

مکان‌یابی ارتباطی صفات کیفی مرتبط با دانه در آفتابگردان آجیلی (*Helianthus annuus* L.) با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی تحت شرایط نرمال و تنش خشکی

مرجان جنت‌دوست^۱، رضا درویش‌زاده^{۲*}، رقیه ضیایی فرد^۳، حیدر عزیزی^۴، اسماعیل قلی‌نژاد^۵

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه، ارومیه

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

۳. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد اصلاح نباتات، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه

۴. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۵. استادیار گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۳/۲۰)

Association mapping for grain quality related traits in confectionery sunflower (*Helianthus annuus* L.) using retrotransposon markers under normal and drought stress conditions

Marjan Jannatdoust¹, Reza Darvishzadeh^{2*}, Roghayeh Ziaiefard³, Heydar Azizi⁴, Esmaeil Gholinezhad⁵

1. M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran

2. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran

3. M.Sc. in Plant Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran

4. Ph.D student in Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

5. Assistant Professor, Department of Agronomy, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: Mar. 10, 2015 - Accepted: Jun. 10, 2015)

Abstract

Since the economic value of cultivars depends on different characteristics, thus procedure of selection for several traits to maximizing the economic value always has been considered by plant breeders. Detailed knowledge on genetic behavior and association between economic traits will help breeders to improve plant populations. In this study, 12 retrotransposons-based primers (7 IRAP and 5 REMAP primers) and general and mixed linear models (GLM and MLM) were used to identify molecular markers associated to 9 seed related important traits including oil yield, oil percentage, protein yield, protein percentage, grain length, grain diameter, grain weight, dehulled kernel weight, percentage of dehulled kernel weight to whole grain in 48 confectionery sunflower landraces under normal irrigation, mild and severe drought stress conditions. By applying Bayesian model, the whole confectionery sunflower populations were classified into two sub-populations. Based on general linear model, 2, 5 and 12 loci and through mixed linear model 2, 5 and 11 loci showed significant ($P < 0.01$) association with investigated traits under normal irrigation, mild and severe drought stress conditions, respectively. U81-U82 marker was commonly identified for oil yield, achen length and protein yield under severe drought stress conditions. Common markers between some of studied traits can be due to linkage or pleiotropic effects. The common markers lead to increase the efficiency of marker-assisted selection in plant breeding programs via simultaneously selection for several traits.

Keywords: Abiotic stress, Linkage disequilibrium, Molecular markers, Sunflower.

چکیده

با توجه به اینکه ارزش اقتصادی یک رقم به صفات مختلف آن بستگی دارد، بنابراین چگونگی اعمال انتخاب برای چندین صفت به منظور حصول حداکثر ارزش اقتصادی همواره مورد نظر به‌زادگران بوده است. از این رو اطلاع دقیق از رفتار و ارتباط ژنتیکی این صفات به اصلاح توده‌ها کمک خواهد نمود. در این مطالعه به منظور نقشه‌یابی ارتباطی ۹ صفت مهم مرتبط با دانه شامل عملکرد روغن، درصد روغن، عملکرد پروتئین، درصد پروتئین، طول دانه، قطر دانه، وزن دانه، وزن مغز دانه و درصد مغز به کل دانه در ۴۸ توده مختلف آفتابگردان آجیلی تحت شرایط آبیاری نرمال، تنش ملایم و شدید خشکی، از ۱۲ آغازگر مبتنی بر رتروترانسپوزون (۷ آغازگر IRAP و ۵ آغازگر REMAP) استفاده شد. بررسی ساختار جمعیت ژرم‌پلاسم‌های مورد مطالعه به روش بی‌زین، آن‌ها را به ۲ زیر مجموعه تقسیم نمود. تحت شرایط آبیاری نرمال، تنش ملایم و شدید و بر اساس مدل خطی عمومی به ترتیب ۲، ۵ و ۱۲ مکان و بر اساس مدل خطی مخلوط به ترتیب ۲، ۵ و ۱۱ مکان ارتباط معنی‌داری ($P \leq 0.01$) با صفات مورد ارزیابی نشان دادند. نشانگر U81-U82 با ژن‌های کنترل‌کننده عملکرد روغن، عملکرد پروتئین و طول دانه در شرایط تنش شدید خشکی پیوسته بود. شناسایی نشانگرهای مشترک برای برخی صفات بررسی شده می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد. شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌زادگی گیاهان دارد، زیرا گزینش هم‌زمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازند.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، تنش غیر زیستی، عدم تعادل پیوستگی، نشانگرهای مولکولی.

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) با تعداد کروموزوم $2n=2x=34$ ، متعلق به خانواده Asteraceae می‌باشد. ارقام زراعی آفتابگردان دارای دو تیپ روغنی و آجیلی می‌باشند. تیپ روغنی به دلیل درصد روغن بالا برای استحصال روغن مورد استفاده قرار می‌گیرد. روغن آفتابگردان به دلیل داشتن مقدار زیادی اسید چرب غیراشباع لینولئیک و فقدان کلسترول از مرغوبیت بالایی برخوردار است. کنجاله به دست آمده بعد از روغن‌کشی به دلیل داشتن پروتئین (۳۵ درصد) و کربوهیدرات (۱۸-۲۰ درصد) بالا به عنوان مکمل در برنامه‌های غذایی طیور و دام مورد استفاده قرار می‌گیرد (Onemli and Gucer, 2010; Hossain *et al.*, 2010). در تیپ آجیلی آفتابگردان درصد روغن کمتر ولی درصد پروتئین بیشتر بوده و به منظور مصرف آجیلی مورد استفاده قرار می‌گیرد. آفتابگردان با حدود ۲۵/۶ میلیون هکتار سطح زیر کشت در سال ۲۰۱۳، دارای متوسط عملکرد ۱/۷۵ تن در هکتار و تولید کل ۴۴/۸ میلیون تن بوده است (FAO, 2013).

تنش خشکی از مهم‌ترین فاکتورهای محدودکننده تولید محصولات کشاورزی در بسیاری از مناطق دنیا محسوب می‌شود (Passioura, 2007). این تنش غیرزیستی رشد و عملکرد گیاه را از طریق کاهش میزان فتوسنتز ناشی از بسته شدن روزنه‌ها، کاهش مواد فتوسنتزی لازم برای پر کردن دانه و کاهش طول زمان پر شدن دانه‌ها (زودرسی) تحت تاثیر قرار می‌دهد (Reddy *et al.*, 2004; Jaleel *et al.*, 2009). این تنش یکی از علت‌های اصلی محدودیت تولید آفتابگردان بوده که منجر به کاهش بیش از ۵۰ درصدی عملکرد دانه آن می‌گردد (Wang *et al.*, 2003)، بنابراین اصلاح آفتابگردان به منظور مقاومت در برابر تنش خشکی از مهمترین اهداف به‌نژادی در این گیاه محسوب می‌شود (Onemli and Gucer, 2010). اما از آنجا که بیشتر صفات در گیاهان کمی است، به دلیل کنترل پلی‌ژنیک و تأثیرپذیری زیاد

