

## شناسایی مکان‌های ریزوماهواره مرتبط با برخی صفات مهم آگرومورفولوژیکی در لاین‌های مختلف آفتابگردان روغنی (*Helianthus annuus* L.) با استفاده از نقشه‌یابی ارتباطی

فاطمه صحرانورد آذرتامر<sup>۱</sup>، رضا درویش‌زاده<sup>۲\*</sup>، مرتضی قدیم‌زاده<sup>۳</sup>، حیدر عزیزی<sup>۴</sup>، زهرا ابوالقاسمی<sup>۵</sup>  
 ۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد اصلاح نباتات، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه.  
 ۲. دانشیاران گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه.  
 ۳. پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه، ارومیه.  
 ۴. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت.  
 ۵. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز  
 (تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۳۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۶/۲۵)

## Identification of SSR loci related to some important agromorphological traits in different oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines using association mapping

Fatemeh Sahranavard Azartamar<sup>1</sup>, Reza Darvishzadeh<sup>2,3\*</sup>, Mortaza Ghadimzadeh<sup>2</sup>, Heydar Azizi<sup>4</sup>, Zahra Aboulghasemi<sup>5</sup>

1. M.Sc. in Plant Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.
2. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.
3. Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.
4. Ph.D. student in Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
5. M.Sc. in Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, Islamic Azad University, Tabriz Branch  
 (Received: May 21, 2015 - Accepted: Sep. 16, 2015)

### Abstract

Since the economic value of cultivar depends on different characteristics, thus detailed knowledge on genetic behavior and identification of genomic loci linked to these traits will help to improve plant cultivars. In this investigation, relation and linkage between of 30 microsatellite markers with some of important agromorphological traits in 106 different sunflower lines was evaluated through GLM and MLM association models in Structure and TASSEL software. Based on the 30 microsatellite markers used in this study, population genetic structure subdivided into five subpopulations (K=5) that barplot results also confirmed it. In association analysis based on GLM and MLM models, 9 and 16 loci showed significant relation with assessed traits, respectively, and explained considerable variations of this studied traits. In this study, some co-localized QTLs were identified for studied traits. Common markers between of traits can be due to pleiotropic effects or linkage between of genomic regions involved in these traits. Results of the current study presented useful information about the genetic basis of the studied traits and can be used in different sunflower breeding programs including marker aided selection. In future studies, coding genes of important agronomical traits could be identified by sequencing of loci with highest  $R^2$  (ORS1209, ORS822 and ORS649). Markers with highest association to traits can be used for saturating linkage maps.

**Keywords:** Sunflower, Linkage disequilibrium, Molecular markers.

E-mail: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

### چکیده

با توجه به اینکه ارزش اقتصادی یک رقم به صفات مختلف آن بستگی دارد، از این رو اطلاع دقیق از رفتار ژنتیکی و شناسایی مکان‌های ژنومی پیوسته با این صفات به اصلاح ارقام کمک خواهد نمود. در این مطالعه، ارتباط و پیوستگی بین ۳۰ نشانگر ریزوماهواره با برخی صفات مهم آگرومورفولوژیکی در ۱۰۶ لاین مختلف آفتابگردان روغنی از طریق مدل‌های ارتباطیابی GLM و MLM با استفاده از نرم‌افزارهای Structure و TASSEL مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس ۳۰ نشانگر ریزوماهواره مورد استفاده در این مطالعه، ساختار ژنتیکی جمعیت به پنج زیر جمعیت فرعی (K=5) تقسیم گردید که نتایج حاصل از رسم بارپلات نیز مؤید آن بود. در تجزیه ارتباط به روش GLM و MLM، به ترتیب ۹ و ۱۶ مکان ارتباط معنی‌داری با صفات مورد مطالعه نشان دادند و تغییرات قابل توجهی از این صفات را توجیه نمودند. در این مطالعه چندین مکان مشترک برای صفات مورد مطالعه شناسایی شد. وجود نشانگرهای مشترک در میان برخی صفات بررسی شده می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد. نتایج بدست آمده از این مطالعه اطلاعات ارزشمندی در زمینه مبنای ژنتیکی صفات مورد مطالعه ارائه می‌دهد که از این اطلاعات می‌توان در برنامه‌های مختلف اصلاحی و از جمله انتخاب به کمک نشانگر در آفتابگردان استفاده نمود. در مطالعات بعدی می‌توان با توالی‌یابی مکان‌هایی که تغییرات قابل توجهی از صفات را توجیه می‌نمایند (ORS1209، ORS822 و ORS649)، ژن‌های کدکننده صفات مهم زراعی را شناسایی کرد. از نشانگرهایی که دارای ارتباط قوی‌تر با صفات خاص هستند، می‌توان در اشیاء نقشه‌های لینکازی استفاده نمود.

**واژه‌های کلیدی:** آفتابگردان، عدم تعادل پیوستگی، نشانگرهای مولکولی.

\* نویسنده مسئول: رضا درویش‌زاده

## مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.)، از گیاهان زراعی اصلی و قابل کشت در سراسر جهان بوده و به عنوان یکی از چهار گروه عمده گیاهان روغنی، از نظر سطح زیر کشت بعد از سویا، کلزا و بادام زمینی قرار دارد. 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). این گیاه دیپلوئید با اندازه ژنوم هاپلوئید حدود ۳۰۰۰ مگا جفت باز، دارای  $2n=2x=34$  کروموزوم می‌باشد (Bresghehlo & Sorrells, 2006). ارقام زراعی آفتابگردان دارای دو تیپ روغنی و آجیلی می‌باشند. تیپ روغنی به دلیل درصد روغن بالا (۴۲ تا ۵۲ درصد) برای استحصال روغن مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین روغن آفتابگردان به دلیل داشتن مقدار زیادی اسید چرب غیر اشباع لینوئیک و فقدان کلسترول از مرغوبیت بالایی برخوردار است. بر اساس آمار گمرک، با توجه به اینکه در سال ۱۳۹۲ مقدار ۳۰۶۳۹ تن دانه آفتابگردان به ارزش حدود ۵۵ میلیون و ۴۳۱ هزار دلار به کشور وارد شد و بر اساس این گزارش، واردات این محصول در مقایسه با سال ۹۱ از نظر وزنی ۱۵/۷۸ درصد و از نظر ارزشی ۹۱/۴۹ درصد افزایش را نشان می‌دهد (Anonymus, 2014). بنابراین سرمایه‌گذاری در زمینه افزایش کمیّت و کیفیت دانه روغنی آفتابگردان از طریق روش‌های مختلف به‌نژادی در استقلال اقتصادی و سیاسی کشور، نقش بسیار مؤثری خواهد داشت. از طرفی ذخایر توارثی (ژرم‌پلاس) گیاهی از سرمایه‌های بسیار ارزشمند هر کشوری هستند و شناخت ماهیّت ژنتیکی و استفاده از پتانسیل آن‌ها از موضوعات مهم و زیربنایی در برنامه‌های مختلف به‌نژادی می‌باشد.

