

شناسایی نشانگرهای REMAP مرتبط با صفات مورفو-فیزیولوژیکی و زراعی در آفتابگردان دانه روغنی (*Helianthus annuus* L.) تحت شرایط آبیاری معمول و کم آبیاری

نسرین اکبری^۱، رضا درویش زاده^{۲*}

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات-ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

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

* مسئول مکاتبه: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

DOI: 10.22034/CSRAR.2024.382749.1316

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۲

چکیده

تغییرات اقلیمی، کاهش سطح آب دریافتی از بارندگی‌ها و مدیریت‌های نادرست مصرف آب، تولید محصولات زراعی را با تنش خشکی طی دوره رشد مواجه می‌کند که سبب نوسان و کاهش محصول می‌گردد. در این بین آفتابگردان دانه روغنی، با تحمل نسبی به تنش خشکی و همچنین کیفیت بالای روغن تولیدی بیشتر مورد توجه است. در این بررسی، ۱۰۰ ژنوتیپ آفتابگردان دانه روغنی در قالب طرح لاتیس ساده ۱۰×۱۰ با دو تکرار تحت دو شرایط آبیاری معمول و کم آبیاری طی دو سال متوالی (سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳) در مزرعه‌ای در روستای قزلجه از توابع شهرستان سلماس مورد ارزیابی قرار گرفتند. از نشانگرهای REMAP جهت شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفو-فیزیولوژیکی و زراعی در آفتابگردان دانه روغنی استفاده شد. براساس مدل خطی مخلوط در مجموع تحت هر دو شرایط آبیاری معمول و کم آبیاری ۲۰ نشانگر مولکولی با صفات مورد بررسی ارتباط معنی‌دار نشان دادند. نشانگر "6181810" با صفت روغن و نشانگر "cf8267" با دو صفت طول و عرض برگ تحت شرایط تنش محدودیت آبیاری و نشانگر "658268" با صفات عملکرد دانه و عرض برگ تحت هر دو شرایط آبیاری معمول و کم آبیاری ارتباط معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد نشان دادند. مشاهده ارتباط بین یک نشانگر با چند صفت می‌تواند نشأت گرفته از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد. در این بین شناسایی نشانگرهایی مانند نشانگرهای "658268" و "cf8267" که با چند صفت و در هر دو شرایط (آبیاری معمول و کم آبیاری) ارتباط معنی‌دار نشان دادند، به دلیل امکان‌پذیر نمودن بهبود همزمان چند صفت از اهمیت بیشتری در برنامه‌های به‌نژادی برخوردار هستند.

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

مقدمه

آبیاری تکمیلی کشت می‌شود. بنابراین، کیفیت محصول آن تحت تأثیر شرایط محیطی از قبیل گرما و خشکسالی قرار می‌گیرد (Robert *et al.*, 2015).

تنش خشکی، یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده در حفظ تورژسانس طبیعی می‌باشد، که متعاقب آن، روزه‌ها بسته شده و در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مانند فتوسنتز، تنفس، انتقال و جذب یون، متابولیسم مواد مغذی و هورمون‌ها وقفه ایجاد می‌شود. این نارسایی‌ها، در واقع با مهار تقسیم سلولی، رشد و توسعه و عملکرد گیاه را متأثر می‌سازند (Skirycz *et al.*, 2011; Bhatt and Rao, 2005). در طی چند دهه اخیر به واسطه گرمایش زمین شاهد تغییر در محدوده‌های دمایی در کشاورزی و بروز تنش‌های خشکی و دمایی هستیم، بدین‌سان عملکرد محصولات زراعی از جمله آفتابگردان به طور مکرر هر سال دست خوش تغییر می‌گردد. به

آفتابگردان یکی از مهم‌ترین گیاهان دانه روغنی است که حاوی ۴۰-۵۰ درصد روغن و ۱۷-۲۰ درصد پروتئین می‌باشد (Bhutta, 1998; Sharfun-Nahar and Hashmi, 2005; Fernandez *et al.*, 2019). گیاه آفتابگردان به عنوان یک گیاه دانه روغنی، جایگاه پنجم جهان را بعد از سویا، کلزا، پنبه و بادام زمینی به خود اختصاص داده است (Seiler and Guly, 2016). روغن آفتابگردان علاوه بر مصارف تغذیه‌ای و پزشکی (Radanović *et al.*, 2018)، دارای مطلوبیت کافی جهت مصارف در بخش صنعتی نیز می‌باشد (Fernandez *et al.*, 2012; Thirumarimurugan *et al.*, 2019). آفتابگردان به عنوان یک محصول زراعی گرمسیری و نیمه حساس به خشکی شناخته شده است، که در مناطق نیمه گرمسیری با آب و هوای نیمه خشک تا خشک و اغلب در اراضی مستعد خشکی، با

نسبت به بسیاری دیگر از نشانگرهای مولکولی دارند و همچون نشانگرهای RAPD مقرون به صرفه هستند. در واقع REMAP با شناخت محاسن و معایب دو سیستم نشانگر ریزماهواره و RAPD توسعه یافته است که تا حد زیادی چالش‌های اصلی ناشی از دو نشانگر را برطرف می‌کند (Liu *et al.*, 2020). نشانگرهای REMAP که به طور گسترده در ژنوم بسیاری از گونه‌های گیاهی پراکنده شده‌اند، در تعیین خصوصیات و مطالعات روابط ژنتیکی در گونه‌های مختلف گیاهی کارآمد هستند (Salazar *et al.*, 2014).

رویکردهای به‌نژادی کلاسیک برای بهبود عملکرد و صفات زراعی مرتبط، به دلیل وراثت‌پذیری پایین و بی‌ثباتی این صفات چندان سودمند نیستند، بنابراین رویکردهای به‌نژادی مولکولی مانند نقشه‌برداری QTL و انتخاب به کمک نشانگر برای اصلاح تحمل تنش خشکی در گیاهان استفاده می‌شود (Bankole *et al.*, 2017). QTLها اساساً به موقعیت (محل) ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی اطلاق می‌شوند، که شامل یک منطقه ژنومی، متشکل از یک ژن واحد یا خوشه‌ای از ژن‌ها می‌باشد، که بر ویژگی‌های صفات تأثیر می‌گذارند.

