶۵۱۰، ۶۴۶۵۱۱) برای ارتفاع بوته، با ۱ نشانگر (۶۲۶۵۵) برای قطر ساقه، ۱ نشانگر (۶۱۶۵۵) برای برگ، ۱ نشانگر (۶۱۶۵۱۰) برای طول برگ، ۱ نشانگر (۶۱۶۵۱۰) برای عرض برگ، ۴ نشانگر (۶۴۶۵۸، Cr9، CrUr16 و Uf2) برای تعداد روز تا گلدهی، ۱ نشانگر (۶۴۶۵۳) برای تعداد روز تا رسیدگی، ۲ نشانگر (CfCr11 و CF3) برای RWC، ۱ نشانگر (۶۱۶۵۱۰) برای عملکرد و ۱ نشانگر (۶۱۶۵۵) برای درصد روغن شناسایی شد (جدول ۵).

تحت شرایط آبیاری محدود برای صفت ارتفاع بوته ۲ نشانگر (۶۱۶۵۱ و ۶۴۶۵۱۱)، قطر ساقه ۱ نشانگر (CfCr1)، قطر طبق ۱ نشانگر (CfCr1)، طول دم‌برگ ۱ نشانگر (۶۳۶۴۱)، روز تا گلدهی ۱ نشانگر (Ur13)، روز تا رسیدگی ۱ نشانگر (Cr7)، RWC ۲ نشانگر (۶۵۴ و Uf2)، محتوای کلروفیل ۱ نشانگر (۶۲۶۵۷) و در نهایت درصد روغن ۱ نشانگر (۶۱۶۵۵) شناسایی شد (جدول ۶). پیش‌تر در آفتابگردان وجود ارتباط نشانگرهای متفاوت با صفت تعداد روز تا گلدهی تحت تنش خشکی گزارش شده است (۳۹). برخی نشانگرها با چند صفت ارتباط معنی‌دار نشان دادند. در شرایط آبیاری معمولی نشانگر 616510 با ۴ صفت

جدول ۵- نشانگرهای پیوسته با صفات ارزیابی شده در ژنوتیپ‌های آفتابگردان دانه روغنی مورد مطالعه تحت شرایط آبیاری معمولی براساس مدل

MLM

P-value	نشانگر	صفت	P-value	نشانگر	صفت
-	-	کلروفیل	۰/۰۰۶۶	616510	عرض برگ
۰/۰۰۱۳	64658	روز تا گل‌دهی	۰/۰۰۸۴	61655	درصد روغن دانه
۰/۰۰۳۴	CrUr16		۰/۰۰۰۷	616510	ارتفاع بوته
۰/۰۰۳۸	Uf2		۰/۰۰۶۴	646510	
۰/۰۰۷۸۹	Cr9		۰/۰۰۷۶	646511	
۰/۰۰۵۶	64653	روز تا رسیدگی	-	-	طول دم‌برگ
-	-	قطر طبق	۰/۰۰۲۱	CfCr11	محتوای نسبی آب برگ
۰/۰۰۱۴	616510	طول برگ	۰/۰۰۴۶	CF3	
۰/۰۰۴۰	61655	تعداد برگ	۰/۰۰۵۸	62655	قطر ساقه
			۰/۰۰۵۹	616510	عملکرد

جدول ۶- نشانگرهای پیوسته با صفات ارزیابی شده در ژنوتیپ‌های آفتابگردان دانه روغنی مورد مطالعه تحت شرایط آبیاری محدود براساس مدل

MLM

P-value	نشانگر	صفت	P-value	نشانگر	صفت
۰/۰۰۶	62657	کلروفیل	-	-	عرض برگ
۰/۰۰۲۵	Ur13	روز تا گل‌دهی	۰/۰۰۷۰	61655	درصد روغن دانه
۰/۰۰۲۸	Cr7	روز تا رسیدگی	۰/۰۰۷۷	61651	ارتفاع بوته
			۰/۰۰۹۴	646511	
۰/۰۰۴۰	CfCr1	قطر طبق	۰/۰۰۷۵	63641	طول دم‌برگ
-	-	طول برگ	۰/۰۰۳۰	Uf2	محتوای نسبی آب برگ
-	-	تعداد برگ	۰/۰۰۶۷	654	
			۰/۰۰۵۸	CfCr1	قطر ساقه
			-	-	-