هرچند که اطلاعات کمی در رابطه با ماهیّت ژنتیکی صفات مهم و به ویژه صفاتی که بصورت کمی به ارث می‌رسند، وجود دارد (Mackay et al.,

2009)، با این وجود، در حال حاضر روش‌های مختلف ژنومیکس، امکان کالبد شکافی دقیق اساس ژنتیکی صفات کمی را فراهم ساخته است (Tuberosa et al., 2002; Semagn et al., 2010). دو روش ژنتیک کمی که اکثراً جهت فهم ارتباط بین یک ژنوتیپ و یک فنوتیپ خاص استفاده می‌شوند، شامل نقشه‌یابی پیوستگی و نقشه‌یابی ارتباطی یا نقشه‌یابی عدم تعادل پیوستگی می‌باشند. اگرچه موفقیت نقشه‌یابی پیوستگی در شناسایی QTLها برای صفات متعددی و در بسیاری از گونه‌ها به اثبات رسیده است (Mauricio, 2001; Deorge, 2002; Pasam et al., 2012; Maccaferi et al., 2010)، ولی با توجه به اینکه منطقه QTL شناسایی شده بیشتر از چند سانتی‌مورگان و شامل صدها ژن می‌باشد، شناسایی QTLهای کاندیدی مناسب را با مشکل مواجه می‌سازد. همچنین ساخت جمعیت‌های نقشه‌یابی مانند لاین‌های اینبرد نو ترکیب (Recombinant inbred lines: RIL) از طریق تلاقی‌های کنترل شده و سپس چندین نسل خودگشتی زمان‌بر بوده و این نیز خود یکی دیگر از محدودیت‌های استفاده از نقشه‌های پیوستگی می‌باشد.

نقشه‌یابی ارتباطی به عنوان یک روش جایگزین و یا مکمل جهت شناسایی ارتباطات بین نشانگر و صفت، دارای مزایای زیادی نسبت به نقشه‌یابی QTL از جمله افزایش وضوح QTL، استفاده از ژرم‌پلاس طبیعی و افزایش پوشش آلی می‌باشد (Yu et al., 2006). همچنین علاوه بر نقشه‌یابی دقیق‌تر، روش نقشه‌یابی ارتباطی می‌تواند با ژرم پلاس‌های دارای تنوع ژنتیکی بیشتر سازگار بوده و اجازه نقشه‌یابی چندین صفت به‌طور همزمان را می‌دهد و بنابراین، برای هر صفت مورد نظر نیازی به ایجاد جمعیت‌های دو والدی که خود

1. Linkage mapping
2. Association mapping
3. Linkage disequilibrium mapping

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و ارزیابی فنوتیپی

در این مطالعه ۱۰۶ لاین از مراکز مختلف تحقیقاتی آفتابگردان در ایران، اروپا و آمریکا (جدول ۱) تهیه و از لحاظ تنوع ژنتیکی و فنوتیپی ارزیابی شدند (جدول ۱). از هر لاین تعداد ۹ گلدان بزرگ ۱۰ کیلویی (ارتفاع و قطر به ترتیب ۲۵ و ۲۶ سانتی‌متر) کشت و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در محوطه گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه با مختصات طول جغرافیایی ۴۵ درجه و ۵ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۳۲ دقیقه و ۱۳۲۰ متر ارتفاع از سطح دریا چیده شدند. فاصله دو ردیف گلدان از هم ۵۰ سانتی‌متر و فاصله گلدان‌ها از هم در روی ردیف ۳۰ سانتی‌متر بود. هر گلدان به منزله یک تکرار در نظر گرفته شد. برای هر گلدان از مخلوط پیت ماس + خاک زراعی به نسبت ۱ به ۳ استفاده شد. برای انجام آبیاری از سیستم آبیاری قطره‌ای استفاده شد، به صورتی که در مراحل اولیه سبز شدن گیاهچه‌ها به صورت ۳ روز یک بار ولی بعد از سبز شدن کامل مزرعه و مصادف شدن با فصل گرما آبیاری به صورت روزانه انجام می‌گرفت. پس از سبز شدن گیاهچه‌ها در مرحله ۴ برگی تنک کردن به منظور نگه داشتن یک گیاه در هر گلدان انجام گرفت. مبارزه با علف‌های هرز بصورت مکانیکی و بنا به نیاز انجام شد. از مرحله ۸ برگی کود ۲۰-۲۰-۲۰ (NPK) به صورت ۳ روز یک بار به گلدان‌ها داده شد. به‌علاوه از کودهای Urephit 5-5-25 و Crop MaGi به صورت محلول‌پاشی روی بوته‌ها نیز استفاده شد. برای جلوگیری از خسارت پرنده‌گان، لاین‌ها در زمان گلدهی با پاکت سفید پوشانده شدند. بعد از گلدهی و پس از برداشت دانه صفات مختلف آگرومورفولوژیکی شامل ارتفاع بوته (PH)، قطر ساقه (SD)، تعداد برگ (LN)، طول پهنک برگ (LL)، عرض پهنک برگ (LW)، طول دمبرگ (PL)، قطر طبق (HD)، وزن خشک طبق

باعث هزینه اضافی ارزیابی ژنوتیپی و فنوتیپی می‌شود، نیست. این روش به‌طور گسترده‌ای در ژنتیک انسانی و جانوری که در آن‌ها ایجاد جمعیت‌های در حال تفرق بزرگ غیر ممکن می‌باشد، نیز استفاده می‌شود (DeWan *et al.*, 2006).

مطالعات قابل توجهی در مورد تعیین جایگاه‌های ژنی صفات مربوط به رشد و نمو و صفاتی که از نظر زراعی مهم می‌باشند، از قبیل زمان گلدهی و پاسخ به فتوپریود (Leon *et al.*, 2001)، مقاومت به سرما (Allinne *et al.*, 2009)، مقاومت به خشکی (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007; Abdi *et al.*, 2012)، مقاومت به انگل گل جالیز (Pérez-Vich *et al.*, 2004)، جنین‌زایی سوماتیکی (Berrios *et al.*, 2000)، مقاومت به بیماری *Diaporthe helianthi* (Bert *et al.*, 2002)، بیماری *Sclerotinia sclerotiorum* (Bert *et al.*, 2002; Davar *et al.*, 2010)، بیماری ساقه سیاه فوما (Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002; Darvishzadeh *et al.*, 2007) و بیماری *Plasmopara halstedii* (Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002) با استفاده از نقشه‌یابی پیوستگی در آفتابگردان روغنی صورت گرفته است. اما مطالعات در زمینه مکان‌یابی ارتباطی بسیار محدود است. اخیراً در مطالعه‌ای، Fusari *et al.* (2012) با روش تجزیه ارتباط یا مکان‌یابی ارتباطی، مکان‌های ژنی کنترل‌کننده مقاومت به بیماری اسکروتینیا در آفتابگردان را شناسایی کردند. ایشان با استفاده از مدل خطی مخلوط یک ژن کاندید را شناسایی کردند که ۲۰ درصد از تغییرات داده‌های فنوتیپی را توجیه می‌نمود. هدف از این تحقیق، نقشه‌یابی ارتباطی برای برخی از خصوصیات مهم آگرومورفولوژیکی لاین‌های مختلف آفتابگردان روغنی و شناسایی نشانگرهای ریزماهوره مرتبط با این صفات می‌باشد.

(HW)، وزن صد دانه (100SD)، نسبت مغز دانه به کل دانه (PDHK)، وزن خشک دانه در طبق (SY)، شاخص برداشت (HI)، تعداد روز تا گلدهی (DAYF)، و تعداد روز تا رسیدگی (DAYM) اندازه‌گیری شدند.