در گیاهان روغنی از جمله آفتابگردان جهت ارزیابی و شناسایی نشانگرهای مرتبط با درصد روغن (Dehmer and Friedt, 1998) و نشانگرهای مرتبط با تحمل تنش خشکی (Nezhadahmadi *et al.*, 2013) مطالعاتی انجام گرفته است. در آفتابگردان با استفاده از نشانگرهای ISSR¹⁰ در مجموع ۷۶ نشانگر مرتبط با صفات قطر ساقه، تعداد برگ، قطر طبق، تعداد روز تا گل‌دهی و تعداد روز تا رسیدگی معرفی شدند (Darbani *et al.*, 2020). در سویا ۶۵ QTL مرتبط با تحمل تنش خشکی معرفی شده است (Ren *et al.*, 2020). در مطالعه‌ای دیگر در سویا تحت تنش خشکی تعداد ۵۵ QTL مرتبط با صفات محتوای روغن دلنه، پروتئین دلنه، عملکرد دلنه، وزن هزار دلنه و ارتفاع بوته شناسایی شده است (Du *et al.*, 2009). در مطالعات دیگر کارایی فتوسنتز تحت شرایط تنش خشکی ارزیابی و QTLهای مرتبط با پارامترهای فلورسانس کلروفیل،

این جهت لازم است، با استفاده از روش‌های جدید به‌نژادی، بر تولید هیبریدهای متحمل به خشکی متمرکز شد (Pekcan *et al.*, 2016). با توجه به اهمیت مطالعه و گزینش ارقام روغنی متحمل به تنش‌ها به ویژه تنش شایع و مهم خشکی، بررسی تنوع ژنتیکی در پاسخ‌های سازگاری تکامل یافته در توده‌ها، ژنوتیپ‌ها و ارقام زراعی آفتابگردان و نیز شناسایی QTLهای مرتبط با آنها جهت به کارگیری علمی در برنامه‌های به‌نژادی ضروری به نظر می‌رسد.

ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام گیاهی جدید در جهت تولید هیبریدهای با عملکرد بالاتر، کیفیت بهتر، سازگار و کارآمد در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده، عمدتاً به دو روش متداول و مرسوم «کلاسیک» و «مولکولی» انجام می‌شود. روش‌های کلاسیک، مبتنی بر ارزیابی اثر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیک و یا فیزیولوژیک، مانند ارزیابی ارتفاع بوته، قطر طبق، روز تا گل‌دهی و دوره بلوغ فیزیولوژیک (Pekcan *et al.*, 2016)، یا ارزیابی تعداد برگ، قطر طبق، سطح برگ، وزن هزار دانه، عملکرد دانه و محتوای نسبی آب برگ (RWC¹) می‌باشد (Hossain *et al.*, 2010). در حالیکه روش‌های مولکولی مبتنی بر بررسی‌های آیزوایمی، سیتولوژیکی و استفاده از نشانگرهای DNA می‌باشد. نشانگرهای DNA از مهم‌ترین عوامل پیشرفت در مطالعات ژنتیک گیاهی بشمار می‌روند (Kebriyae *et al.*, 2012). نشانگرهای رتروترانسپوزونی که بخش وسیعی از ژنوم را پوشش و عملکرد ژن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Gbadegesin and Beeching, 2010)، بر اساس وجود عناصر ژنتیکی متحرک در ژنوم یوکاریوت‌ها توسعه یافته‌اند و گاه نسخه زیادی از بعضی خانواده‌های آنها مشاهده می‌شود (Kalendar *et al.*, 2011). از نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها می‌توان به نشانگرهای REMAP²، RBIP^۳، IPBS^۴ و IRAP^۵ (Amiteye, 2021) اشاره کرد. REMAP تکنیک مبتنی بر PCR^۶ است، که از ترکیب مزایای دو نشانگر SSR^۷ (ریزماهواره^۸) و RAPD^۹ برخوردار می‌باشد. نشانگرهای REMAP همانند نشانگرهای SSR سطح پلی‌مورفیسم بالاتر

⁶Polymerase chain reaction

⁷Simple sequence repeats

⁸Microsatellite

⁹Random amplified polymorphic DNA

¹⁰Inter simple sequence repeats

¹Relative water content

²Retrotransposon microsatellite amplification polymorphisms

³Retrotransposon-based insertion polymorphism

⁴Inter-primer binding site

⁵Inter-retrotransposon amplified polymorphism

دو سال (سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳) در روستای قزلجه (۳۸ درجه ۱۱ دقیقه ۵۰ ثانیه شمالی، ۴۴ درجه ۴۵ دقیقه و ۵۵ ثانیه شرقی) از توابع شهر سلماس (استان آذربایجان غربی) برای صفات مختلف مورفو-فیزیولوژیک و زراعی ارزیابی شدند. کشت در روی خطوط ۵ متری و با فاصله ۶۰ سانتی‌متر بین خطوط کشت و ۵۰ سانتی‌متر بین بوته‌ها انجام گرفت. آبیاری تا ۸ برگی پس از ۹۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A انجام گرفت. بعد از ۸ برگی در آزمایش آبیاری معمول آبیاری تا انتهای فصل رشد به روال قبلی ادامه یافت، اما در آزمایش کم آبیاری، آبیاری بعد از ۱۸۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A انجام گرفت. در هر دو آزمایش بعد از گل‌دهی و پس از برداشت دانه صفات مختلف مورفو-فیزیولوژیک و زراعی شامل ارتفاع بوته (سانتی‌متر)، قطر ساقه (سانتی‌متر)، تعداد برگ، طول برگ (سانتی‌متر)، عرض برگ (سانتی‌متر)، طول دم‌برگ (سانتی‌متر)، قطر طبق (میلی‌متر)، تعداد روز تا گل‌دهی (روز) و تعداد روز تا رسیدگی (روز)، محتوای روغن دانه (گرم)، محتوای کلروفیل (SPAD)، محتوای نسبی آب برگ (درصد) و عملکرد دانه (گرم) اندازه‌گیری شدند. صفات محتوای نسبی آب برگ (درصد) و محتوای کلروفیل در مرحله پُر شدن دانه، دو صفت محتوای روغن دانه و عملکرد دانه بعد از رسیدگی و بقیه صفات در مرحله بعد از گل‌دهی مورد ارزیابی قرار گرفتند. صفات ارتفاع بوته با متر، طول و عرض برگ، طول دم‌برگ و قطر طبق با خط‌کش، قطر ساقه با کولیس اندازه‌گیری شدند. سنجش محتوای کلروفیل در برگ‌ها با استفاده از SPAD-502 Plus، ساخت شرکت Konica Minolta ژاپن، انجام گرفت. برای سنجش محتوای نسبی آب برگ ابتدا دیسک‌هایی هم‌اندازه از برگ‌های جوان با توسعه کامل از وسط بوته تهیه و توزین و به عنوان وزن تر (FW) ثبت شد. سپس دیسک‌ها به مدت ۴ ساعت به حالت غوطه‌ور در آب دوبار تقطیر شده در محوطه تاریک با دمای ۲۵ درجه نگهداری و بعد خشک کردن با کاغذ صافی وزن اشباع آنها سنجیده و ثبت گردید (TW). در نهایت نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت داخل آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. بعد اطمینان از خشک شدن نمونه‌ها وزن خشک آنها تعیین (DW) و از فرمول زیر برای محاسبه محتوای نسبی آب برگ استفاده شد (Abdi et al., 2018).