لحاظ صفات مورفولوژیکی-زراعی بررسی شدند. در آزمایشات مولکولی پروفیل مولکولی لاین‌ها با ۷ ترکیب آغازگر IRAP تهیه شد. با ترکیب داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی در قالب مدل خطی مخلوط، نشانگرهای پیوسته با صفات مورفولوژیکی-زراعی شناسایی گردید. نتایج نشان داد که بین ژنوتیپ‌های آفتابگردان دانه روغنی مورد بررسی، از نظر صفات مورد ارزیابی تحت شرایط آبیاری معمولی و محدود همچنین الگوی مولکولی تنوع وجود دارد. براساس مطالعه ساختار جمعیت دو زیر جمعیت احتمالی در پانل ارتباطی شناسایی شد. در تجزیه ارتباط براساس مدل MLM، ۱۲ نشانگر تحت شرایط آبیاری معمولی و ۱۰ نشانگر تحت شرایط آبیاری محدود با

از بین نشانگرهای مرتبط با عملکرد، نشانگر 616510، با صفاتی چون ارتفاع بوته، عرض برگ، طول برگ، ارتباط نشان داد. در توافق با نتایج، وجود ارتباط بین یک نشانگر با چند صفت در جمعیت‌های مختلف آفتابگردان آجیلی تحت شرایط تنش خشکی نیز گزارش شده است (۲۶). بعنوان نمونه نشانگر رتروترنسپوزنی Cr با ۸ صفت در آفتابگردان آجیلی تحت تنش ملایم ارتباط نشان داد (۲۶).

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر ۱۰۰ ژنوتیپ آفتابگردان دانه روغنی در قالب طرح لاتیس ساده ۱۰ × ۱۰ با دو تکرار در هر یک از شرایط معمولی و آبیاری محدود طی دو سال متوالی از

نشانه‌گرهای مولکولی شناسایی شده در نظر است. نشانه‌گرهای پیوسته به نشانه‌گرهای SCAR که جزو نشانه‌گرهای با وراثت هم‌باز هستند تبدیل شوند و کارایی نشانه‌گرها در توسعه ارقام مقاوم بررسی شوند. همچنین بمنظور استنتاج شبکه ژنی درگیر در مقاومت به خشکی در نظر است تجزیه ترنسکرپتوم بروش توالی‌یابی RNA به‌مراه آنالیزهای بیوانفورماتیکی انجام گیرد. ترکیب نتایج تحقیقات ژنومی و ترنسکرپتوم در توسعه نشانه‌گرهای عملکردی می‌تواند مفید باشد.

صفات مورد مطالعه ارتباط معنی‌دار ($P \geq 0.01$) نشان دادند. برخی از نشانه‌گرها بصورت مشترک برای صفتی در هر دو شرایط محیطی شناسایی شدند. نشانه‌گر 61655 با صفت درصد روغن در هر دو شرایط محیطی پیوستگی نشان داد. شناسایی چنین نشانه‌گرهای مستقل از محیط در برنامه‌های به‌نژادی ارزشمند است. همچنین برخی از نشانه‌گرها با چندین صفت ارتباط داشتند که وجود چنین حالتی در به-نژادی گیاهی به جهت کمک به اصلاح همزمان چندین صفت بسیار حائزه اهمیت می‌باشد. در ادامه بمنظور تایید