جدول ۱. مواد گیاهی مورد بررسی و منشأ آنها

مرکز تحقیقاتی	کشور	لاین	مرکز تحقیقاتی	کشور	لاین
ASGROW	فرانسه	H100A	USDA	آمریکا	DM2
ASGROW	فرانسه	H158A/RHA274	USDA	آمریکا	HAR4
ASGROW	فرانسه	H209A/H566R	USDA	آمریکا	SDB1
ASGROW	فرانسه	H100A/83HR4	USDA	آمریکا	SDR18
ASGROW	فرانسه	H205A/H543R	USDA	آمریکا	RHA274
ASGROW	فرانسه	H209A/LC1064	USDA	آمریکا	SDB3
ASGROW	فرانسه	AS5304	USDA	آمریکا	HA335B
ENSAT	فرانسه	LP-CSYB	USDA	آمریکا	PM1-3
ENSAT	فرانسه	ENSAT-283	USDA	آمریکا	SDR19
ENSAT	فرانسه	AS3211	USDA	آمریکا	HA337B
ENSAT	فرانسه	AS5306	USDA	آمریکا	HA304
ENSAT	فرانسه	ENSAT-254	USDA	آمریکا	RHA858
ENSAT	فرانسه	ENSAT-270	USDA	آمریکا	RHA266
ENSAT	فرانسه	1009329 2(100K)	USDA	آمریکا	KANSAS510
ENSAT	فرانسه	1009337 (100K)	SPII	ایران	16
ENSAT	فرانسه	100935 0(100K)	SPII	ایران	344
ENSAT	فرانسه	ENSAT-699	SPII	ایران	11×12
ENSAT	فرانسه	AS3232	SPII	ایران	26
ENSAT	فرانسه	PAC2	SPII	ایران	38
ENSAT	فرانسه	1009370-1(100K)	SPII	ایران	346
ENSAT	فرانسه	1009370 3(100K)	SPII	ایران	260
ENSAT	فرانسه	ENSAT-695	SPII	ایران	262
ENSAT	فرانسه	AS6305	SPII	ایران	1059
ENSAT	فرانسه	AS0-1-POP-A	SPII	ایران	36
ENSAT	فرانسه	CAY	SPII	ایران	4
ENSAT	فرانسه	A-control plastipic	SPII	ایران	30
ENSAT	فرانسه	703-CHLORINA	SPII	ایران	28
NOVARTIS	فرانسه	NS-R5	SPII	ایران	110
NOVARTIS	فرانسه	NS-B5	ASGROW	فرانسه	LC1064C
NOVARTIS	فرانسه	NSF1 A4×R5	ASGROW	فرانسه	H158A×LC1064C
NOVARTIS	فرانسه	NSF1 A5×R5	ASGROW	فرانسه	AS5305
NOVARTIS	فرانسه	AF1 POPA	ASGROW	فرانسه	RHA265
NOVARTIS	فرانسه	BF1 POPB	ASGROW	فرانسه	H100B
INRAMONT	فرانسه	TMB 51	ASGROW	فرانسه	SSD580
INRAMONT	فرانسه	QHP1	ASGROW	فرانسه	SSD581
INRAMONT	فرانسه	D34	ASGROW	فرانسه	5AS-F1/A2×R2
INRAMONT	فرانسه	H603R	ASGROW	فرانسه	8ASB2
INRAMONT	فرانسه	OES	ASGROW	فرانسه	12ASB3
INRAMONT	فرانسه	SDB2	ASGROW	فرانسه	15038
-	مجارستان	F330/03	ASGROW	فرانسه	15031
-	مجارستان	F1250/03	ASGROW	فرانسه	H158A/LC1064C
-	مجارستان	B454/03	ASGROW	فرانسه	H543R/H543R
-	مجارستان	F929/03	ASGROW	فرانسه	H156A/RHA274

ادامه جدول ۱. مواد گیاهی مورد بررسی و منشأ آن‌ها

مرکز تحقیقاتی	کشور	لاین	مرکز تحقیقاتی	کشور	لاین
RUSTICA	فرانسه	RT931	ASGROW	فرانسه	H156A/H543R
RUSTICA	فرانسه	RT948	ASGROW	فرانسه	H100A/H543R
Caussade semences	فرانسه	CSWW2X	ASGROW	فرانسه	H100A/RHA274
Caussade semences	فرانسه	9CSAS	ASGROW	فرانسه	H205A/83HR4
C.F	فرانسه	7CR16=PRH6	ASGROW	فرانسه	H158A/H543R
IFVC	صربستان	803-1	ASGROW	فرانسه	H209A/83HR4
BRN	فرانسه	5DES20QR	ASGROW	فرانسه	H157A/LC1064
-	اروپای شرقی	11/4N-P	ASGROW	فرانسه	H100A/LC1064
-	فرانسه	H049+FSB	ASGROW	فرانسه	H100A/90R78
-	فرانسه	H543R	ASGROW	فرانسه	AS613

(Germany) مطابق با روش Kholghi *et al.* (2012) به صورت Toucdown انجام گرفت. تفکیک محصولات تکثیری با استفاده از ژل آگارز ۳ درصد و بافر TBE نیم برابر با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۲-۱/۵ ساعت انجام و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. برای تعیین اندازه باندها نیز از نشانگر اندازه O'GeneRuler<sup>TM</sup> (شرکت فرمنتاز) استفاده شد.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

امتیازدهی باندها به صورت یک برای وجود باند و صفر برای عدم وجود باند انجام گرفت. ماتریس صفر و یک به منظور ارزیابی ساختار جمعیت مورد بررسی استفاده شد. میزان اطلاعات چند شکلی (Polymorphic Information Content: PIC) با استفاده از نرم افزار GenAEx نسخه ۶,۴۱ محاسبه شد (Anderson *et al.*, 1993).

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

در این فرمول  $P_i$  فراوانی آلل  $i$ ام می‌باشد. دسته‌بندی دقیق لاین‌ها به زیر جمعیت‌های مناسب و تشخیص لاین‌های مختلط با استفاده از روش بیزین 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

### استخراج DNA و ارزیابی ژنوتیپی

از گیاهچه‌های ۱۵ روزه نمونه‌های برگی انتخاب و DNA ژنومی آن‌ها بر اساس روش Dellaporta *et al.* (1983) استخراج شد. کیفیت و کمیّت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و اسپکتوفتومتری ارزیابی شد. از ۳۳۹ نشانگر SSR توسعه یافته در دانشگاه ارگون آمریکا 'ORS' (Tang *et al.*, 2002) و ۱۸۰ نشانگر SSR توسعه یافته در INTA آرژانتین 'HA' (Paniego *et al.*, 2002)، ۳۰ مکان SSR (جدول ۳) بر اساس توازن در پوشش مناسب ژنوم و وضوح در باندهای چند شکل تولیدی انتخاب شدند (Tang *et al.*, 2002; Poormohammad Kiani *et al.*, 2007). واکنش PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر حاوی تک DNA پلی‌مراز (با غلظت نهایی ۰/۵ واحد) به میزان ۰/۱۶ میکرولیتر، بافر PCR (با غلظت ۱۰ برابر) به مقدار ۲ میکرولیتر،  $MgCl_2$  (با غلظت ۵۰ میلی‌مولار) به میزان یک میکرولیتر، dNTP (با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) به مقدار ۰/۸ میکرولیتر، آغازگرهای مستقیم و معکوس (با غلظت ۱۰ میکرومولار) هر کدام به مقدار ۰/۸ میکرولیتر، آب دیونیزه استریل به مقدار ۴/۴۴ میکرولیتر و ۵ میکرولیتر DNA با غلظت ۵ نانوگرم بود. به منظور اختصاصی‌تر شدن اتصالات اولیه آغازگر-DNA الگو، PCR توسط دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient: Eppendorf AG, Hamburg, Type 5331,

منظور محاسبه آماره‌های توصیفی ارزش‌های فنوتیپی از نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۶ استفاده شد.