محتوی کلروفیل و فعالیت فیتوشیمیایی PSII شناسایی و معرفی شده‌اند (Abdi et al., 2012; Mora et al., 2016). محتوای نسبی آب برگ و کلروفیل از مهم‌ترین شاخص‌های فیزیولوژیک در ارزیابی تحمل به تنش خشکی می‌باشند (Sinclair and Ludlow, 1986; Rauf and Sadaqat, 2008). در ذرت ۴ QTL که ۵۰ درصد تغییرات کلروفیل تحت تنش خشکی را توجیه می‌کنند، شناسایی شده است (Andleeb et al., 2020). در آفتابگردان ۱۷ نشانگر ISSR مرتبط با محتوای نسبی آب برگ (Darbani et al., 2020) همچنین ۳ QTL مرتبط با تغییرات کلروفیل و ۴ QTL مرتبط با محتوای آب در شرایط آبیاری نرمال و ۷ QTL مرتبط با تغییرات کلروفیل و ۲ QTL مرتبط با محتوای آب تحت شرایط تنش کم آبی با استفاده از نشانگرهای SNP شناسایی شده‌اند (Abdi et al., 2012). در برنج (*Oryza sativa* L.) با استفاده از ۹۰ نشانگر SSR، ۲۸ نشانگر ISSR، ۶ نشانگر iPBS¹ و ۹ نشانگر IRAP، دو نشانگر RM1-RM490 و RM133-3-2-3 که بر روی کروموزوم‌های ۱ و ۶ قرار دارند به عنوان تنظیم‌کننده اصلی صفات مرتبط با خشکسالی معرفی شدند (Noryan et al., 2021). از آنجا که عمده نیاز روغن خوراکی مورد مصرف در کشور از طریق واردات تأمین می‌شود؛ لزوم اولویت‌دهی به برنامه‌های به‌نژادی تولید و توسعه ارقام متحمل به خشکی در آفتابگردان روغنی از اهمیت اساسی برخوردار است. این پژوهش در راستای شناسایی نشانگرهای پیوسته با برخی صفات مورفو-فیزیولوژیک و زراعی در آفتابگردان دانه روغنی در شرایط آبیاری محدود اجرا گردیده است. شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات کمک شایانی به گزینش و معرفی ژنوتیپ‌های مطلوب و متحمل به تنش خشکی با پتانسیل عملکرد بالا در آفتابگردان دانه روغنی می‌نماید.

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 تحت دو شرایط آبیاری معمول و کم آبیاری در

¹Inter-primer binding site

تجزیه‌های آماری

ضریب تنوع ژنتیکی نی^۳ (Ne)، شاخص شانون^۴ (I) و درصد چندشکلی (P) برای نشانگرهای مورد مطالعه با استفاده از روابط زیر در نرم‌افزار GenAIEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) محاسبه شد.

$$\text{Nei's genetic diversity [D]} = \sum_{j=1}^L \frac{h_j}{L}$$

$$h_j = 1 - p^2 - q^2$$

$$I = \text{Shannon's information index} = -1 \times (p \times \ln(p) + q \times \ln(q))$$

$$P = n_{pj} / n_{\text{total}}$$

در این روابط، p و q فراوانی‌های آلی، L یا n_{total} تعداد کل مکان‌ها و n_{pj} تعداد مکان‌های پلی مورف می‌باشد.

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های مولکولی با الگوریتم Neighbor Joining در نرم‌افزار DARWin 6.0.21 (Perrier and Jacquamoud, 2006) انجام شد. تجزیه به بردارهای اصلی^۵ (PCoA) نیز به عنوان روش مکمل تجزیه خوشه‌ای با استفاده از افزار GenAIEx 6.5 انجام شد. تجزیه واریانس مولکولی جهت برآورد تنوع بین و درون گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه ساختار جمعیت به روش بی‌زین به ترتیب با نرم‌افزار GenAIEx 6.5 و نرم‌افزار Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) انجام شد. در تجزیه ساختار از مدل Admixture با ۱۰۰۰۰ بار Burn-in (دوره گرم کردن) و ۱۰۰۰۰ بار تکرار MCMC^۶ جهت حصول منحنی حداکثر درست‌نمایی استفاده شد. مقادیر زیرجمعیت فرضی اولیه (K) بین ۱ تا ۱۰ و جهت افزایش دقت، ۵ تکرار برای هر K در نظر گرفته شد و در نهایت تعداد زیرجمعیت‌های احتمالی (K بهینه) بر اساس روش delta K (ΔK) تعیین شد (Evanno *et al.*, 2005). برای K بهینه، ماتریس Qst محاسبه گردید. از نرم‌افزار TASSEL 3 (Bradbury *et al.*, 2007) جهت شناسایی نشانگرهای دارای ارتباط معنی‌دار با صفات مورد ارزیابی با استفاده از مدل خطی مخلوط (MLM) وابسته به ماتریس‌های K + Q (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت + ماتریس روابط خویشاوندی) و محاسبه میزان عدم تعادل پیوستگی (LD) استفاده شد.