آن‌ها از عوامل محیطی، تجزیه و شناخت مبنای ژنتیکی این صفات همواره با چالش روبرو بوده است. با توسعه نشانگرهای مولکولی DNA تحول بزرگی در روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات بوجود آمده است. در اصلاح نباتات مدرن می‌توان با استفاده از روش‌های ژنتیکی و آماری مناسب، نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات کمی را شناسایی نموده و در پروژه‌های به‌نژادی، گزینش افراد در جمعیت‌های در حال تفرق را با کمک نشانگرها انجام داد. این نوع مطالعات تحت عنوان مطالعات مبتنی بر تجزیه پیوستگی مطرح می‌باشند. در این مطالعات تعداد کمی از ژنوتیپ‌ها به عنوان والدین جمعیت در حال تفرق برای شناسایی چند شکلی‌های مرتبط با صفات مورد مطالعه بکار می‌روند که این مسئله باعث بروز محدودیت در شناسایی تعداد نشانگرهای مرتبط می‌شود. همچنین بواسطه نیاز به زمان طولانی برای تولید جمعیت‌های در حال تفرق در گیاهان چند ساله و بویژه درختان میوه و حساسیت برخی از گونه‌ها به خویش‌امیزی در راستای ایجاد این جمعیت‌ها، کاربرد این روش مشکل‌ساز می‌باشد. برای غلبه بر این مشکلات اخیراً روش مکان‌یابی ارتباطی پیشنهاد و توسعه یافته است. در این روش نیازی به تهیه جمعیت در حال تفرق نیست و از جمعیت‌های متنوع موجود جهت شناسایی مکان‌های ژنومی پیوسته با صفات استفاده می‌شود. بنابراین امکان شناسایی تمامی آلل‌های پیوسته با صفت مورد مطالعه وجود دارد. بر خلاف تجزیه پیوستگی، در این روش ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ افراد مستقیماً برای شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در کنترل صفت بررسی می‌شود (Roy *et al.*, 2006). در آفتابگردان روغنی به عنوان یک گیاه دانه روغنی مهم و اقتصادی، پژوهش‌های زیادی در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی و

1. Linkage-based analysis
2. Association mapping

قابل توجه استان آذربایجان غربی به لحاظ موقعیت جغرافیایی و شرایط اقلیمی در تولید آفتابگردان آجیلی و سطح زیر کشت گسترده این گیاه در استان، اکثر توده‌ها از سطح این استان و به صورت مستقیم از زارعین تهیه شد. توده‌های دیگر نیز از مناطقی از کشور که کشت آفتابگردان آجیلی مرسوم می‌باشد، جمع‌آوری شدند. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه آزمایش و متوسط بارش ماهانه، رطوبت و دما در طول دوره رشد در جدول ۲ و ۳ ارائه شده است. فواصل بوته روی ردیف ۲۵ سانتی‌متر و فاصله ردیف‌ها ۶۰ سانتی‌متر بود. هر کرت دارای ۶ خط کاشت به طول ۶ متر بود. از زمان کاشت تا مرحله استقرار گیاهچه (مرحله ۷ تا ۸ برگی) آبیاری‌ها پس از تخلیه ۵۰ درصد آب قابل دسترس در کلیه تیمارها انجام و پس از این مرحله تا ۱۰ روز پیش از رسیدگی فیزیولوژیک گیاه (تغییر رنگ پشت طبق به زرد مایل به قهوه‌ای در ۹۰ درصد بوته‌ها)، تیمارهای آبیاری دقیقاً اعمال گردید (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007; Istiri *et al.*, 2014; Gholinezhad, 2014). صفات مورد ارزیابی در این بررسی شامل عملکرد روغن، درصد روغن، عملکرد پروتئین، درصد پروتئین، طول دانه، قطر دانه، وزن دانه، وزن مغز دانه و درصد مغز به کل دانه بود.

ارزیابی مولکولی

DNA ژنومی ۴۸ توده از ۵۶ توده مورد بررسی (جدول ۱) به روش CTAB (Doyle and Doyle, 1990) از بافت تازه برگ‌ها استخراج شد. برای هر توده از مخلوط برگ‌های ۱۰ فرد استفاده شد (Abdollahi *et al.*, 2012). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتوفتومتری ارزیابی شد. برای ثبت ژنوتیپ در توده‌های مورد مطالعه از ۱۲ آغازگر مبتنی بر

شناسایی نواحی ژنومی دخیل در صفات مهم با استفاده از نشانگرهای مولکولی صورت گرفته است (Anandhan *et al.*, 2010; Ebrahimi and Sarrafi, 2012; Darvishzadeh, 2012; Mandel *et al.*, 2013).

علی‌رغم اهمیت اقتصادی آفتابگردان آجیلی در ایران، در زمینه شناسایی نشانگرهای مولکولی و مکان‌های ژنتیکی صفات مهم مرتبط با دانه در شرایط تنش خشکی در این گیاه تحقیقات زیادی صورت نگرفته است. هرچند در زمینه آفتابگردان روغنی می‌توان به مکان‌یابی ژنتیکی برخی صفات مهم زراعی (Abdi *et al.*, 2012)، عملکرد (Vanitha *et al.*, 2014) و مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با تحمل به سرما (Allinne *et al.*, 2009) و مقاومت به بیماری‌ها (Davar *et al.*, 2010) اشاره نمود. بنابراین هدف از این تحقیق، نقشه‌یابی ارتباطی برای خصوصیات مهم کیفی مرتبط با دانه آفتابگردان آجیلی و شناسایی نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون IRAP و REMAP مرتبط با این صفات در دو شرایط نرمال و تنش خشکی بود که در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی آفتابگردان به اصلاح‌گران کمک خواهد نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و صفات مورد ارزیابی

۵۶ توده مختلف آفتابگردان آجیلی به طور جداگانه تحت ۳ شرایط مختلف آبیاری نرمال (آبیاری بعد از ۵۰ درصد آب قابل استفاده)، تنش ملایم (آبیاری بعد از ۷۰ درصد آب قابل استفاده) و تنش شدید (آبیاری بعد از ۹۰ درصد آب قابل استفاده) (Gholinezhad, 2014) در قالب ۳ طرح لاتیس مستطیل ساده (۸×۷) با دو تکرار در مزرعه تحقیقاتی ساعت‌لوی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی کشت شدند که از اطلاعات ۴۸ توده از آن‌ها در این مطالعه استفاده شد (جدول ۱). با توجه به پتانسیل

دیونیزه در دستگاه ترمال سایکلر انجام گرفت. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بصورت: ۴ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۶ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (جهت واسرشت‌سازی)، ۴۰ ثانیه در دمای اتصال اختصاصی مربوط به هر آغازگر (جهت اتصال) و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (جهت بسط) و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. تفکیک محصولات تکثیر با استفاده از ژل آگارز ۱/۸ درصد و بافر TBE نیم برابر با ولتاژ ۶۵ ولت به مدت ۳ ساعت انجام و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. برای تعیین اندازه باندها نیز از نشانگر اندازه O'GeneRuler™ (شرکت فرمنتاز) استفاده شد.