## نتایج و بحث

### آماره‌های توصیفی

جنبه‌های مهم توزیع مشاهدات صفات مورد مطالعه شامل شاخص‌های حداقل، حداکثر، میانگین، دامنه تغییرات و انحراف معیار در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که ژرم پلاسما آفتابگردان مورد مطالعه دارای تنوع بالایی از نظر اکثر صفات آگرومورفولوژیکی مورد ارزیابی می‌باشند. بنابراین لاین‌های مورد مطالعه از لحاظ این صفات با داشتن سطح بالای تنوع می‌توانند در برنامه‌های مختلف اصلاحی تولید ارقام با عملکرد بالا مورد استفاده به‌نژادگران قرار گیرند. (Nooryazdan *et al.*, 2010) نیز تنوع بالایی را بر اساس شاخص‌های مختلف تنوع مانند دامنه و ضریب تغییرات در آفتابگردان روغنی گزارش نمودند.

### ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار آن در

#### ژرم‌پلاسما آفتابگردان مورد مطالعه

به منظور ارزیابی تنوع و ساختار ژنتیکی ۱۰۶ لاین آفتابگردان روغنی از ۳۰ جفت آغازگر ریزماهوره با توزیع و پوشش ژنومی مناسب استفاده شد (Paniego *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2002). در کل ۷۱ مکان توسط ۳۰ نشانگر مورد استفاده تکثیر شد که از این تعداد ۶۲ مکان (۸۷ درصد) چندشکل بودند. میزان محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) از ۰/۰۶ (آغازگر ORS718) تا ۰/۶۹ (آغازگر HA3040) با میانگین ۰/۳۵ متغیر بود (جدول ۳). بالا بودن چند شکلی بدست آمده در پژوهش حاضر را می‌توان به کارایی بالای این نشانگرها، وسعت مناطق جغرافیایی نمونه‌برداری شده و همچنین تعداد زیاد ژنوتیپ‌های مورد بررسی نسبت داد (Mokrani *et al.*, 2002). در این بررسی در کل مقادیر PIC بسیاری از آغازگرهای مورد استفاده زیاد بود که

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 زیر جمعیت‌ها ۵ تکرار منظور گردید. برای این منظور از مدل Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰ تکرار آزمایش (Burn-in) و ۱۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) 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 برآورد ضرایب احتمال عضویت هر لاین 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) تعریف می‌شود (Spataro *et al.*, 2011). تعداد واقعی زیرجمعیت (K)، با استفاده از دو روش برآورد شد: یکی بر اساس معیار انتخابی در Structure یعنی  $\ln P(D)$  که احتمال پسین داده‌ها را با در نظر گرفتن K فرضی محاسبه می‌کند، و دیگری بر اساس روش Evanno و همکاران (Evanno *et al.*, 2005). این روش بر آماره  $\Delta K$  استوار است که شیب تابع احتمالی  $\ln P(D)$  را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی در آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد. شناسایی نشانگرهای مرتبط و دارای ارتباط معنی‌دار با صفات مورد ارزیابی، بر اساس مدل خطی عمومی (GLM) وابسته به ماتریس Q (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت) و مدل خطی مخلوط (MLM) وابسته به ماتریس  $Q + K$  (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت + ماتریس روابط خویشاوندی) جهت جلوگیری از ارتباط کاذب بین نشانگر- صفت، با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 انجام گرفت. به

نشان دهنده انتخاب صحیح و کارایی بالای این آغازگرها می‌باشد. مقادیر بالای PIC و چندشکلی برای نشانگرهای ریزماهواری در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (Yu et al., 2002; Darvishzadeh et al., 2010). از طرفی از آنجا که نواحی ریزماهواری در یوکاریوت‌ها با فراوانی بالا در سراسر ژنوم پراکنده‌اند، بنابراین استفاده از این روش می‌تواند سطح بالایی از چندشکلی را آشکار سازد (Zietkiewicz et al., 1994).

جدول ۲. مقادیر آماره‌های توصیفی صفات مختلف ارزیابی شده در لاین‌های آفتابگردان روغنی مورد مطالعه

صفات	حداقل	حداکثر	میانگین	دامنه تغییرات	انحراف معیار
PH (سانتی‌متر)	۴۳/۰	۲۰۲/۰	۱۰۶/۵	۱۵۹/۰	۲۱/۶
SD (سانتی‌متر)	۴/۰	۹/۰	۶/۳	۵/۰	۰/۸۸
LL (سانتی‌متر)	۸/۹	۲۲/۹	۱۴/۵	۱۴	۲/۰۴
LW (سانتی‌متر)	۷/۴	۲۰/۶	۱۲/۵	۱۳/۲	۲/۱
PL (سانتی‌متر)	۴/۴	۱۶/۱	۹/۰	۱۱/۷	۱/۷
HD (سانتی‌متر)	۱/۰	۴۵/۰	۱۶/۵	۴۴/۰	۴/۵
100-SD (گرم)	۲/۰	۱۷/۰	۷/۱	۱۵/۰	۲/۳
SY (گرم)	۰/۲	۹۱/۷	۳۴/۶	۹۱/۵	۱۶/۸
HW (گرم)	۰/۷	۸۱/۰	۳۰/۶	۸۰/۳	۱۳/۶
DayF (روز)	۵۴/۰	۸۲/۰	۶۴/۳	۲۸/۰	۴/۶
DayM (روز)	۱۲/۰	۱۲۶/۰	۱۲۵/۵	۱۱۴/۰	۳/۳
LN	۱۳/۰	۸۷/۰	۲۴/۲	۷۴/۰	۴/۹
PDHK	۰/۲۳	۱/۱	۰/۷۲	۰/۸۷	۰/۱۳
HI	۰/۰۰۲	۰/۴۸	۰/۱۹	۰/۴۷۸	۰/۱۱

PH: ارتفاع بوته، SD: قطر ساقه، LN: تعداد برگ، LL: طول پهنک برگ، LW: عرض پهنک برگ، PL: طول دم‌برگ، HD: قطر طبق، 100SD: وزن صد دانه، SY: وزن خشک دانه در طبق، HW: وزن خشک طبق، PDHK: نسبت مغز دانه به کل دانه، HI: شاخص برداشت، DayF: تعداد روز تا گلدهی و DayM: تعداد روز تا رسیدگی.

می‌تواند به منظور اجتناب از شناسایی ارتباطات مثبت دروغین بین نشانگرها و صفات استفاده گردد (Pritchard & Donnelly, 2001) و به همین منظور در این بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت و دسته‌بندی دقیق افراد به زیر جمعیت‌های مناسب به روش بی‌زین در نرم افزار Structure انجام گرفت و بر اساس نتایج بدست آمده ۵ زیر جمعیت احتمالی ( $K=5$ ) در ژرم‌پلاسما مورد مطالعه شناسایی شد (شکل ۱) و  $K=5$  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 ۲)، از کل ۱۰۶ لاین آفتابگردان روغنی مورد مطالعه، ۳۷ لاین (۳۴/۹ درصد) ساختار مخلوط، ۱۵ لاین (۱۴/۲ درصد) به هر کدام از