منابع

- Abdi, N., Darvishzadeh, R., Jafari, M., Pirzad, A., and Haddadi, P., 2012. Genetic analysis and QTL mapping of agro-morphological traits in sunflower (*Helianthus annuus* L) under two contrasting water treatment conditions. *Plant Omics Journal*, 5(2), PP: 149-158.
- Abdollahi Mandoulakani, B., and Azizi, H., 2014. Identification of ISSR markers associated with morphological traits in cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations. *Journal Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology)*, 27(3), PP: 260-267. (In Persian).
- Ahmadpour, S., Sofalian, O., Darvishzadeh, R., and Abbaspour, N., 2018. Preliminary evidence of the associations between DNA markers and morphological characters in sunflower under natural and salt stress conditions. *Zemdirbyste-Agriculture*, 105 (3), PP: 279-286.
- Ahmadpour, S., Sofalian, O., and Darvishzadeh, R., 2018. Genetic diversity of oily sunflower lines under normal and salt stress conditions using multivariate statistical analysis methods. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 48 (2), PP: 399-411. (In Persian).
- Anonymous, 2012. Annual Report. Iranian Vegetable Oil Industry Association.
- Arteaga, S., Yabor, L., Díez, M.J., Prohens, J., Monica Boscaiu, M., and Oscar Vicente, O., 2020. The Use of Proline in Screening for Tolerance to Drought and Salinity in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes. *Agronomy*, 10(6), 817 p. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060817>.
- Barik, S.R., Pandit, E., Mohanty, S.P., Nayak, D.K., and Pradhan, S.K., 2020. Genetic mapping of physiological traits associated with terminal stage drought tolerance in rice. *BMC Genetics*, 21, 76 p. <https://doi.org/10.1186/s12863-020-00883-x>.
- Bhargavi, B., Kalpana, K., and Reddy, J.K., 2017. Influence of water stress on morphological and physiological changes in *Andrographis paniculata*, *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 5(6), PP: 1550-1556. <http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.5932>.
- Carvalho, V.P., Ruas, C.F., Ferreira, J.M., Moreira, R.M.P., and Ruas, P.M., 2004. Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 27(2), PP: 228-236.
- Darbani, S.P., Mehrabi, A.A., Pordad, S.S., Maleki, A., and Farshadfar, M., 2020. Effect of drought stress on agromorphological traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes and identification of informative ISSR markers, *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, PP: 1-14. <https://doi.org/10.1017/S1479262120000040>.
- Dadras, A.R., Samizadeh, H., and Sabouri, H., 2017. Validation of Candidate Markers Drought Tolerance in Soybean Genotypes under Normal and Drought Stress Condition. *Journal of Crop Breeding*, 9(22), PP: 1-13. (In Persian).
- Darvishzadeh, R., Maleki, H.H., and Sarrafi, A., 2011. Path analysis of the relationships between yield and some related traits in diallel population

- of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions, Australian Journal of Crop Science, 5(6), PP: 674-680.
13. Dehmer, K.J., and Friedt, W., 1998. Development of molecular markers for high oleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Industrial Crops and Products, 7, PP: 311-315.
 14. Doyle, J.J., and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12, PP:13-15.
 15. Du, W.J., Wang, M., Fu, S.X., and Yu, D.Y., 2009. Mapping QTL for seed yield and drought susceptibility index in soybean (*Glycine max* L.) across different environments. Journal of Genetics and Genomics, 36(12), PP: 721-731.
 16. Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular ecology, 14, PP: 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
 17. FAO, 2017. FAO web site. From www.fao.org.
 18. FAO, 2012. FAO web site. From www.fao.org.
 19. Fereres, E., Gimenez, C., and Fernandez, J.M., 1986. Genetic variability in sunflower cultivars under drought. I. Yield relationships, Australian Journal of Agricultural Research, 37(6), PP: 573-582.
 20. Fernandez, O., Urrutia, M., Berton, T., Bernillon, S., Deborde, C., Jacob, D., Maucourt, M., Maury, P., Durufé, H., Gibon, Y., Langlade, N.B., and Moing, A., 2019. Metabolomic characterization of sunflower leaf allows discriminating genotype groups or stress levels with a minimal set of metabolic markers. Metabolomics, 15, 56 p. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1515-4>.
 21. Gbadegesin, M.A., and Beeching, J.R., 2010. Enhancer/Suppressor mutator (En/Spm)-like transposable elements of cassava (*Manihot esculenta*) are transcriptionally inactive. Genetics and Molecular Research, 9(2), PP: 639-650.
 22. Ghaffari, M., Toorchi, M., Valizadeh, M., and Shakiba, M.R., 2012. Morpho-physiological screening of sunflower inbred lines under drought stress condition, Turkish Journal of Field Crops, 17(2), PP: 185-190.
 23. Hossain, M.I., Khatun, A., Talukder, M.S.A., Dewan, M.M.R., and Uddin, M.S., 2010. Effect of drought on physiology and yield contributing characters of sunflower. Bangladesh Agricultural Research Unit (BARI), 35, PP: 113-124.
 24. Hongtrakul, V., Huestis, G.M., and Knapp, S.J., 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. Theoretical and Applied Genetics, Volume 95, PP: 400-407. <https://doi.org/10.1007/s001220050576>.
 25. Jannink J.L., and Walsh, B., 2002. Association mapping in plant populations. In: Kang, M.S. (ed.), Quantitative Genetics. Genomics and Plant Breeding, CAB International, PP: 59-68.
 26. Jannatdoust, M., Darvishzadeh, R., Azizi, H., Ebrahimi, M.A., Ziaiefard, R., and Gholinezhad, E., 2015. Identification of Retrotransposon Markers Associated with Agromorphological Traits in Confectionery Sunflower (*Helianthus annuus* L.) under Normal and Drought Stress Conditions. Journal of Crop Breeding, 8(20), PP:183-197.
 27. Jiang, G.L., 2013. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. In: Andersen SB, editor. Plant breeding from laboratories to fields, Edited by Sven Bode Andersen, PP: 45-83.
 28. Kalendar, R., Flavell, A.J., Ellis, T.H.N., Sjakste, T., Moisy, C., and Schulman, A.H., 2011. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. Heredity, (Edinb) 106, PP: 520-530.
 29. Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., and Schuman, A., 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theoretical and Applied Genetics, 98(5), PP:704-711.
 30. Kebriyae, D., Kordrostami, M., Rezadoost, M.H., and Lahijl, H.S., 2012. QTL analysis of agronomic traits in rice using SSR and AFLP markers. Notulae Scientia Biologicae, 4 (2), PP: 116-123.
 31. Khajehpour, M., 1991. Production of industrial plants, Jihad Daneshgahi Publications, Isfahan University of Technology, 251 p. (In Persian).
 32. Liu, A., and Burke J.M., 2005. Patterns of nucleotide diversity in wild and cultivated