رتروترانسپوزون شامل ۷ آغازگر (IRAP (LTR1062)، CR، CF، U81، CR-U81 و U81-U82) و ۵ آغازگر (REMAP (LTR1064-UBC826)، CR-UBC816، U81-UBC827، U82-UBC827 و LTR1063-UBC826) استفاده شد (جدول ۴). واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ 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 (شرکت سیناژن، تهران، ایران)، ۰/۲۵ میلی‌مول از هر dNTP (Biofluxbiotech)، ۱/۱ واحد آنزیم تگ پلی‌مراز (شرکت سیناژن، تهران، ایران) و ۱۰ میکرومول از هر آغازگر به همراه آب

جدول ۱- طول و عرض جغرافیایی مکان‌های جمع‌آوری توده‌های مختلف آفتابگردان آجیلی مورد بررسی

شماره	کد	محل جمع‌آوری	طول	عرض	شماره	کد	محل جمع‌آوری	طول	عرض
۱	۱	پیرانشهر (بالابان)	۴۵°	۳۶°	۲۵	۲۶	مرند (دیج-قلمی)	۴۵° ۴۵'	۳۸° ۳۰'
۲	۲	ارومیه (نوشین‌شهر)	۴۵° ۳۹'	۳۷° ۵۳'	۲۶	۲۷	مرند (یامچی-پسته‌ای)	۴۵° ۴۵'	۳۸° ۳۰'
۳	۳	بوکان	۴۶° ۱۲'	۳۶° ۳۱'	۲۷	۲۸	بانہ ۳	۴۵° ۵۳'	۳۵° ۵۹'
۴	۴	بوکان محلی	۴۶° ۱۲'	۳۶° ۳۱'	۲۸	۲۹	ارومیه (وقاصولوی سفلی)	۴۵° ۰'	۳۷° ۴۰'
۵	۵	ارومیه (اردوشاهی ۱)	۴۵° ۰'	۳۷° ۴۰'	۲۹	۳۰	همدان ۲	۴۸° ۳۲'	۳۴° ۵۲'
۶	۶	سلماس (قره‌قشلاق-قلمی)	۴۴° ۴۷'	۳۸° ۱۱'	۳۰	۳۱	بانہ ۱	۴۵° ۵۳'	۳۵° ۵۹'
۷	۷	پیرانشهر (اندیزه)	۴۵°	۳۶°	۳۱	۳۲	شبستر (کوزه‌کنان ۲)	۴۵°	۳۸°
۸	۹	سلماس (قزلجه ۲)	۴۵° ۴۶'	۳۸° ۱۷'	۳۲	۳۳	بانہ ۲	۴۵° ۵۳'	۳۵° ۵۹'
۹	۱۰	سلماس (قره‌قشلاق-بادامی)	۴۴° ۴۷'	۳۸° ۱۱'	۳۳	۳۴	ملایر-سفید ۳	۴۸° ۵۱'	۳۴° ۱۹'
۱۰	۱۱	سقز ۵	۴۶° ۲۰'	۳۶° ۱۵'	۳۴	۳۵	شبستر (کوزه‌کنان ۳)	۴۵°	۳۸°
۱۱	۱۲	سقز ۴	۴۶° ۲۰'	۳۶° ۱۵'	۳۵	۳۶	مازندران (تیرتاش)	۵۲° ۰'	۳۶° ۳۰'
۱۲	۱۳	مشهد	۵۹° ۳۵'	۳۶° ۲۰'	۳۶	۳۷	شاهرود ۲	۵۴° ۵۸'	۳۶° ۲۵'
۱۳	۱۴	اصفهان (طلخونچه)	۵۱° ۴۳'	۳۲° ۳۹'	۳۷	۳۸	سردشت	۴۸° ۵۲'	۳۲° ۳۲'
۱۴	۱۵	سلماس (صدقیان)	۴۴° ۴۷'	۳۸° ۱۱'	۳۸	۳۹	شاهرود ۱	۵۴° ۵۸'	۳۶° ۲۵'
۱۵	۱۶	پیرانشهر (سروکانی)	۴۵°	۳۶°	۳۹	۴۰	مرند ۱ - ۱۳۸۹	۴۵° ۴۵'	۳۸° ۳۰'
۱۶	۱۷	اصفهان (دولت‌آباد)	۵۱° ۴۳'	۳۲° ۳۹'	۴۰	۴۱	سقز	۴۶° ۲۰'	۳۶° ۱۵'
۱۷	۱۸	ارومیه (انگنه ۴)	۴۵° ۰'	۳۷° ۴۰'	۴۱	۴۲	خوی ۶	۴۵° ۰۰'	۳۸° ۳۵'
۱۸	۱۹	میانه (بسین)	۴۷° ۴۰'	۳۷° ۳۰'	۴۲	۴۳	ارومیه (باباگنجه ۶)	۴۵° ۰'	۳۷° ۴۰'
۱۹	۲۰	ارومیه (وقاصولوی اولیا)	۴۵° ۰'	۳۷° ۴۰'	۴۳	۴۴	ارومیه (باروج)	۴۵° ۰'	۳۷° ۴۰'
۲۰	۲۱	ارومیه (جبل‌کندی ۲)	۴۵° ۰'	۳۷° ۴۰'	۴۴	۴۵	ارومیه (علی‌بگلو)	۴۵° ۰'	۳۷° ۴۰'
۲۱	۲۲	مرند ۲ - ۱۳۸۹	۴۵° ۴۵'	۳۸° ۳۰'	۴۵	۴۶	سقز ۳	۴۶° ۲۰'	۳۶° ۱۵'
۲۲	۲۳	شبستر (کوزه‌کنان ۱)	۴۵°	۳۸°	۴۶	۴۷	سقز ۱	۴۶° ۲۰'	۳۶° ۱۵'
۲۳	۲۴	همدان ۱	۴۸° ۳۲'	۳۴° ۵۲'	۴۷	۴۸	سنندج	۴۸° ۳۲'	۳۵° ۳۱'
۲۴	۲۵	خوی ۱۰	۴۵° ۰۰'	۳۸° ۳۵'	۴۸	۴۹	ارومیه (للو ۵)	۴۵° ۰'	۳۷° ۴۰'

جدول ۲- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک زراعی منطقه آزمایش در عمق ۰-۳۰ سانتی متر

بافت خاک	وزن مخصوص ظاهری خاک (g cm ⁻³)	هدایت الکتریکی (ds/m)	pH	درصد اشباع (%)	رس (%)	سیلت (%)	آلی (%)	کربن آلی (%)	نیترژن (%)	فسفر (ppm)	پتاسیم (ppm)	
Clay loam	1.4	0.8	8	47	17	35	37	28	1.2	0.12	12	375

جدول ۳- اطلاعات هواشناسی در طول فصل رشد آفتابگردان در منطقه آزمایش

پارامترهای هواشناسی	ماه					
	March	April	May	June	July	August
حداکثر دما (درجه سانتی گراد)	16.6	23.3	28.2	30.1	33.1	28.6
حداقل دما (درجه سانتی گراد)	3.1	8.3	11.9	15.3	16.2	13.1
میانگین دما (درجه سانتی گراد)	9.9	15.8	20	22.7	24.6	20.9
کل بارندگی (میلی متر)	31.9	15	18.8	9.2	1.8	8.4
کل تبخیر (میلی متر)	81.9	181.9	255.9	269.3	263.4	200.4
میانگین رطوبت نسبی (درصد)	58	56	48	52	46	52