$$RWC = (FW - DW) / (TW - DW) \times 100$$

به منظور ارزیابی مولکولی، استخراج DNA از ۷۸ ژنوتیپ از ۱۰۰ ژنوتیپ مورد بررسی (جدول ۱) به روش CTAB^۱ (Doyle and Doyle, 1990) انجام گرفت. در این راستا در مرحله بلوغ گیاه، نمونه برگ از ۵ بوته و جوان‌ترین برگ توسعه یافته آنها تهیه شد. سپس به منظور ارزیابی کیفی و کمی DNA استخراج شده، از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتری استفاده شد. در اسپکتروفتومتری، در رابطه با هر کدام از نمونه‌ها میزان جذب نور با طول موج ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر توسط DNA اندازه‌گیری شد و DNA نمونه‌هایی که نسبت میزان جذب در A260 به A280 در آنها در محدوده ۲-۷/۱ و نسبت میزان جذب در A260 به A230 در محدوده ۲ بود انتخاب شدند. پروفیل مولکولی ژنوتیپ‌ها با استفاده از آغازگر مبتنی بر رتروترانسپوزون REMAP (جدول ۲) تهیه گردید. واکنش‌های PCR^۲ در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، حاوی ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر (۰/۷، (KCl = 500 mM, Tris-HCl = 500 mM, pH = 8.4)، میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار (MgCl₂ 50 mM) (شرکت سیناژن، ایران)، ۰/۲۵ میلی‌مول از هر dNTP، ۱/۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سیناژن) و ۱۰ میکرولیتر از هر آغازگر به همراه آب دیونیزه در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient: Type 5331, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) انجام گرفت. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بصورت: ۴ دقیقه جهت واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد + ۳۶ چرخه، هر چرخه شامل ۴۰ ثانیه جهت واسرشت‌سازی، ۴۰ ثانیه در دمای اتصال اختصاصی مربوط به هر آغازگر و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط + ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط نهایی بود. از الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۸ درصد و بافر 0.5XTBE با ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۳ ساعت و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (1.0 mg ml⁻¹) به منظور آشکارسازی باندهای تکثیر شده استفاده شد. برای تعیین اندازه‌ی باندها از نشانگر اندازه‌ی O'GeneRuler™ (شرکت فرمنتاز، لیتوانی) استفاده گردید.

^۴I = Shannon's Information Index

^۵Principal coordinate analysis

^۶Markov Chain Monte Carlo

^۱Cetyl trimethylammonium bromide

^۲Polymerase chain reaction

^۳Ne = Nei's genetic diversity

جدول ۱- کد شناسه و منشأ ۱۰۰ ژنوتیپ آفتابگردان دانه روغنی مورد بررسی در آزمایش کم آبیاری

Code number and origin of 100 oilseed sunflower genotypes evaluated in limited irrigation experiment. Table 1

کد Code	نام لاین Line name	نام کشور Country	نام مرکز تحقیقاتی Resarch Centre	کد Code	نام لاین Line name	نام کشور Country	نام مرکز تحقیقاتی Resarch Centre
1	H100A/83HR4	فرانسه	ASGROW	51	H250A/83HR4	فرانسه	ASGROW
2	H209A/LC1064	فرانسه	ASGROW	52	RHA265	امریکا	USDA
3	H205A/H543R	فرانسه	ASGROW	53	PM1-3	امریکا	USDA
4	AS5306	فرانسه	ENSAT	54	RT948	فرانسه	RUSTICA
5	RHA858	امریکا	USDA	55	283-ENSAT	-	-
6	H209A/83HR4	فرانسه	ASGROW	56	QHP-1	فرانسه	INRAMONT
7	AS3211	فرانسه	ENSAT	57	SDR19	امریکا	USDA
8	254-ENSAT	فرانسه	ENSAT	58	HA337B	امریکا	USDA
9	AS5304	فرانسه	ASGROW	59	H100B	فرانسه	ASGROW
10	1009329.2(100K)	فرانسه	ENSAT	60	B454/03	مجارستان	-
11	270-ENSAT	فرانسه	ENSAT	61	HA304	امریکا	USDA
12	AS613	فرانسه	ASGROW	62	RT931	فرانسه	RUSTICA
13	A-FLPOPA	فرانسه	NOVARTIS	63	HA335B	امریکا	USDA
14	OES	فرانسه	INRAMONT	64	NS_B5	فرانسه	NOVARTIS
15	H100A/LC1064	فرانسه	ASGROW	65	SDB3	امریکا	USDA
16	RHA266	امریکا	USDA	66	LC1064C	فرانسه	ASGROW
17	PAC2	فرانسه	ENSAT	67	NS-R5	فرانسه	NOVARTIS
18	H157/LC1064	فرانسه	ASGROW	68	DM-2	امریکا	USDA
19	5DES20QR	فرانسه	BRN	69	H156A/RHA274	فرانسه	ASGROW
20	15038	فرانسه	ENSAT	70	SDB1	امریکا	USDA
21	1009337(100K)	فرانسه	ENSAT	71	HAR-4	امریکا	USDA
22	AS3232	فرانسه	ASGROW	72	AS5305	فرانسه	ASGROW
23	12AASB3	فرانسه	ASGROW	73	RHA274	امریکا	ASGROW
24	8ASB2	فرانسه	ASGROW	74	H158A/H543R	فرانسه	ASGROW
25	9CSA3	فرانسه	Caussade semences	75	H100A/RHA274	فرانسه	ASGROW
26	H049+FSB	فرانسه		76	H209A/H566R	فرانسه	ASGROW
27	SSD-580	فرانسه	ASGROW	77	ASO-1-POP-A	فرانسه	ENSAT
28	5AS-F1/A2*R5AS-29-F1/A2*R2	فرانسه	ASGROW	78	AS6305	فرانسه	ENSAT
29	7CR1=PRH6	فرانسه	C.F	79	B-FIPOPB	فرانسه	NOVARTIS
30	ENSAT699	فرانسه	ENSAT	80	D34	امریکا	USDA
31	SSD-581	فرانسه	ASGROW	81	CAY	فرانسه	ENSAT
32	TMB-51	فرانسه	INRAMONT	82	346	ایران	SPII
33	11*12	ایران	SPII	83	NS-F1-A5*R5	فرانسه	NOVARTIS
34	110	ایران	SPII	84	36	ایران	SPII
35	H603R	فرانسه	INRAMONT	85	38	ایران	SPII
36	4	ایران	SPII	86	SDB2	فرانسه	INRAMONT
37	703-CHLORINA	فرانسه	ENSAT	87	H158A/LC1064	فرانسه	ASGROW
38	NSF1-A4*R5	فرانسه	NOVARTIS	88	H156A/H543R	فرانسه	ASGROW
39	28	ایران	SPII	89	H543R/H543R	فرانسه	ASGROW
40	30	ایران	SPII	90	H543R	فرانسه	-
41	F1250/03	مجارستان		91	SF076	فرانسه	ENSAT
42	SDR18	امریکا	USDA	92	B-FIPOPB	فرانسه	ENSAT
43	LP-SCYB	فرانسه	ENSAT	93	SF085	فرانسه	ENSAT
44	803-1	صربستان	IFVC	94	SF092	-	-
45	1009370-1(100K)	فرانسه	ENSAT	95	A-CONTROLPLASTIPIC	ایران	SPII
46	CSWW2S	فرانسه	Caussade semences	96	59-1	ایران	SPII
47	1009370-3(100K)	فرانسه	ENSAT	97	H-100A-90RL8	فرانسه	ENSAT
48	H158A/H543R	فرانسه	ASGROW	98	SF109	فرانسه	ENSAT
49	H100A	فرانسه	ASGROW	99	SF105	فرانسه	ENSAT
50	15031	فرانسه	ASGROW	100	SF-023	-	-