- sunflower. Genetics Society of America, 173, PP: 321-330. DOI: 10.1534/genetics.105.051110.
33. Merah, O., Langlade, N., Alignan, M., Roche, J., Pouilly, N., Lippi, Y., Vear, F., Cerny, M., Bouniols, A., Mouloungui, Z., and Vincourt, P., 2012. Genetic analysis of phytosterol content in sunflower seeds. Theoretical and Applied Genetics, 125, PP: 1589-1601. DOI 10.1007/s00122-012-1937-0.
34. Mohamed, H.I., Akladios, S.A., and Ashry, N.A., 2018. Evaluation of Water Stress Tolerance of Soybean Using Physiological Parameters and Retrotransposon-Based Markers. Gesunde Pflanzen, 70(4), PP: 205-215. <https://doi.org/10.1007/s10343-018-0432-1>
35. Mora, F., Quitral, Y.A., Matus, I., Russell, J., Waugh, R., and del Pozo, A., 2016. SNP-based QTL mapping of 15 complex traits in barley under rain-fed and well-watered conditions by a mixed modeling approach. Frontiers in Plant Science, 7, 909 p. doi: 10.3389/fpls.2016.00909.
36. Najafzadeh, R., Darvishzadeh, R., Musa-Khalifani, K.H., and Abrinbana, M., 2016. Identification of retrotransposon-based (IRAP) loci associated with resistance to Sclerotinia stem rot disease (*Sclerotinia* spp.) in sunflower, Journal of Agricultural Biotechnology, 8(3), 113 p. (In Persian).
37. Nezhadahmadi, A., Prodhan, Z.H., and Faruq, G., 2013. Drought tolerance in wheat. The Scientific World Journal, 2013, PP: 1-12. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/610721>.
38. Perrier, X., and Jacquamoud-collect, J.P., 2006. DARWin software. <http://Darwin.cirad.ir>.
39. Poormohammad Kiani, S., Maury, P., Nouri, L., Ykhlef, N., Grieu, P., and Sarrafi, A., 2020. QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments, Plant Breeding, 128 (4), PP: 363-373.
40. Rasoulzadeh Aghdam, M., Darvishzadeh, R., Sepehr, E., and Alipour, H., 2020. Evaluation of the response of oilseed sunflower pure lines (*Helianthus annuus* L.) under phosphorus deficiency condition, Journal of Crop Breeding, 12(33), PP: 202-214. (In Persian).
41. Rauf, S., and Sadaqat, H.A., 2008. Identification of physiological traits and genotypes combined to high achene yield in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under contrasting water regimes, Australian Journal of Crop Science, 1(1), PP: 23-30.
42. Ren, H., Han, J., Wang, X., Zhang, B., Yu, L., Gao, H., Hong, H., Sun, R., Tian, Y., Qi, X., Liu, Z., Wu, X., and Qiu, L.J., 2020. QTL mapping of drought tolerance traits in soybean with SLAF sequencing, The Crop Journal, 8 (6), PP: 977-989. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.04.004>.
43. Saitou, N., and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for construction phylogenetic tree. Molecular Biology and Evolution, 4(4), PP: 406-425.
44. Seiler, G.J., and Guly, T.J., 2016. Sunflower: Overview, USDA-ARS, Northern Crop Science Laboratory, Fargo, ND, USA, Encyclopedia of Food Grains, Second Edition DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00027-5.
45. Shirmohammadi, S., Sabouri, H., Ahangar, L., Ebadi, A.A., and Sajadi, S.J., 2018. Genetic Diversity and Association Analysis of Rice Genotypes for Grain Physical Quality Using iPBS, IRAP, and ISSR Markers, Journal Genet Resour, 4(2), PP: 122-129.
46. Solano Solis, J., Morales Ulloa, D., and Anabalón Rodríguez, L., 2007. Molecular description and similarity relationships among native germplasm potatoes (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) using morphological data and AFLP markers, Electronic Journal of Biotechnology, (online), 10(3), PP: 436-443. ISSN 0717-3458.
47. Skiryecz, A., Vandenbroucke, K., Clauw, P., Maleux, K., De Meyer, B., Dhondt, S., Pucci, A., Gonzalez, N., Hoerberichts, F., Tognetti, V.B., Galbiati, M., Tonelli, C., Van Breusegem, F., Vuylsteke, M., and Inzé, D., 2011. Survival and growth of Arabidopsis plants given limited water are not equal. Nature Biotechnology, 29, PP: 212-214. <https://doi.org/10.1038/nbt.1800>
48. Yao, Y., You, Q., Duan, G., Ren, J., Chu, S., Zhao, J., Li, X., Zhou, X., and Jiao, Y., 2020. Quantitative trait loci analysis of seed oil content and composition of wild and cultivated soybean. BMC Plant Biology, volume 20 (51). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2199-7>.
49. Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., Vroh Bi, I., Yamasaki, M., Doebley, J.F., McMullen, M.D., Gaut, B.S., Nielsen, D.M., Holland, J.B., Kresovich, S., and Buckler, E.S., 2006. A unified mixed-model method for association mapping