جدول ۴- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این بررسی

توالی آغازگر (۵'-۳')	آغازگر ISSR	توالی آغازگر (۵'-۳')	آغازگر رتروترانسپوزون
CACACACACACACAT	UBC-816	TCTCTATTTATAGCCGGAGAGGTG	LTR-1062
ACACACACACACACAC	UBC-826	GATCCGGTTTCACGGGACTTAC	LTR-1063
ACACACACACACACAG	UBC-827	CGAAGAACAACCGAATCACC	LTR-1064
-	-	GGTTTAGGTTTCGTAATCCTCCGCG	CF
-	-	ACAGACACCAGTGGCACCAAC	CR
-	-	TAACGGTGTTCGTGTTTGCAGG	U81(UF)
-	-	AGAGGGGAATGTGGGGGTTTCC	U82(UR1)

تجزیه و تحلیل داده‌ها

باند‌های حاصل از همه نشانگرها بصورت یک (حضور) و صفر (عدم حضور) امتیازدهی و ماتریس حاصل برای بررسی ساختار جمعیت استفاده شد. تجزیه کلاستر با روش Neighbor Joining با استفاده از نرم‌افزار DARwin5 نسخه 5.0.158 و با Bootstrap ۱۰۰ (دقت برآورد برای قرارگیری ژنوتیپ‌ها) انجام گرفت (Perrier and Collet, 2006). تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیر جمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط با استفاده از روش Bayesian در نرم‌افزار Structure 2.3.4 انجام گرفت (Pritchard *et al.*, 2000). این روش هر یک از ژنوتیپ‌ها را با یک احتمال و طوری به

زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌کند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. مقادیر اولیه K (زیرجمعیت فرضی اولیه) بین ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها ۵ تکرار منظور گردید. برای این منظور از مدل Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰ تکرار آزمایش (Burn-in) و ۱۰۰۰۰ تکرار MCMC استفاده گردید تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیر جمعیت) یک ماتریس به نام Qst را محاسبه می‌کند که این ماتریس شامل

1. Markov Chain Monte Carlo

بالای حاصل در پژوهش حاضر را می‌توان به فعالیت بالای رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم آفتابگردان و درج آن‌ها در نواحی یوکروماتینی و ژنی (Vukich *et al.*, 2009)، وسعت مناطق جغرافیایی نمونه‌برداری شده، دگرگشی و هتروزیگوسیتی آفتابگردان نسبت داد (Mandel *et al.*, 2011). تجزیه کلاستر با روش Neighbor Joining در نرم‌افزار DARwin5، توده‌های آفتابگردان مورد مطالعه را به ۳ گروه تقسیم‌بندی کرد (شکل ۱)، که هر یک از گروه‌ها شامل توده‌هایی از مناطق مختلف جغرافیایی کشور بود. تجزیه مؤثر ساختار ژنتیکی جمعیت و دسته‌بندی دقیق افراد به زیر جمعیت‌های مناسب انجام و ۲ زیر جمعیت احتمالی ($K=2$) در توده‌های مورد مطالعه شناسایی شد (شکل ۲) و $K=2$ به عنوان K بهینه در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس سهم عضویت افراد در هر کلاستر (ماتریس Q) تعیین شد. بر اساس نتایج ارائه شده در بارپلات (شکل ۳)، با احتمال بیشتر از ۷۰ درصد، ۲۸ فرد متعلق به زیر ساختار اول (قرمز) و ۱۸ فرد متعلق به زیر ساختار دوم (سبز) می‌باشند که در مجموع ۹۵/۸۳ درصد افراد مورد مطالعه دارای درصد عضویت بیشتر و مساوی ۰/۷ و ۴/۱۷ درصد افراد دارای سهم عضویت کمتر از ۰/۷ می‌باشند. ساختار یک جمعیت، حاصل انتخاب و در سطوح بالاتر اختلاط در آن جمعیت می‌باشد و منجر به افزایش عدم تعادل لینکاژی بین نشانگرهای غیرپیوسته می‌شود (Cardon and Palmer, 2003; Rostok *et al.*, 2006). بنابراین در نظر گرفتن ساختار جمعیت در مطالعات نقشه‌یابی ارتباطی به منظور شناسایی واریانت‌های کمیاب در مکان‌هایی که بین جمعیت‌ها متغیر هستند، ولی بطور شایعی درون زیرجمعیت‌ها تثبیت شده‌اند، از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد (Flint-Garcia *et al.*, 2005; Bresghello and Sorrells, 2006).

برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. در بارپلات حاصل، وقتی درصد عضویت یک ژنوتیپ به یک کلاستر بیشتر یا مساوی ۰/۷ باشد، ژنوتیپ به آن کلاستر نسبت داده می‌شود، ولی در صورتی که درصد عضویت آن کمتر از این مقدار باشد، به عنوان ژنوتیپ ترکیبی (مخلوط شده) در نظر گرفته می‌شود (Spataro *et al.*, 2011). تعداد واقعی زیرجمعیت توسط لگاریتم Likelihood برای هر K : $\text{LnP}(D) = L(K)$ تعیین می‌شود (Rosenberg *et al.*, 2002). از آنجایی که توزیع $\text{LnP}(D)$ عدد دقیق و واضحی از K واقعی را نشان نمی‌دهد، ΔK مبنی بر برآورد ثانویه تغییر در Likelihood جهت برآورد دقیق مقدار واقعی K استفاده می‌شود (Evanno *et al.*, 2005). شناسایی نشانگرهای مرتبط و دارای ارتباط معنی‌دار با صفات مورد ارزیابی، بر اساس مدل خطی عمومی (GLM) وابسته به مدل Q (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت) و مدل خطی مخلوط (MLM) وابسته به مدل $Q + K$ (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت + ماتریس روابط خویشاوندی) جهت جلوگیری از ارتباط کاذب بین نشانگر-صفت، با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 انجام گرفت. میزان عدم تعادل لینکاژی (LD) نیز با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 محاسبه گردید.

نتایج و بحث

ارزیابی ساختار ژنتیکی

مقادیر حدافل، حداکثر، میانگین و انحراف معیار ارزش فنوتیپی صفات در شرایط نرمال، تنش خشکی ملایم و شدید در جدول ۵ آورده شده است. تنوع ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه با استفاده از ۷ آغازگر IRAP و ۵ آغازگر REMAP (جدول ۲) مورد بررسی قرار گرفت. این آغازگرها در کل ۱۳۸ مکان ژنومی را تکثیر نمودند که در این بین، ۸۶/۳ درصد مکان‌های تکثیری دارای چندشکلی بودند. چندشکلی نسبتاً