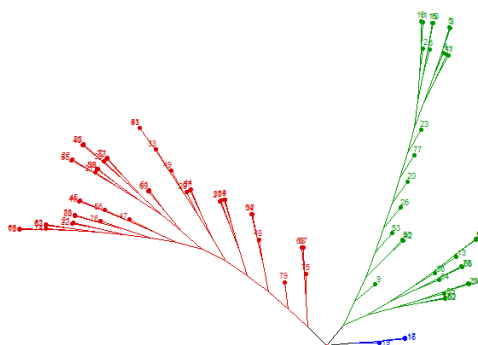
جدول ۲- توالی آغازگرهای REMAP مورد استفاده در تهیه پروفیل مولکولی ژنوتیپ‌های آفتابگردان دانه روغنی

توالی	آغازگرهای آ‌ی اس اس آر	توالی	آغازگرهای رتروترانسپوزون
Sequence (5'→3')	ISSR primers	Sequence (5'→3')	Retrotransposon primers
CACACACACACACACAG	UBC-818	AGAGGGGAATGTGGGGGTTTCC	1061 LTR
ACACACACACACACACAC	UBC-826	TCTCTATTATAGCCGGAGAGGTG	1062 LTR
GAGAGAGAGAGAGAGAYT	UBC-840	GATCCGGTTTCACGGGACTTAC	1063 LTR
ACACACACACACACACYG	UBC-857	CGAAGAACAAACCGAATCACC	1064 LTR
GTGTGTGTGTGTCC	A13	AGCCTCTGAAAGACTCGTTCG	1065 LTR
GAGAGAGAGAGAGAGAA	UBC-812	GGTTTAGGTTTCGTAATCCTCCGCG	CF
ATGATGATGATGATGATG	UBC-864	ACAGACACCAGTGGCACCAAC	CR
GGAGAGGAGAGGAGA	UBC-880	TAACGGTGTCTGTTTTGCAGG	UF(U81)
		AGAGGGGAATGTGGGGGTTTCC	UR1(U82)

نتایج و بحث

با هفت ترکیب آغازگری استفاده شده ۱۲۰ نشانگر تکثیر شدند، که بر این اساس میانگین اندازه سه آماری ضریب تنوع ژنتیکی نی، شاخص شانون و درصد چندشکلی برای نشانگرهای مورد مطالعه به ترتیب ۰/۳۳۵، ۰/۴۹۶ و ۹۱/۹۴٪ برآورد گردید. بر پایه نتایج تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها در ۳ گروه گروه‌بندی شدند (شکل ۱). گروه اول، دوم و سوم به ترتیب شامل ۳۵، ۲۳ و ۲۰ ژنوتیپ بودند. ژنوتیپ‌های هر گروه شامل ژنوتیپ‌هایی از مناطق جغرافیایی متفاوت بود. نتایج تجزیه به بردارهای اصلی نشان داد سه مؤلفه اول، دوم و سوم به ترتیب ۴۳/۰۶، ۱۶/۰۸ و ۱۲/۱۹ درصد و در مجموع ۷۱/۳۲ درصد از کل تغییرات را تبیین می‌کنند (شکل ۲). تجزیه به بردارهای اصلی قادر به تفکیک کامل ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مجزا نگردید که این امر احتمالاً نشان از وجود روابط خویشاوندی بالا بین ژنوتیپ‌ها و حضور اجداد مشترک در مسیر تکامل ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی است. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد ۹۱ درصد از تغییرات

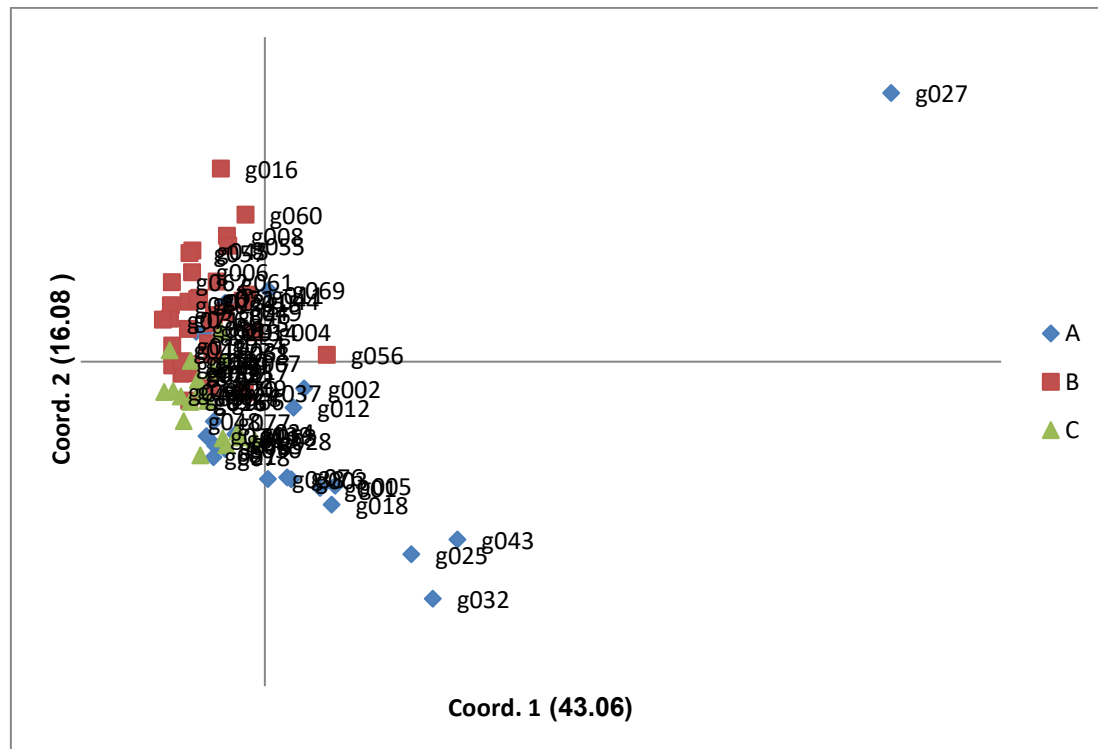
به درون گروه و ۹ درصد به بین گروه‌ها مربوط است. نتایج تجزیه واریانس حاکی از تنوع ژنتیکی بالا در درون گروه‌ها می‌باشد. مشاهده واریانس درون گروهی بالا با استفاده از نشانگر^۱ RFLP (Hongtrakul *et al.*, 1997) هم‌راستا با نتایج مطالعه حاضر است. مقدار PhiPT برابر ۰/۰۹۰۳ برآورد شد، که بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است و تاییدی بر عدم تفکیک ژنوتیپ‌ها در تجزیه بردار اصلی است. همچنین مقادیر میانگین مربعات درون هر گروه، درصد چندشکلی، شاخص شانون و ضریب تنوع هر یک از گروه‌ها به ترتیب (۰/۴۶۵، ۰/۳۱۲، ۰/۵۳۷، ۰/۹۶/۶۷، ۲۱/۳۹۲) برای گروه اول، (۰/۳۲۹، ۰/۴۸۵، ۹۰، ۱۹/۲۱۶) برای گروه دوم و (۰/۱۰۵) برای گروه اول با سوم (۰/۰۹۳) گروه دوم با سوم (۰/۰۶۹) برآورد شد، که مؤید عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها بود.