- that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, 38(2), PP: 203-208.
50. Yu, J., and Buckler, E.S., 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize, *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), PP: 155-160.
51. Yue, B., Cai, X., Vick, B.A., and Hu, J., 2009. Genetic diversity and relationships among 177 public sunflower inbred lines assessed by TRAP markers. *Crop Science*, 49, PP: 1242-1249. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.08.0471>
52. Zamani, N., Mirzaei, K., and Zamani, W., 2018. Evaluation of genetic diversity in several populations of medicinal Milk thistle using
- molecular marker. *Journal Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology)*, 31(2), PP: 210-221. (In Persian).
53. Xu, W., Subudhi, P.K., Crasta, O.R., Rosenow, D.T., Mullet, J.E., and Nguyen, H.T., 2000. Molecular mapping of QTLs conferring stay-green in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Genome*, 43(3), PP: 461-469.
54. Zhao, J.H., and Zhou, M.F., 2007. Neoproterozoic adakitic plutons and arc magmatism along the western margin of the Yangtze Block, South China, *The Journal of Geology*, 115(6), PP: 675-689.
52. Zamani, N., Mirzaei, K., and Zamani, W., 2018. Evaluation of genetic diversity in several populations of medicinal Milk thistle using

Identification of IRAP markers associated with agro-morphological traits in oil seed sunflower (*Helianthus annuus* L.) under normal and water limited conditions

Akbari N. and Darvishzadeh R.

Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran.

Abstract

Drought stress is one of the main environmental factors affecting the growth, yield and quality of agricultural products. Unfortunately, global climate change and mismanagement have led to the expansion of the arid and semi-arid lands of the world. Meanwhile, sunflower is one of the important oilseed plants relatively resistant to drought stress. The present study was conducted to identify molecular markers associated with genomic regions controlling agro-morphological traits in sunflower under drought stress. The associated markers are potentially useful for breeding programs and can accelerate the selection of drought tolerant genotypes. One hundred sunflower genotypes were planted in a 10 × 10 simple lattice design with two replications in each one of normal and irrigation limited conditions for two consecutive years. Molecular profiles of the lines were prepared with 7 IRAP primer combinations. According to mixed linear model, 12 and 10 molecular markers showed significant relationships with the studied traits ($P \geq 0.01$) under normal and irrigation limited conditions, respectively. Marker "61655" showed a significant relationship with oil percentage under both normal and irrigation limited conditions. The markers "616510" and "61655" and "CfCr1" showed a significant relationship with several traits under normal and irrigation limited conditions, respectively, that can be due to pleiotropic effects or linkage between genes controlling traits. Accordingly, "616510" marker related with genomic regions controlling yield under normal conditions and "CfCr1" marker related with genomic regions controlling yield components traits (such as head and stem diameter) under irrigation limited conditions, after validation, can be used for selection of optimal genotypes under these water treatment conditions.

Keywords: Association analysis, drought stress, retrotransposon based molecular markers, sunflower