جدول ۵- آماره‌های توصیفی صفات مورد مطالعه در توده‌های آفتابگردان آجیلی ایران

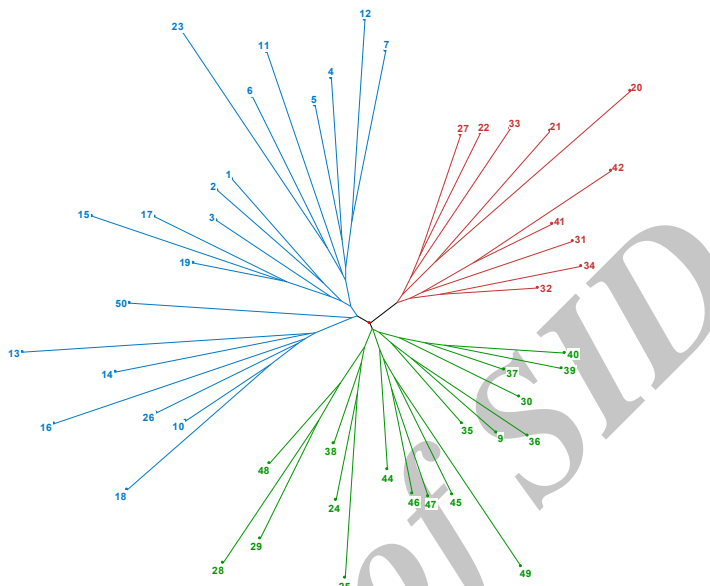
صفات	شرایط تنش	میانگین	حداکثر	حداقل	انحراف معیار
عملکرد روغن (کیلوگرم/هکتار)	ملایم	784.23	1436.98	185.98	269.27
درصد روغن (%)	ملایم	38.08	42.78	32.24	2.16
عملکرد پروتئین (کیلوگرم/هکتار)	ملایم	350.39	651.85	90.12	125.83
درصد پروتئین (%)	ملایم	16.95	19.14	14.21	1.21
طول دانه (میلیمتر)	ملایم	20.89	32.85	13.35	3.93
قطر دانه (میلیمتر)	ملایم	8.17	15.01	5.33	1.92
وزن دانه (گرم)	ملایم	0.03	0.04	0.022	0.003
وزن مغز (گرم)	ملایم	0.002	0.025	0.0003	0.004
درصد مغز به کل دانه (%)	ملایم	44.20	58.07	25.96	6.40
عملکرد روغن (کیلوگرم/هکتار)	شدید	495.17	787.91	163.55	156.29
درصد روغن (%)	شدید	35.43	41.12	29.79	2.40
عملکرد پروتئین (کیلوگرم/هکتار)	شدید	242.48	384.28	90.97	73.20
درصد پروتئین (%)	شدید	17.40	19.6	14.65	1.26
طول دانه (میلیمتر)	شدید	20.12	27.99	10.54	3.55
قطر دانه (میلیمتر)	شدید	7.33	12.33	4.87	1.59
وزن دانه (گرم)	شدید	0.02	0.03	0.019	0.003
وزن مغز (گرم)	شدید	0.002	0.025	0.00001	0.003
درصد مغز به کل دانه (%)	شدید	40.43	55.21	14.87	6.86
عملکرد روغن (کیلوگرم/هکتار)	آبیاری نرمال	1109.98	1767.02	336.34	316.51
درصد روغن (%)	آبیاری نرمال	41.40	45.17	38.4	1.83
عملکرد پروتئین (کیلوگرم/هکتار)	آبیاری نرمال	431.52	767.7	140.03	125.31
درصد پروتئین (%)	آبیاری نرمال	16.13	18.44	13.36	1.32
طول دانه (میلیمتر)	آبیاری نرمال	21.89	29.59	11.88	4.10
قطر دانه (میلی متر)	آبیاری نرمال	8.16	14.15	4.71	2.015
وزن دانه (گرم)	آبیاری نرمال	0.03	0.0459	0.0272	0.004
وزن مغز (گرم)	آبیاری نرمال	0.002	0.0356	0.0007	0.005
درصد مغز به کل دانه (%)	آبیاری نرمال	47.98	62.24	33.74	5.95

عدم تعادل پیوستگی (LD)

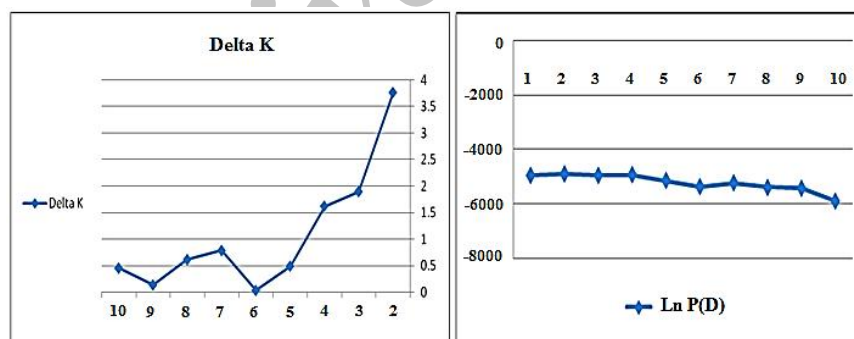
بر اساس نتایج حاصل از این بررسی، شاخص عدم تعادل با احتمال ۹۰ درصد، ۱/۲۱ در نظر گرفته شد (شکل ۴). علاوه بر ترکیب ساختار جمعیت در مطالعات نقشه‌یابی ارتباطی، گستره عدم تعادل پیوستگی (LD) در ژنوم نیز از اهمیت اساسی برخوردار است (Al-Maskri *et al.*, 2012). از عوامل افزایش دهنده مقدار LD می‌توان به سیستم اتوگامی، اپیستازی، نوآرایی‌های ژنومی، رانده شدن ژنتیکی، ایزولاسیون ژنتیکی، ساختار

جمعیت، اندازه کوچک جمعیت، انتخاب و درجه خویشاوندی اشاره کرد، در حالیکه دگرآمیزی (آلوگامی)، تبدیل ژنی، مقادیر بالای نوترکیبی و موتاسیون و همچنین موتاسیون‌های دوره‌ای از عوامل کاهنده مقدار LD می‌باشند (Gupta *et al.*, 2005; Oraguzie *et al.*, 2012). به عنوان مثال، دامنه LD گندم به عنوان یک گونه اتوگام، بیش از سه برابر دامنه LD در ذرت که یک گونه گیاهی آلوگام است، گزارش شده است (Bresseghello and

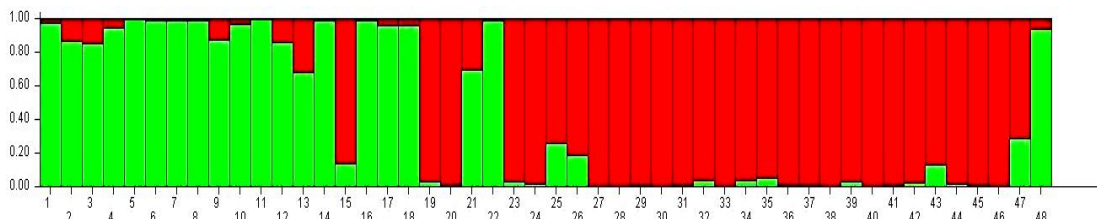
بنابراین تأثیر نوترکیبی در شکستن بلوک‌های LD را متنتی می‌کند. (Sorrells, 2006). یکی از دلایل این امر این است که، اتوگامی شجره را به سمت هموزیگوسیتی رانده و