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

Figure 1- Neighbor Joining dendrogram of different oilseed sunflower genotypes based on 7 REMAP primer combinations

^۱Restriction fragment length polymorphism



شکل ۲- نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌های آفتابگردان دانه روغنی بر اساس دو بردار حاصل از تجزیه بردار اصلی روی داده‌های نشانگر REMAP (A) گروه اول، B گروه دوم و C گروه سوم را نشان می‌دهد).

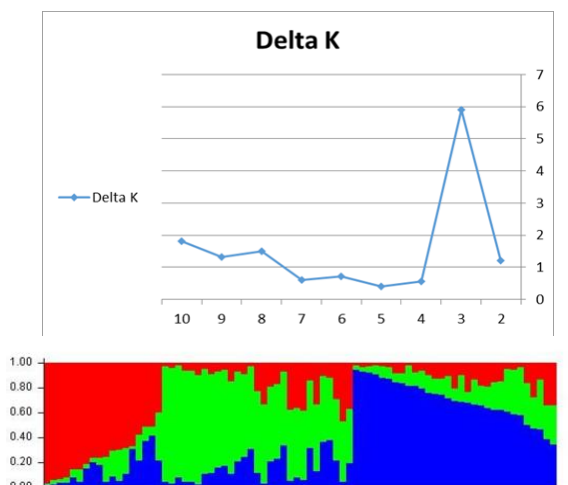
Figure 2- The results of the grouping of oilseed sunflower genotypes based on two vectors obtained from the analysis of the main vector on REMAP marker data. A show the first group, B show the second group, and C show the third group.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس مولکولی برای ژنوتیپ‌های آفتابگردان دانه روغنی بر اساس نشانگرهای REMAP

منبع تغییرات	میانگین مربعات	برآورد واریانس	درصد واریانس
Source of variation	Mean squares	Variance estimation	Percentage of variance
بین گروه	77.323	2.193	9%
Among group			
درون گروه	22.076	22.076	91%
Within group			

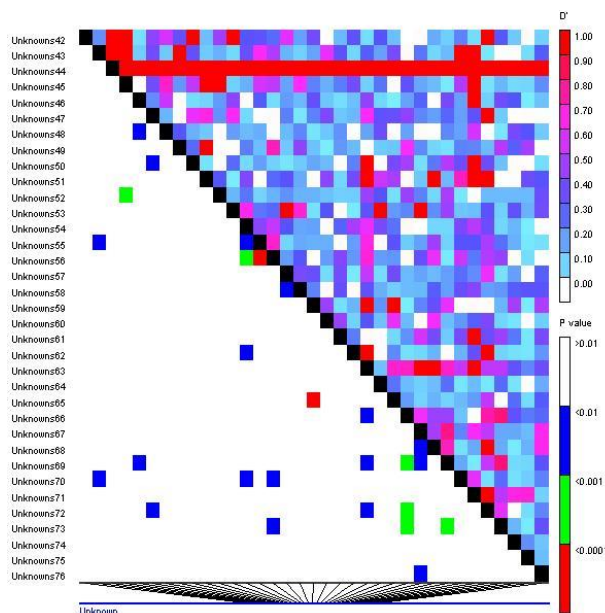
نتایج تجزیه ساختار جمعیت در تطابق با نتایج تجزیه خوشه‌ای بود. علاوه بر ترکیب ساختار جمعیت، بررسی گستره عدم تعادل پیوستگی در ژنوم نیز حائز اهمیت می‌باشد (Al-Maskri *et al.*, 2012). عدم تعادل پیوستگی متأثر از عوامل متعددی از جمله سیستم گرده‌افشانی (اتوگامی و آلوگامی)، اپیستازی، ایزولاسیون ژنتیکی، درجه خویشاوندی، اندازه جمعیت، ساختار جمعیت، رانده‌شدن ژنتیکی، میزان نوترکیبی، جهش (Gupta *et al.*, 2005; Oraguzie *et al.*, 2007) و نیز نوع نشانگر مورد استفاده شده می‌باشد (Ching *et al.*, 2002). میانگین عدم تعادل پیوستگی برای نشانگرهای REMAP ۱/۸۰ درصد برآورد شد. بار پلات عدم تعادل در شکل ۴ ارائه شده است.

در تجزیه ساختار جمعیت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ۳ زیرجمعیت احتمالی ($K=3$) قرار گرفتند و $K=3$ به عنوان K بهینه در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس سهم عضویت افراد در هر خوشه (ماتریس Q) در نظر گرفته شد. بر پایه نتایج بارپلات حاصل (شکل ۳)، با احتمال بیشتر از ۷۰ درصد (حد آستانه ۰/۷ ماتریس Q)، ۱۱ فرد به زیر ساختار اول (سبز)، ۱۲ فرد به زیر ساختار دوم (قرمز) و ۱۵ فرد به زیر ساختار سوم (آبی) تعلق داشت. بنابراین در مجموع ۴۸/۷۱ درصد افراد مورد مطالعه دارای درصد عضویت بیشتر و مساوی ۰/۷ و ۵۱/۲۸ درصد افراد دارای سهم عضویت کمتر از ۰/۷ بودند که به عنوان ژنوتیپ‌های مخلوط در نظر گرفته شدند.