در مطالعات ژنتیکی، ساختار جمعیت برای توضیح روابط افراد در درون و بین جمعیت‌ها استفاده می‌شود و چشم‌اندازی از روابط تکاملی افراد در یک جمعیت را ارائه می‌نماید. همچنین در مطالعات تجزیه ارتباط در حالت ایده‌آل نباید ساختاری در جمعیت مورد مطالعه وجود داشته باشد، یعنی جمعیت نباید خود به لحاظ ساختاری به زیرگروه‌ها تقسیم شود، زیرا وجود ساختار در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند عامل بازدارنده در جهت دستیابی به نتایج قابل اعتماد باشد و در صورتی که اثر عوامل ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در تجزیه ارتباط در نظر گرفته نشوند، نتایج مثبت کاذب بوجود خواهد آمد (Bresghehlo & Sorrells, 2006). بنابراین آگاهی از ساختار جمعیت به عنوان یک پیش‌نیاز در نقشه‌یابی ارتباطی

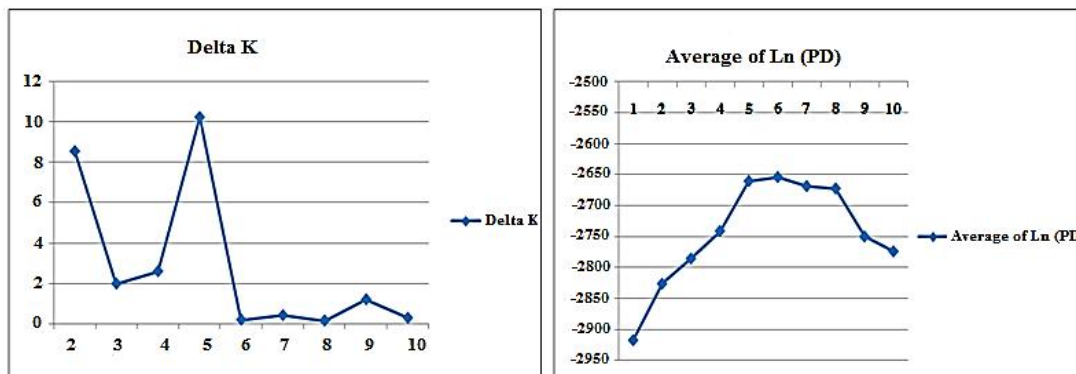
ساختارهای اول، دوم، سوم و چهارم و ۹ لاین (۸/۵) MONTPOL، ۴۰/۶ درصد از گروه ASGROW و (درصد) به ساختار پنجم تعلق داشتند. در کل ۶۶/۷ درصد از لاین‌های متعلق به گروه INRA- داشتند. ۳۵/۷ درصد از گروه USDA-USA ساختار مخلوط داشتند.

جدول ۳. لیست نشانگرها و خصوصیات آن‌ها

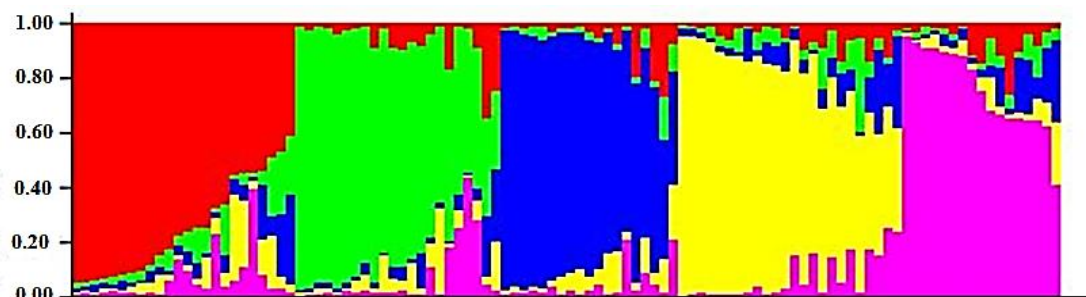
نشانگر	موتیف	توالی آغازگر رفت (۵'-۳')	توالی آغازگر برگشت (۵'-۳')	گروه پیوستگی	موقعیت (CM)	PIC
ORS785	(AG) <sub>17</sub>	CAAAATACCCAGGTCAAAGCA	CCTAGCTTATGGGACGTATGGA	LG4	۵۳/۸	۰/۵۰
ORS807	(AG) <sub>15</sub>	CCGATATTTTGACCGATATTTTGC	TCTCACCTTCATCTCCTTCC	LG16	۶۷/۹	۰/۵۱
ORS608	(AT) <sub>6</sub> (AG) <sub>11</sub>	CATGGAAAGCCGAGTTCCTCT	CGTGCCTGATTAACATACCC	LG6	۴۴/۷	۰/۱۲
ORS609	(AG) <sub>20</sub>	GCGAAGGAAGTGAACCGATA	GGATTTTAGTCCGCCAATCA	LG12	۵۶/۰	۰/۲۳
ORS1079	(CT) <sub>26</sub>	TACGACTGACGATTCCATTCTC	AACTGGATTTCACAGGGAGTGTT	LG14	۱۴/۴	۰/۲۷
ORS718	(CT) <sub>13</sub>	CACTTTACGCACACCAAACC	ATGCAACACCCGAATCAAAG	LG3	۳۰/۲	۰/۰۶
ORS1265	(CT) <sub>18</sub>	GGGTTTAGCAAATAATAGGCACA	ACCCTTGGAGTTTAGGGATCA	LG9	۲۵/۰	۰/۴۴
ORS949	(AC) <sub>13</sub>	TGCAAGGTATCCATATCCACAA	TATACGCACCGAAAGAAAGTC	LG3	۳۸/۷	۰/۴۸
ORS378	(GT) <sub>17</sub>	GTGAAACCTTCGGACCTCTG	GTACAAAACCTATAAATAAAACAATA	LG16	۸۶/۳	۰/۵۰
ORS694	(AG) <sub>17</sub>	CCTGGAAGTGAACCGAGAAC	GCCGTGAAACAGAGAGAGGA	LG14	۳۵/۸	۰/۴۶
ORS621	(CT) <sub>14</sub>	CGCCTTATGCTGAGAGGAAA	CCTGAAGCGAAGAAGAATCG	LG11	۱/۱	۰/۲۰
ORS488	(AC) <sub>14</sub>	CCCATTCACTCTCTGTTTCCA	CTCCGGTGAGGATTGGATT	LG3	۶۷/۲	۰/۱۱
ORS728	(AG) <sub>7</sub>	CTCCATAGCAACCACCTGAAA	CCAAACTCTGAATGATACTTGTGAC	LG1	۲۵/۲	۰/۴۹
ORS844	(AC) <sub>17</sub>	ACGATGCAAAGAATACTACTGCAC	CATGTTTAAATAGGTTTAAATCTAGGG	LG9	۷۵/۵	۰/۴۲
ORS878	(AC) <sub>11</sub>	TGCAAGGTATCCATATCCACAA	TATACGCACCGAAAGAAAGTC	LG10	۲۹/۹	۰/۴۸
ORS1179	(AG) <sub>18</sub>	GATTCGGAGCTGTTAGGAGGTAG	AAACGGGAAGCAAGAATAGAACA	LG13	۶۰/۱	۰/۰۷
ORS1215	(CT) <sub>10</sub>	ATACTCTTCCACCTCAAATCCA	GGTTGCGGTAGTGGTCTGTAGT	LG15	۷۴/۸	۰/۱۳
ORS822	(GT) <sub>8</sub>	CAATGCCATCTGTATCAGCTAC	AAACAAACCTTTGGAGGAAAACCTC	LG3	۶۹/۰	۰/۵۱
ORS1256	(GT) <sub>8</sub> (AG) <sub>25</sub>	GATGTTGATGTTGGTGAAGTTGC	CTCCGTCACCTTAAGCACTTGTA	LG6	۶۸/۴	۰/۴۹
ORS1088	(CT) <sub>15</sub>	ACTATCGAACCTCCCTCCAAAC	GGATTTCTTTCATCTTTGTGGTG	LG10	۴۹/۰	۰/۱۸
ORS617	(GA) <sub>17</sub>	GGTACTTGGTATTTCATGGGTTCAT	GACACCGCCAACCTTAACACTT	LG9	۹۲/۳	۰/۲۳
ORS1064	(CT) <sub>19</sub>	TGAATGATCTATGAGTGGTGATGG	ACTCGCAGTGGTAAGTCGTTAGG	LG16	۱۳/۷	۰/۱۱
ORS1209	(AG) <sub>12</sub>	AACAAGCAAGCAAATCAACCATA	AGAATTAACCCAACCCGGAAC	LG10	۲۷/۰	۰/۲۷
ORS1264	(AG) <sub>28</sub>	TAGAAGCGGTTGGGTTGACAGTA	TGAACTCGGTTGATTCTCTAGCC	LG2	۱۵/۷	۰/۳۲
ORS1242	(CT) <sub>14</sub>	GCAATCGTTTCACCTTCCATTC	TGGTCGTAGAATTGTCGGTTCAT	LG15	۶۳/۳	۰/۲۵
ORS630	(CT) <sub>15</sub>	TGTGCTGAGGATGATATGCAG	GCACGACCCGATATGTAAC	LG13	۴۴/۲	۰/۴۹
ORS733	(AG) <sub>21</sub>	TATGAGTTGGCAAGGGCTTC	GGACTCCAACGAGAGAATCAGT	LG11	۰/۰	۰/۵۸
ORS565	(AG) <sub>13</sub>	TGGTCAACGATTTAGAGTCAA	TCCAGTTTGGTCTTGATTTGG	-	-	۰/۴۸
HA3040	-	GACCCGAACCACACT	GTCTTGTCTTCGATCC	-	-	۰/۶۹
HS3070	-	GGGATGAGCTCTGTC	CTTTTCAATCCCGCT	-	-	۰/۱۹