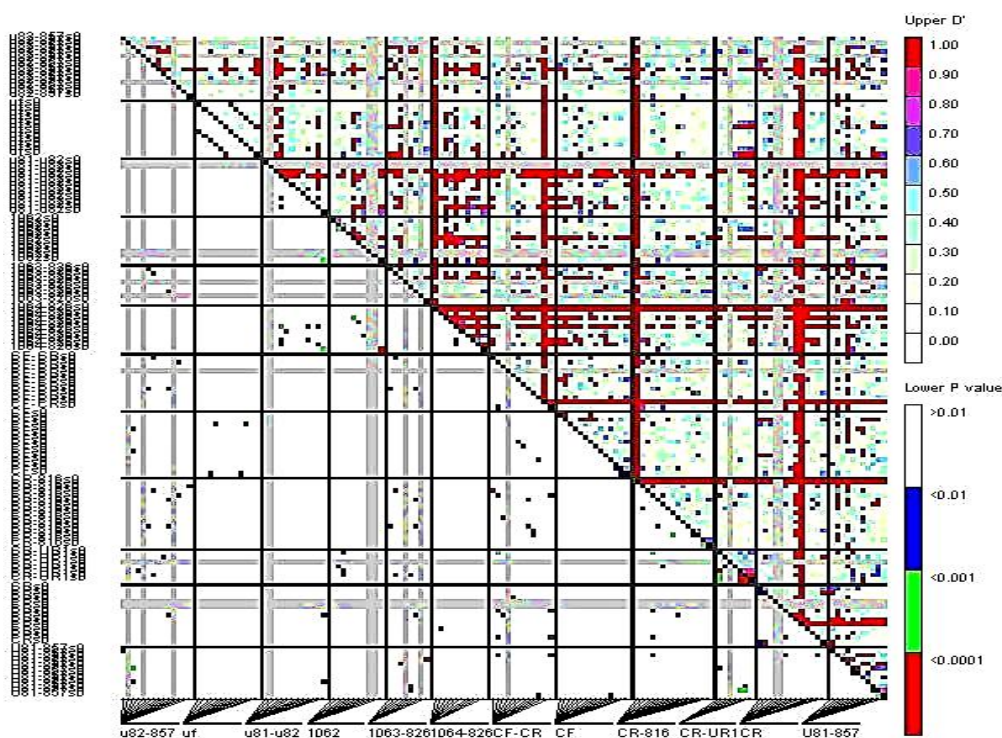
شکل ۱- دندروگرام توده‌های مختلف آفتابگردان آجیلی مورد مطالعه به روش Neighbor Joining بر اساس ۱۳۸ مکان ژنی حاصل از دو نشانگر IRAP و REMAP. نام توده مربوط به هر شماره در دندروگرام در جدول ۱ آمده است.



شکل ۲- نمودارهای دوسویه برای تعیین تعداد مناسب زیر جمعیت در توده‌های آفتابگردان آجیلی مورد مطالعه ($K=2$) بر اساس نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون IRAP و REMAP در نرم‌افزار Structure.



شکل ۳- تجزیه کلاستر مبتنی بر مدل Bayesian برای ۴۸ توده آفتابگردان مورد مطالعه بر اساس ۱۳۸ مکان ژنی حاصل از دو نشانگر IRAP و REMAP ($K=2$). هر رنگ یک زیر جمعیت یا کلاستر را نشان می‌دهد. اعداد روی محور افقی و عمودی به ترتیب شماره افراد و ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر را نشان می‌دهد.



شکل ۴- پلات عدم تعادل لینکاژی (LD plot) توده‌های آفتابگردان آجیلی ایران با استفاده از نرم‌افزار TASSEL. قسمت بالای قطر نشان‌دهنده میزان عدم تعادل لینکاژی با استفاده از آماره D' و قسمت پایین قطر P-value برای جفت نشانگرها را نشان می‌دهد.

مکان‌یابی ارتباطی

در روش نقشه‌یابی ارتباطی مکان‌یابی QTL براساس عدم تعادل لینکاژی صورت می‌گیرد (Gupta *et al.*, 2005). در مطالعات تجزیه ارتباط الزاماً از جمعیت‌های طبیعی استفاده می‌شود و در حالت ایده‌آل نباید ساختاری در جمعیت مورد مطالعه وجود داشته باشد، زیرا وجود ساختار در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند عامل بازدارنده در جهت دستیابی به نتایج قابل اعتماد باشد. در صورتی که اثر عوامل ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در تجزیه ارتباط در نظر گرفته نشوند، نتایج مثبت کاذب بوجود خواهد آمد (Brescghello and Sorrells, 2006). در این مطالعه، بر اساس مدل GLM، ۱۹ نشانگر (مکان ژنی) که ارتباط معنی‌داری ($P < 0.01$) با صفات مورد مطالعه داشتند، شناسایی شدند (جدول

۶). در شرایط تنش شدید، ۲ مکان مرتبط با عملکرد روغن، ۳ مکان مرتبط با درصد روغن، ۲ مکان مرتبط با عملکرد پروتئین، ۱ مکان مرتبط با وزن دانه، ۲ مکان مرتبط با قطر دانه و ۲ مکان مرتبط با طول دانه شناسایی گردید. در شرایط تنش ملایم، ۲ مکان مرتبط با عملکرد پروتئین، ۲ مکان مرتبط با درصد پروتئین و ۱ مکان مرتبط با وزن دانه شناسایی شد. تحت شرایط آبیاری نرمال ۲ مکان مرتبط با طول دانه شناسایی شد.

در تجزیه ارتباط براساس مدل MLM در سطح احتمال یک درصد، در مجموع ۱۸ مکان ژنی مرتبط با صفات مورد مطالعه شناسایی شدند (جدول ۷). از کل مکان‌های مرتبط با صفات مورد ارزیابی بر اساس مدل MLM (۱۸ مکان)، تحت شرایط تنش شدید، ملایم و آبیاری نرمال به ترتیب ۱۱، ۵ و ۲ مکان ارتباط معنی‌داری با این صفات نشان دادند. ۱۱ مکان مرتبط با صفات تحت شرایط تنش شدید شامل ۲

1. False positive

که رابطه معنی‌داری با صفات مختلف آگرومورفولوژیک نشان می‌دادند. *Fusari et al.* (2012) با روش تجزیه ارتباط، مکان‌های ژنی کنترل‌کننده مقاومت به بیماری اسکروتینیا در آفتابگردان را شناسایی کردند. ایشان با استفاده از مدل خطی مخلوط یک ژن کاندید شناسایی کردند که ۲۰ درصد از تغییرات داده‌های فنوتیپی را توجیه می‌نمود. تکنیک نقشه‌یابی ارتباطی در سایر گیاهان زراعی نیز مانند گندم (Liu, 2011)، جو (Wang *et al.*, 2012)، ذرت خوشه‌ای (Shehzad *et al.*, 2009)، ذرت (Anderson *et al.*, 2007) و کاهو (Simko *et al.*, 2009) استفاده شده است.