شکل ۳- الف- بررسی تغییرات Delta K. ب- تجزیه خوشه‌های مبتنی بر مدل Bayesian برای ۷۸ ژنوتیپ آفتابگردان مورد مطالعه براساس ۱۲۰ نشانگر REMAP (K=۳).

Figure 3- (A) Survey of Delta K changes. (B) Cluster analysis using Bayesian model for 78 studied oilseed sunflower genotypes based on 120 REMAP markers (K=3).



شکل ۴- بار پلات عدم تعادل پیوستگی ایجاد شده با نرم‌افزار TASSEL؛ قسمت بالای قطر نشان دهنده میزان عدم تعادل پیوستگی بر اساس آماره D' و پایین قطر نشان دهنده P-value می‌باشد.

Figure 4- The bar plot of the linkage disequilibrium created by TASSEL software; The upper part of the diameter shows the level of linkage disequilibrium based on the D' statistic and the lower part of the diameter shows the P-value.

تجزیه پیوستگی و تجزیه ارتباطی جهت شناسایی و معرفی نشانگرهای مرتبط با صفات مهم اقتصادی چون عملکرد و روغن به کار گرفته می‌شوند؛ در این بین، تجزیه ارتباطی که عموماً در قالب دو مدل خطی عمومی (GLM¹) و مدل خطی مخلوط (MLM²) انجام می‌شود؛ به دلیل افزایش وضوح تجزیه QTL و افزایش پوشش آلی از ارجحیت برخوردار می‌باشد (Jannink and Walsh, 2002; Yu *et al.*, 2006b). از دو مدل مورد استفاده در تجزیه ارتباطی در صورت وجود رابطه خویشاوندی بالا بین ژنوتیپ‌ها، مدل MLM به دلیل مد نظر قرار دادن ماتریس K (روابط خویشاوندی بین افراد) در حین انجام تجزیه، موجبات کاهش ارتباط دروغین بین نشانگر و صفت شده و کاهش احتمال ارتکاب اشتباه نوع اول را فراهم می‌نماید؛ در

تجزیه پیوستگی و تجزیه ارتباطی جهت شناسایی و معرفی نشانگرهای مرتبط با صفات مهم اقتصادی چون عملکرد و روغن به کار گرفته می‌شوند؛ در این بین، تجزیه ارتباطی که عموماً در قالب دو مدل خطی عمومی (GLM¹) و مدل خطی مخلوط (MLM²) انجام می‌شود؛ به دلیل افزایش وضوح تجزیه QTL و افزایش پوشش آلی از ارجحیت برخوردار می‌باشد (Jannink

²Mixed linear model

¹General linear model

دو صفت عرض برگ و عملکرد ارتباط معنی‌دار در سطح یک درصد نشان دادند. نشانگر 658268 تحت هر دو شرایط آبیاری معمول و کم آبیاری ارتباط معنی‌دار در سطح یک درصد با دو صفت عملکرد و عرض برگ نشان داد. به طور کلی شناسایی نشانگرهای مرتبط با چند صفت به دلیل فراهم کردن امکان گزینش چندین صفت توسط یک نشانگر و ایجاد زمینه لازم برای درک درست از روابط صفات و ارتباطات بین مکان‌های ژنی حائز اهمیت ویژه‌ای می‌باشد (Ahmadpour *et al.*, 2018) و باعث افزایش کارایی انتخاب به کمک نشانگر (MAS^1) و پیشرفت ژنتیکی در برنامه‌های به‌نژادی می‌شود (Shirmohammadli *et al.*, 2018). البته شناسایی نشانگر خوب که مرتبط با تحمل به خشکی و پایداری عملکرد بوده و در حد امکان دقیق و مقرون به صرفه و به راحتی قابل اندازه‌گیری باشد، حائز اهمیت است (Toum *et al.*, 2020). وجود نشانگرهای مشترک می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی کنترل کننده این صفات باشد. نشانگرهای 658268، 638263، 618181 و 658268 ارتباط معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد به ترتیب با صفات تعداد برگ، عرض برگ، روغن و عملکرد تحت هر دو شرایط (آبیاری معمول و کم آبیاری) نشان دادند. بنابراین گزینش بر اساس این نشانگرها که به عنوان نشانگرهای پایدار تحت شرایط محیطی متفاوت در نظر گرفته می‌شوند، می‌تواند مطلوب‌تر باشد (Rasoulzadeh Aghdam *et al.*, 2021).

حقیقت این امر سبب افزایش قابلیت اطمینان و اعتبار نشانگرهای شناسایی شده می‌گردد (Yu *et al.*, 2006a). در مطالعه حاضر مجموعاً ۲۰ مکان؛ ۱۰ مکان تحت شرایط آبیاری معمول و ۱۰ مکان تحت شرایط کم آبیاری با صفات مورد مطالعه ارتباط معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد نشان دادند. در تجزیه ارتباطی با استفاده مدل MLM تحت شرایط آبیاری معمول نشانگر (648264) برای ارتفاع بوته، نشانگر (658263) برای قطر ساقه، ۲ نشانگر (638263 و cf8268) برای تعداد برگ، نشانگر (658268) برای عرض برگ، نشانگر (648183) برای تعداد روز تا گل‌دهی، نشانگر (cf8185) برای RWC، نشانگر (cf8263) برای طول دمبرگ، نشانگر (658268) برای عملکرد و نشانگر (6181810) برای محتوای روغن دانه شناسایی شد (جدول ۵). تحت شرایط کم آبیاری برای صفت طول برگ ۱ نشانگر (Cf8267)، محتوای کلروفیل ۲ نشانگر (648408 و 638267)، عرض برگ ۳ نشانگر (638263، 658268 و Cf8267)، عملکرد ۱ نشانگر (658268)، تعداد برگ ۱ نشانگر (638263) و در نهایت درصد روغن ۲ نشانگر (Cf8181 و 6181810) شناسایی شد (جدول ۶). در این مطالعه تعدادی نشانگر مشترک برای صفات مورد مطالعه شناسایی شدند. نشانگر 658268 با صفات عرض برگ و عملکرد تحت شرایط آبیاری معمول و در شرایط کم آبیاری نشانگر Cf8267 با دو صفت عرض و طول برگ، نشانگر 638263 با صفات عرض برگ و تعداد برگ، نشانگر 658268 با