PIC: Polymorphic information content, cM: Centimorgan; is a unit for measuring genetic linkage.





شکل ۱. نمودارهای دوسویه برای تعیین تعداد مناسب زیر جمعیت در ژرم پلاسما آفتابگردان روغنی مورد مطالعه ( $K=5$ ) براساس نشانگرهای ریزماهوره در نرم‌افزار Structure.



شکل ۲. تجزیه کلاستر مبتنی بر مدل Bayesian برای ۱۰۶ لاین مختلف آفتابگردان مورد مطالعه بر اساس ۳۰ مکان ریزماهوره ( $K=5$ ). هر رنگ یک زیر جمعیت یا کلاستر را نشان می‌دهد. محور عمودی ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر را نشان می‌دهد.

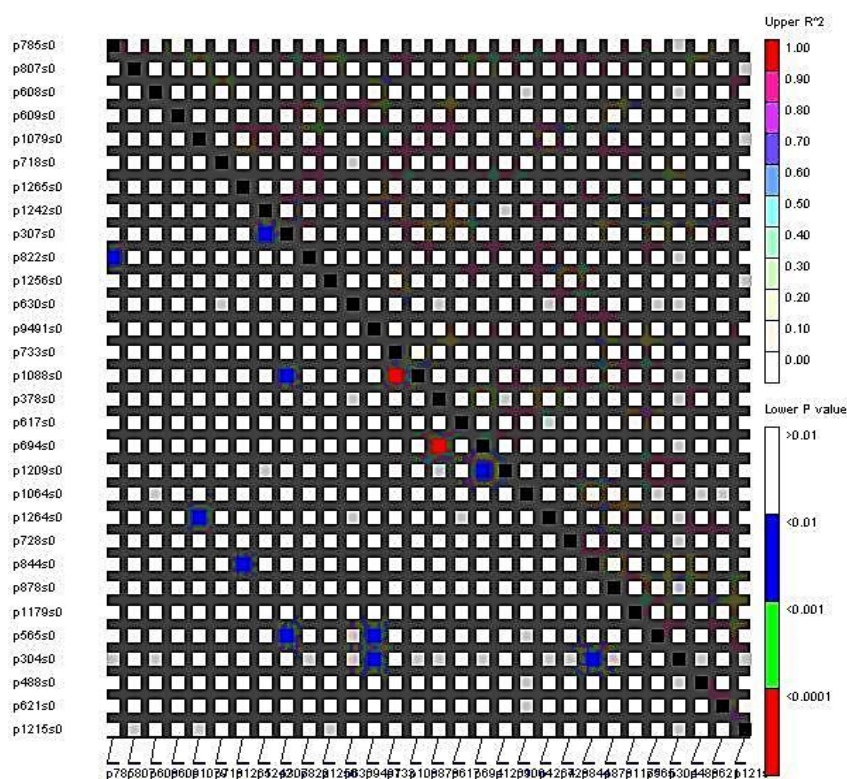
### عدم تعادل پیوستگی

در نقشه‌یابی ارتباطی که مکان‌یابی QTLها براساس عدم تعادل پیوستگی صورت می‌گیرد، علاوه بر ترکیب ساختار جمعیت، گستره عدم تعادل پیوستگی (LD) در ژنوم نیز از اهمیت اساسی برخوردار است (Al-Maskri *et al.*, 2012)، که در این بررسی از ۴۳۵ جفت نشانگر ریزماهوره ۲/۷۵۸ درصد از  $r^2$ ها معنی‌دار و بزرگ‌تر از ۰/۱ بودند ( $P\text{-value} \geq 0.1$ ,  $r^2 \leq 0.01$ ) (شکل ۳). عدم تعادل پیوستگی در مجموعه ژنتیکی تحت مطالعه، آنالیزهای مکان‌یابی ارتباطی را امکان‌پذیر می‌سازد. از عوامل افزایش‌دهنده 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 حالی که

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.*, 2007; Al-Maskri *et al.*, 2012). به‌عنوان 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 (Bresghehlo & Sorrells, 2006). یکی از دلایل این امر این است که، اتوگامی شجره را به سمت هموزیگوسیتی رانده و بنابراین تأثیر نوترکیبی در شکستن بلوک‌های عدم تعادل را منتفی می‌کند. میزان کاهش LD در گونه‌های مختلف متفاوت است و بین ۱-۲ کیلو باز در ذرت تا ۵۰ سانتی‌مورگان در آرایدوپسیس و بیش از ۵۰ سانتی‌مورگان در جو مشاهده شده است (Mather *et al.*, 2007). در کنار

نسبت به نشانگرهای دو آللی (مانند SNP، DaRT و ... ) محتمل‌تر می‌باشند. Remington *et al.* (2001) نیز دامنه نسبتاً بالاتری از LD را بین نشانگرهای SSR نسبت به نشانگرهای SNP مشاهده کردند.

اتوگامی، نوع نشانگر مورد استفاده نیز ممکن است در برآورد مقدار LD مؤثر باشد (Ching *et al.*, 2002). بر طبق نظر اسلاتکین (Slatkin, 1994)، نشانگرهای چند آللی (مانند SSR) جهت حصول یک LD معنی‌دار



شکل ۳. پلات عدم تعادل پیوستگی (LD plot). قسمت بالا قطری نشان‌دهنده میزان عدم تعادل پیوستگی و قسمت پایین قطری آماره P-value برای جفت نشانگرها را نشان می‌دهد.