1. Mixed linear model

مکان با عملکرد روغن، ۳ مکان با درصد روغن، ۱ مکان با عملکرد پروتئین، ۱ مکان با طول دانه، ۲ مکان با قطر دانه و ۱ مکان با وزن دانه بود. تعداد مکان‌های مرتبط با صفات مختلف تحت تنش ملایم، شامل ۲ مکان با درصد پروتئین، ۲ مکان با عملکرد پروتئین و ۱ مکان با وزن دانه می‌باشند. استفاده از این مدل نیز همانند مدل GLM، ارتباط معنی‌دار ۲ مکان با صفت طول دانه را تحت شرایط آبیاری نرمال نشان داد. *Saeed et al.* (2014) در مکان‌یابی ارتباطی تحمل به شوری در ژرم‌پلاسم پنبه اظهار داشتند که استفاده از مدل MLM به کاهش نتایج مثبت دروغین (ارتباطات کاذب نشانگر-صفت) و آریبی کمتر نتایج کمک زیادی می‌کند. *Vanitha et al.* (2014) با استفاده از نشانگرهای SSR، ۲۹ نشانگر را در آفتابگردان شناسایی نمودند

جدول ۶- نشانگرهای پیوسته با صفات ارزیابی شده در توده‌های آفتابگردان آجیلی مورد مطالعه بر اساس مدل GLM

صفت	تنش	نشانگر	P-value	R ²	صفت	تنش	نشانگر	P-value	R ²
عملکرد روغن	ملایم	-	-	-	درصد پروتئین	ملایم	CR-UR1	0.005	0.18
	شدید	U81-U82	0.004	0.12		LTR1062	0.009	0.11	
		LTR1064-UBC826	0.004	0.16		-	-	-	
	نرمال	-	-	-		نرمال	-	-	-
درصد روغن	ملایم	-	-	-	قطر دانه	ملایم	-	-	-
	شدید	U81-UBC857	0.003	0.17		CF-CR	0.007	0.14	
		CF-CR	0.008	0.09		CR-UBC816	0.007	0.12	
	نرمال	-	-	-		نرمال	-	-	-
عملکرد پروتئین	ملایم	U82-UBC857	0.006	0.11	طول دانه	ملایم	-	-	-
		LTR1063-UBC826	0.006	0.14		شدید	U81-U82	0.004	0.18
	شدید	U81-U82	0.009	0.09		U82-UBC857	0.009	0.12	
		LTR1064-UBC826	0.009	0.12		نرمال	LTR1063-UBC826	0.005	0.17
نرمال	-	-	-	U81-UBC857	0.009	0.10			
وزن دانه	ملایم	U81-UBC857	0.002	0.21					
	شدید	LTR1062	0.005	0.16					
	نرمال	-	-	-					

GLM: General linear model

جدول ۷- نشانگرهای پیوسته با صفات ارزیابی شده در توده‌های آفتابگردان آجیلی مورد مطالعه بر اساس مدل MLM

صفت	تنش	نشانگر	P-value	صفت	تنش	نشانگر	P-value
درصد پروتئین	ملایم	LTR1062	0.009	عملکرد پروتئین	ملایم	U82-UBC857	0.006
		CR-UR1	0.006			LTR1063-UBC826	0.006
	شدید	-	-		U81-U82	0.009	
		نرمال	-		-	LTR1064-UBC826	0.009
عملکرد روغن	ملایم	-	-	وزن دانه	ملایم	U81-857	0.002
		U81-U82	0.005			LTR1062	0.005
	شدید	LTR1064-UBC826	0.005		نرمال	-	-
		نرمال	-			-	-
قطردانه	ملایم	-	-	درصد روغن	ملایم	-	-
		CF-CR	0.007			U81-UBC857	0.003
	شدید	CR-UBC816	0.007		شدید	CF-CR	0.009
		نرمال	-			-	CR-UBC816
طول دانه	ملایم	-	-	نرمال	-	-	-
		U81-U82	0.005				
	شدید	LTR1063-UBC826	0.006				
		نرمال	U81-UBC857		0.006		

MLM: Mixed linear model

مورد مطالعه یکی از عوامل مؤثر بر درجه وضوح و قدرت تکنیک مکان‌یابی ارتباطی در کالبد شکافی اساس ژنتیکی صفات می‌باشد (Dixit *et al.*, 2013)، لازم است نشانگرهای شناسایی شده در چنین مطالعاتی در جمعیت‌های بزرگ با تنوع ژنتیکی بالا نیز مورد بررسی قرار گیرند تا از ارتباط آن‌ها با صفات مورد مطالعه اطمینان حاصل شود و بدین ترتیب کارایی کاربرد این نشانگرها در برنامه‌های مختلف اصلاحی افزایش یابد. بنابراین مناطق ژنومی پیوسته با عوامل کنترل‌کننده صفات مورد نظر بعد از اعتبارسنجی^۱ و نقشه‌یابی دقیق^۲ آن‌ها می‌توانند برای انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های مختلف اصلاح آفتابگردان استفاده شوند و از این طریق منجر به تسریع و کارایی بیشتر روش‌های سنتی اصلاحی شوند.

تعدادی نشانگر مشترک برای صفات مختلف هم با مدل خطی عمومی و هم با مدل خطی مخلوط شناسایی شدند. به عنوان مثال نشانگر U81-U82 هم برای عملکرد روغن، هم برای عملکرد پروتئین و هم برای طول دانه در شرایط تنش شدید خشکی شناسایی شد. شناسایی نشانگرهای مشترک برای برخی صفات بررسی شده در مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد (Jun *et al.*, 2008). شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد، زیرا گزینش هم‌زمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازند (Tuberosa *et al.*, 2002; Hittalmani *et al.*, 2003).

نتایج مطالعه حاضر کارایی استفاده از مدل‌های مختلف ارتباطیابی (GLM و MLM) در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مهم مرتبط با دانه در توده‌های آفتابگردان آجیلی مورد مطالعه را نشان می‌دهد. از آنجایی که تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسما

1. Validation
2. Fine mapping

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه و همچنین از ریاست

محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی که امکانات لازم برای انجام این تحقیق را فراهم نمودند، قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