در کل بر اساس نتایج حاصل از مدل GLM، ۹ نشانگر (مکان ژنی) ارتباط معنی‌داری با صفات مورد ارزیابی نشان دادند که از این تعداد، ۴ ارتباط در سطح احتمال ۵ درصد و بقیه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند. مکان‌های مرتبط و معنی‌دار بر اساس این مدل شامل ارتباط ۲ مکان با قطر ساقه، ۱ مکان با تعداد برگ، ۱ مکان با طول پهنک برگ، ۱ مکان با طول دمبرگ، ۱ مکان با نسبت مغز دانه به کل دانه و ۳ مکان با تعداد روز تا گلدهی بود (جدول ۴). بر اساس مدل ارتباطیابی MLM که به منظور دقت بیشتر و اریبی کمتر نتایج از اطلاعات بیشتری نسبت به مدل

## مکان‌یابی ارتباطی بر اساس مدل‌های

### GLM و MLM

به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با برخی از صفات مهم آگرومورفولوژیک در لاین‌های مختلف آفتابگردان روغنی، مکان‌یابی ارتباطی بر اساس مدل خطی عمومی (GLM) وابسته به ماتریس Q (ماتریس ضرایب احتمال عضویت هر فرد به هر یک از زیرجمعیت‌ها) و همچنین مدل خطی مخلوط (MLM) وابسته به ماتریس‌های Q+K (ماتریس روابط خویشاوندی) با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 انجام گرفت.

GLM جهت شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات استفاده می‌کند، تعداد ۱۶ مکان مرتبط با صفات مورد ارزیابی شناسایی شد که شامل ارتباط ۲ مکان با قطر ساقه، ۱ مکان با تعداد برگ، ۱ مکان با طول پهنک برگ، ۲ مکان با طول دم‌برگ، ۱ مکان با قطر طبق، ۴ مکان با وزن صد دانه، ۲ مکان با تعداد روز تا گلدهی و ۱ مکان با هر یک از صفات وزن خشک دانه در طبق، وزن خشک طبق و شاخص برداشت بود (جدول ۴).

جدول ۴. نشانگرهای پیوسته با صفات ارزیابی شده در لاین‌های آفتابگردان روغنی مورد مطالعه بر اساس مدل‌های GLM و MLM

صفت	نشانگر	موقعیت (CM)	مدل GLM		مدل MLM		
			P-value	R <sup>2</sup>	F-value	P-value	
SD	ORS1265	۲۵/۰	۰/۰۰۵	۰/۱۳	۴/۶	۰/۰۲	
	ORS949	۳۸/۷	۰/۰۰۲	۰/۱۶	۵/۵	۰/۰۰۶	
LN	ORS822A	۶۹/۰	۰/۰۳	۰/۱۳	۳/۱	۰/۰۲	
LL	ORS378	۸۶/۳	۰/۰۱	۰/۱۱	۳/۳	۰/۰۴	
LW	ORS807	۶۷/۹	۰/۶۱	۰/۰۶	۲/۶	۰/۰۸	
PL	ORS1265	۲۵/۰	۰/۰۲	۰/۱۲	۳/۳	۰/۰۴	
	ORS1088	۴۳/۰	۰/۱۷	۰/۰۶	۴/۵	۰/۰۳	
	ORS1179	۶۰/۱	۰/۵۶	۰/۰۵	۳/۴	۰/۰۷	
HD	ORS1242	۶۳/۳	۰/۶۳	۰/۰۴	۳/۴	۰/۰۷	
	ORS949	۳۸/۷	۰/۱۸	۰/۰۸	۳/۳	۰/۰۴	
100-SD	ORS807	۶۷/۹	۰/۶۱	۰/۰۶	۱/۴	۰/۲۴	
	OSR609	۵۶/۰	۰/۵۱	۰/۰۷	۱/۹	۰/۱۶	
	HS3070	-	۰/۵۹	۰/۱۰	۴/۲	۰/۰۰۴	
	ORS1209	۲۷/۰	۰/۲۱	۰/۱۶	۲/۱	۰/۰۵	
	ORS822	۶۹/۰	۰/۸۵	۰/۱۱	۲/۶	۰/۰۳	
	ORS1179	۶۰/۱	۱/۰۰	۰/۰۳	۶/۱	۰/۰۲	
SY	ORS1064	۱۳/۷	۰/۲۴	۰/۰۸	۳/۹	۰/۰۲	
HW	ORS822A	۶۹/۰	۰/۳۲	۰/۱۲	۲/۴	۰/۰۴	
	ORS949	۳۸/۷	۰/۴۳	۰/۰۷	۲/۶	۰/۰۸	
PDHK	ORS1209	۲۷/۰	۰/۰۴	۰/۲۲	۳/۲	۰/۰۰۴	
DayF	HI	ORS1064	۱۳/۷	۰/۱۰	۰/۰۹	۴/۴	۰/۰۲
		ORS608	۴۴/۷	۰/۳۶	۰/۰۶	۱/۶	۰/۲۰
		ORS1265	۲۵/۰	۰/۰۱	۰/۱۲	۲/۶	۰/۰۸
		ORS822	۶۹/۰	۰/۰۰۵	۰/۲۰	۳/۱	۰/۰۱
		ORS1256	۶۸/۴	۰/۶۸	۰/۰۴	۱/۲	۰/۲۷
		ORS733	۰/۰	۰/۰۲	۰/۲۰	۳/۲	۰/۰۱
		ORS1088	۴۹/۰	۰/۶۷	۰/۰۵	۰/۸۲	۰/۳۷
		ORS378	۸۶/۳	۰/۰۸	۰/۱۲	۱/۵	۰/۲۳

SD: قطر ساقه، LN: تعداد برگ، LL: طول پهنک برگ، LW: عرض پهنک برگ، PL: طول دم‌برگ، HD: قطر طبق، 100-SD: وزن صد دانه، SY: وزن خشک دانه در طبق، HW: وزن خشک طبق، PDHK: نسبت مغز دانه به کل دانه، HI: شاخص برداشت و DayF: تعداد روز تا گلدهی.

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).

### نتیجه‌گیری کلی

در کل نتایج مطالعه حاضر کارایی استفاده از روش مکان‌یابی ارتباطی و مدل MLM در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات ارزیابی شده در لاین‌های آفتابگردان روغنی مورد مطالعه را نشان می‌دهد. البته لازم است نشانگرهای شناسایی شده در چنین مطالعاتی در جمعیت‌های بزرگ 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 اصلاحی افزایش یابد. همچنین با توالی‌یابی QTL‌های دارای  $R^2$  بالا (ORS1209، ORS822 و ORS649) می‌توان به یافتن ژن‌های کدکننده این صفات و همچنین نشانگرهایی که دارای ارتباط بیشتری با آن‌ها هستند، جهت اشباع نقشه‌های پیوستگی امیدوار بود.

### سپاسگزاری

بدینوسیله نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه که امکانات لازم برای انجام این تحقیق را فراهم نمودند، صمیمانه تشکر نمایند.

### REFERENCES

- Abdi N, Darvishzadeh R, Jafari M, Pirzad A, 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*. 5(2): 149-158.
- 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.
- Andersen JR, Zein I, Wenzel G, Krützfeldt B, Eder J, Ouzunova M, Lübberstedt T

Yu و Buckler (۲۰۰۶) نیز به منظور بهبود نتایج و به عبارتی کاهش نتایج مثبت دروغین از مدل MLM در بررسی صفاتی مانند زمان گل‌دهی، وزن خوشه و قطر خوشه در ذرت استفاده نمودند و نتایج دقیق‌تری را در مقایسه با مدل‌های خطی منفرد K یا Q گزارش نمودند. Vanitha و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از نشانگرهای SSR، ۲۹ نشانگر را در آفتابگردان شناسایی نمودند که رابطه معنی‌داری با صفات مختلف آگرومورفولوژیک نشان می‌دادند. Fusari و همکاران (۲۰۱۲) با روش تجزیه ارتباط، مکان‌های ژنی کنترل‌کننده مقاومت به بیماری اسکروتینیا در آفتابگردان را شناسایی کردند. ایشان با استفاده از مدل خطی مخلوط (MLM) یک ژن کاندید شناسایی کردند که ۲۰ درصد از تغییرات داده‌های فنوتیپی را توجیه می‌نمود. همچنین تکنیک نقشه‌یابی ارتباطی در سایر گیاهان زراعی مانند گندم (Liu, 2011)، جو (Wang *et al.*, 2012)، ذرت خوشه‌ای (Shehzad *et al.*, 2009) و ذرت (Anderson *et al.*, 2007) نیز استفاده شده است. تعدادی نشانگر مشترک برای صفات مختلف هم با مدل خطی عمومی و هم با مدل خطی مخلوط شناسایی شدند. به‌عنوان نمونه ارتباط و پیوستگی نشانگر ریزماهورهای ORS1265 با صفات قطر ساقه (SD)، طول دم‌برگ (PET)، تاریخ گل‌دهی (DF) (جدول ۴) و نشانگر ریزماهورهای ORS822 با صفات تعداد کل برگ (LN)، وزن صد دانه (HS)، تاریخ گل‌دهی (DF)، وزن خشک طبق (DC) بر اساس مدل MLM (جدول ۴) می‌تواند

- (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.
- Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome.* 36: 181-186.
- Anonymus (2014) Custom statistics of Islamic Republic of Iran. Ministry of Economic and Wealth affairs.
- Berrios EF, Gentzbittel L, Kayyal H, Alibert G, 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(8): 1299-1306.
- Bert PF, Jouan I, Labrouhe TD, Serre F, Nicolas P, Vear F (2002) Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*. *Theor. Appl. Genet.* 105: 985-993.
- Breseghele F, Sorrells ME (2006) Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics.* 172: 1165-1177.
- Ching A, Caldwell KS, Jung M, Dolan M, Smith OS, Tingey S, Morgante M, Rafalski AJ (2002) SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics.* 3:19.
- Darvishzadeh R, Azizi M, Hatami-Maleki H, Bernousi I, Abdollahi Mandoulakani B, Jafari M (2010) Molecular characterization and similarity relationships among sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines using some mapped simple sequence repeats. *Afric. J. Biotech.* 9(43): 7280-7288.
- Darvishzadeh R, Poormohammad Kiani S, Dechamp-Guillaume G, Gentzbittel L, Sarrafi A (2007). Quantitative trait loci associated with isolate specific and isolate nonspecific partial resistance to *Phoma macdonaldii* in sunflower. *Plant Pathol.* 56: 855-861.
- 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.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4): 19-21.
- DeWan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DTL (2006) HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science.* 314: 989-992.
- Doerge RW (2002) Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat. Genet.* 3(1): 43-52.
- 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/>.
- 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 Biol.* 12(93): 1-13.
- Gupta PK, Rustgi S, Kulwal PL (2005) Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Mol. Biol.* 57: 461-485.
- 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.
- Kholghi M, Darvishzadeh R, Bernousi I, Pirzad A, Hernan L (2012) Assessment of genomic diversity among and within Iranian confectionery sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations by using simple sequence repeat markers. *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci.* 62(6): 488-498.
- Leon AJ, Lee M, Andrade FH (2001) Quantitative trait loci for growing degree days to flowering and photoperiod response in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 102: 497-503.
- 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.). Mol. Breed. 1(5): 1-10.
- Maccaferri M, Sanguineti MC, Demontis A, El-Ahmed A, Garcia del Moral L, Maalouf F, Nachit M, Nserallah N, Ouabbou H, Rhouma S, Royo C, Villegas D, Tuberosa R (2011) Association mapping in durum wheat grown across a broad range of water regimes. J. Exp. Bot. 14: 287-293.
- Mackay TF, Stone EA, Ayroles JF (2009) The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. Nat. Rev. Genet. 10(8): 565-577.
- Mather KA, Caicedo AL, Polato NR, Olsen KM, McCouch S, Purugganan MD (2007) The extent of linkage disequilibrium in rice (*Oryza sativa* L.). Genetics. 177: 2223-2232.
- Mauricio R (2001) Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. Nat. Genet. 2(5): 370-381.
- Mokrani L, Gentzbittel L, Azanza F, Fitamant L, Al-Chaarani G, 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(1): 149-156.
- Nooryazdan H, Serieys H, Bacilieri R, David J, Berville A (2010) Structure of wild annual sunflower (*Helianthus annuus* L.) accessions based on agro-morphological traits. Genet. Resour. Crop Evol. 57(1): 27-39.
- Oraguzie NC, Wilcox PL, Rikkerink EHA, de Silva HN (2007) Linkage disequilibrium, Association Mapping in Plants. Springer. New York. NY. pp: 11-39.
- Panigo N, Echaide M, Muñoz M, Fernández L, Torales S, Faccio P, Fuxan I, Carrera M, Zandomeni R, Suárez EY, Hopp HE (2002) Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Genome. 45(1): 34-43.
- Pasam RK, Sharma R, Malosetti M, Van Eeuwijk FA, Haseneyer G, Kilian B, Garner A (2012) Genome-wide association studies for agronomical traits in a world wide spring barley collection. BMC Plant Biol. 12(1):16.
- Pérez-Vich B, Akhtouch B, Knapp SJ, León AJ, Velasco L, Fernández-Martínez JM, Berry ST (2004) Quantitative trait loci for broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) resistance in sunflower. Theor. Appl. Genet. 109: 92-102.
- Poormohammad Kiani S, Grieu P, Maury P, Hewezi T, Gentzbittel 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.). Theor. Appl. Genet. 114: 193-207.
- Pritchard JK, Donnelly P (2001) Case-control studies of association in structured or admixed populations. Theor. Pop. Biol. 60: 227-237.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 155: 945-959.
- Rachid Al-Chaarani G, Roustae A, Gentzbittel L, Mokrani L, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, Sarrafi A (2002) A QTL analysis of sunflower 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.
- Remington DL, Thornsberry JM, Matsuoka Y, Wilson LM, Whitt SR, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES IV (2001) Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 11479-11484.
- Semagn K, Bjørnstad A, Xu Y (2010) The genetic dissection of quantitative traits in crops. Electronic Journal of Biotechnology. 13(5): 1-45.
- 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.
- Slatkin M (1994) An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. Genetic Research. 64: 71-74.
- 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.

- Tang S, Yu JK, Slabaugh M, Shintani D, Knapp J (2002) Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor. Appl. Genet.* 105(8): 1124-1136.
- 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. *Ann. Bot.* 89: 941-963.
- Vanitha J, Manivannan N, Chandirakala R (2014) Qualitative trait loci analysis for seed yield and component traits in sunflower. *Afric. J. Biotech.* 13(6): 754-761.
- 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.
- Yu J, Buckler ES (2006) Genetic association mapping and genome organization of maize. *Curr. Opin Biotechnol.* 17(2): 155-160.
- Yu JK, Mangor J, Thompson L, Edwards KJ, Slabaugh MB, Knapp SJ (2002) Allelic diversity of simple sequence repeats among elite inbred lines of cultivated sunflower. *Genome.* 45(4): 652-660.
- Yu JM, Pressoir G, Briggs WH, Bi IV, Yamasaki M (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat. Genet.* 38: 203-208.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics.* 20(2): 176-183.