- Abdi N, Darvishzadeh R, Jafari M, Pirzad A, Haddadi P (2012) Genetic analysis and QTL mapping of agromorphological traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under two contrasting water treatment conditions. *Plant Omics Journal*. 5(2): 149-158.
- Abdollahi Mandoulakani B, Piri Y, Darvishzadeh R, Bernoosi I, Jafari M (2012). Retroelement insertional polymorphism and genetic diversity in medicago sativa populations revealed by IRAP and REMAP markers. *Plant Mol. Biol. Rep.* 30: 286-296.
- Abdurakhmonov AY, Abdulkarimov A (2008) Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources. *Int. J. Plant Genomics*. 57(4927): 1-18.
- Allinne C, Maury P, Sarrafi A, Grieu P (2009) Genetic control of physiological traits associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions. *Plant Sci*. 177: 349-359.
- Al-Maskri AH, Sajjad M, Khan SH (2012) Association mapping: a step forward to discovering new alleles for crop improvement. *Int. J. Agric. Biol.* 14: 153-160.
- Anandhan T, Manivannan N, Vindhiyavarman P, Jeyakumar P (2010) Single marker analysis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Electronic Journal of Plant Breeding*. 1(4): 1227-1234.
- Andersen JR, Zein I, Wenzel G, Krützfeldt B, Eder J, Ouzunova M, Lübberstedt T (2007) High levels of linkage disequilibrium and associations with forage quality at a Phenylalanine Ammonia-Lyase locus in European maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Theor. Appl. Genet.* 114: 307-319.
- Breseghele F, Sorrells ME (2006) Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics*. 172: 1165-1177.
- Cardon LR, Palmer LJ (2003) Population stratification and spurious allelic association. *Lancet*. 361: 598-604.
- Darvishzadeh R (2012) Association of SSR markers with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in sunflower. *Australian Journal of Crop Science*. 6(2): 276-282.
- Davar R, Darvishzadeh R, Majd A, Ghosta Y, Sarrafi A (2010) QTL mapping of partial resistance to basal stem rot in sunflower using recombinant inbred lines. *Phytopathol. Mediterr.* 49: 330-341.
- Dixit N, Dokku P, Amitha Mithra SV, Parida SK, Singh AK, Singh NK (2013) Haplotype structure in grain weight gene *GW2* and its association with grain characteristics in rice. *Euphytica*. 192: 55-61.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13-15.
- Ebrahimi A, Sarrafi A (2012) Genetic variability and identification of markers associated with germination parameters in gamma-irradiation induced mutants of sunflower under water stress condition. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 1(2): 1-8.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*. 14: 2611-2620.
- FAO (Food and Agriculture Organization)

- Rome (2013) <http://faostat.fao.org/>.
- Flint-Garcia SA, Thuillet AC, Yu J, Pressoir G, Romero SM, Mitchell SE, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES (2005) Maize association population: A high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *Plant J.* 44: 1054-1064.
- Fusari CM, Rienzo JAD, Troglia C, Nishinakamasu V, Moreno MV, Maringolo C, Quiroz F, Álvarez D, Escande A, Hopp E, Heinz R, Lia VV, Paniego NB (2012). Association mapping in sunflower for Sclerotinia head rot resistance. *BMC Plant Biology.* 12(93): 1-13.
- Gholinezhad E (2014) Effect of water deficit stress, different rates of nitrogen and plant density on remobilization, current photosynthesis and grain yield in sunflower. *Journal of Oil Plants Production.* 1(1): 44-63.
- Gordon D, Finch SJ (2005) Factors affecting statistical power in the detection of genetic association. *J. Clinical Invest.* 115: 1408-1418.
- Gupta PK, Rustgi S, Kulwal PL (2005) Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology.* 57: 461-485.
- Hittalmani S, Huang N, Courtois B, Venuprasad R, Shashidhar HE, Zhuang JY, Zheng KL, Liu GF, Wang GC, Sidhu JS, Srivantaneeyakul S, Singh VP, Bagali PG, Prasanna HC, McLaren G, Khush GS (2003) Identification of QTL for growth and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. *Theoretical and Applied Genetics.* 107: 679-90.
- Hossain MI, Khatun A, Talukder SA, Dewan MMR, Udd MS (2010) Effect of drought on physiology and yield contributing characters of Sunflower. *Bangladesh Journal of Agricultural Research.* 1: 113-124.
- Istiri H, Armin M, Filekesh E (2014) The effect of zinc sulfate foliar application on yield and yield components of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress. *Journal of Oil Plants Production.* 1(1): 65-77.
- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ, Somasundaram R, Panneersel Vam R (2009) Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *Int. J. Agric. Biol.* 331: 42-47.
- Jun TH, Van K, Kim MY, Lee SH, Walker DR (2008) Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica.* 62: 179-191.
- Liu L, Wang L, Yao J, Zheng Y, Zhao C (2010) Association mapping of six agronomic traits on chromosome 4A of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Plant Breeding.* 1(5): 1-10.
- Mandel JR, Dechaine JM, Marlek LF, Burke JM (2011) Genetic diversity and population structure in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) and a comparison to its wild progenitor. *Theor. Appl. Genet.* 123(5): 693-704.
- Mandel JR, Nambesan S, Bowers JE, Marek LF, Ebert D, Rieseberg LH, Knapp JM, Burke JM (2013) Association mapping and the genomic consequences of selection in sunflower. *Genetics.* 9(3): 1-13.
- Onemli F, Gucer T (2010) Response to drought of some wild species of helianthus at seedling growth stage. *Helia.* 33(53): 45-54.
- Oraguzie NC, Wilcox PL, Rikkerink EHA, de Silva HN (2007) Linkage disequilibrium, Association Mapping in Plants. Springer. New York. NY. pp: 11-39.
- Passioura JB (2007) The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. *Journal of Experimental Botany.* 58(2): 113-117.
- Perrier X, Jacquemoud-Collet JP (2006)

- DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/darwin>.
- Poormohammad Kiani S, Grieu P, Maury P, Hewezi T, Gentzittel L, Sarrafi A (2007). Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 114: 193-207.
- Pritchard JK, Donnelly P (2001) Case-control studies of association in structured or admixed populations. *Theoretical Population Biology*. 60: 227-237.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol*. 161: 1189-1202.
- Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, Feldman MW (2002) The genetic structure of human populations. *Science*. 298: 2381-2385.
- Rostok N, Ramsay L, MacKenzie K, Cardle L, Bhat PR (2006) Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *PNAS*. 103: 18656-18661.
- Roy JK, Bandyopadhyay R, Rustgi S, Balyan HS, Gupta PK (2006) Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science*. 90: 5-10.
- Saeed M, Wangzhen G, Tianzhen Z (2014) Association mapping for salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) germplasm from US and diverse regions of China. *Australian Journal of Crop Science*. 8(3): 338-346.
- Shehzad T, Iwata H, Okuno K (2009) Genome-wide association mapping of quantitative traits in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) by using multiple models. *Breed. Sci*. 59: 217-227.
- Simko I, Pechenick DA, McHale LK, Truco MJ, Ochoa OE, Michelmore RW, Scheffler BE (2009) Association mapping and marker-assisted selection of the lettuce dieback resistance gene Tvr1. *BMC Plant Biol*. 9: 135.
- Spataro G, Tiranti B, Arcaleni P, Bellucci E, Attene G, Papa R, Spagnoletti ZP, Negri V (2011) Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theor. Appl. Genet*. 122: 1281-1291.
- Tuberosa R, Salvi S, Sanguineti MC, Landi P, Maccaferri M, Conti S (2002) Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield in drought-stressed maize: case studies, shortcomings and perspectives. *Annals of Botany*. 89: 941-963.
- Vanitha J, Manivannan N, Chandirakala R (2014) Qualitative trait loci analysis for seed yield and component traits in sunflower. *African Journal of Biotechnology*. 13(6): 754-761.
- Vukich M, Giordani T, Natali G, Cavallini A (2009) Copia and Gypsy retrotransposons activity in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *BMC Plant Biology*. 9:150.
- Wang M, Jiang N, Jia T, Leach L, Cockram J, Comadran J, Shaw P, Waugh R, Luo Z (2012) Genome-wide association mapping of agronomic and morphologic traits in highly structured populations of barley cultivars. *Theor. Appl. Genet*. 124: 233-46.
- Wang W, Vinour B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. 218: 1-14.