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

مدل MLM

Table 5- REMAP markers related with traits evaluated in studied oilseed sunflower genotypes under normal irrigation conditions based on MLM model

صفت	نشانگر	P-value	صفت	نشانگر	P-value
Character	Marker		Character	Marker	
روز تا گلدهی	648183	0.0040	محتوای روغن دانه	6181810	0.0079
Day to flowering			Seed oil content		
طول دمبرگ	Cf8263	0.0087	ارتفاع گیاه	648264	0.0049
Petiole length			Plant height		
تعداد برگ	Cf8268	0.0053	محتوای نسبی آب برگ	Cf8185	0.0067
Number of leaves	638263	0.0068	Leaf relative water content		
عرض برگ	658268	0.0055	قطر ساقه	658263	0.0040
Leaf width			Stem diameter		
			عملکرد دانه	658268	0.0084
			Seed yield		

¹Marker assisted selection

جدول ۶- نشانگرهای REMAP پیوسته با صفات ارزیابی شده در ژنوتیپ‌های آفتابگردان دانه روغنی مورد مطالعه تحت شرایط تنش کم آبی براساس مدل MLM

Table 6- REMAP markers related with evaluated traits in studied oilseed sunflower genotypes under limited irrigation conditions based on MLM model

صفت	نشانگر	P-value	صفت	نشانگر	P-value
Character	Mrker		Character	Maeker	
محتوای کلروفیل	648408	0.0048	تعداد برگ	638263	0.0038
Chlorophyll content	638267	0.0048	Number of leaves		
طول برگ	Cf8267	0.0074	محتوای روغن دانه	Cf8181	0.0044
Leaf length			Seed oil content	6181810	0.0058
عرض برگ	638263	0.0067	عملکرد دانه	658268	0.0091
Leaf width	658268	0.0077	Seed yield		
	Cf8267	0.0096			

نتیجه‌گیری کلی

داد. شناسایی نشانگرهای مستقل از محیط در برنامه‌های به‌نژادی ارزشمند است. گزینش با آن‌ها برای صفتی در یکی از شرایط (مثلاً شرایط نرمال)، باعث بهبود صفت در شرایط دیگر (تنش) نیز خواهد شد. همچنین برخی از نشانگرها با چندین صفت ارتباط داشتند. وجود چنین حالتی، به‌طور بالقوه کارایی گزینش بر اساس نشانگر را بالا می‌برد و موجب می‌شود که به دنبال اصلاح یک صفت در یک گیاه، تغییراتی در ارزش صفات همبسته دیگر ایجاد شود. در حقیقت وجود چنین حالتی در به‌نژادی گیاهی به جهت کمک به اصلاح همزمان چندین صفت بسیار حایز اهمیت می‌باشد.

نتایج نشان داد که بین ژنوتیپ‌های آفتابگردان دانه روغنی مورد بررسی از نظر صفات مرفوفیزیولوژیک مورد مطالعه تنوع فنوتیپی و مولکولی مناسبی وجود دارد. بر اساس مطالعه ساختار جمعیت ۳ زیر جمعیت احتمالی در پانل ارتباطی شناسایی شد. در تجزیه ارتباط بر اساس مدل MLM، ۱۰ مکان ژنی تحت شرایط آبیاری معمول و ۱۰ مکان ژنی تحت شرایط کم آبیاری با صفات مورد مطالعه ارتباط معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد نشان دادند. برخی از نشانگرها به صورت مشترک برای صفات در هر دو شرایط محیطی شناسایی شدند. نشانگر 61655 با صفت درصد روغن در هر دو شرایط محیطی پیوستگی نشان

References

- Abid, M., Ali, S., Qi, L.K., Zahoor, R., Tian, Z., Jiang, D., Snider, J.L. and Dai, T., 2018. Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Scientific Reports*, 8(4615), pp.1-15. doi: 10.1038.s41598-018-21441-7
- 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. doi: 10.13080/z-a.2018.105.036
- Al-Maskri, A.H., Sajjad, M. and Khan, S.H., 2012. Association mapping: a step forward to discovering new alleles for crop improvement. *International Journal of Agriculture and Biology*, 14(1), pp.153-160.
- Amiteye, S., 2021. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7(10), e08093. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08093
- Andleeb, T., Shah, T., Nawaz, R., Munir, I., Munsif, F. and Jalal, A., 2020. QTL mapping for drought stress tolerance in plants. *Signaling and Communication in Plants*, pp.383-403. doi: 10.1007/978-3-030-40277-8_16
- Bankole, F., Menkir, A., Olaoye, G., Crossa, J., Hearne, S., Unachukwu, N. and Gedil, M., 2017. Genetic gains in

- yield and yield related traits under drought stress and favorable environments in a maize population improved using marker assisted recurrent selection. *Frontiers in Plant Science*, 8, pp.808. doi: **10.3389/fpls.2017.00808**
- Bhatt, R.M. and Rao, S.N.K., 2005. Influence of pod load on response of okra to water stress. *Indian Journal of Plant Physiology*, 10(1), pp.54-59.
- Bhutta, A.R. 1998. Biological studies on some fungi associated with sunflower in Pakistan. Doctoral dissertation, Sindh Agriculture University TandoJam.
- Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y. and Buckler, E., 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23(19), pp.2633–2635. doi: **10.1093/bioinformatics/btm308**
- Ching, A., Caldwell, K.S., Jung, M., Dolan, M., Smith, O.S(H), Tingey, S., Morgante, M. and Rafalski, A.J., 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics*, 3(19), pp.1-14. doi: **10.1186/1471-2156-3-19**
- 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*, 18(2), pp.49-62. doi: **10.1017/s1479262120000040**
- 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(2-3), pp.311–315. doi: **10.1016/s0926-6690(97)00063-0**
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, pp.13-15.
- 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. doi: **10.1016/s1673-8527(08)60165-4**
- 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(8), pp.2611-2620, doi: **10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x**
- Fernandez, O., Urrutia, M., Berton, T., Bernillon, S., Deborde, C., Jacob, D., Maucourt, M., Maury, P., Durufé, H., Gibon1, 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(4), pp.1-15. doi: **10.1007/s11306-019-1515-4**
- 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. doi: **10.4238/vol9-2gmr713**
- Gupta, P.K., Rustgi, S. and Kulwal, P.L., 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology*, 57(4), pp.461-485. doi: **10.1007/s11103-005-0257-z**

- 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 Journal of Agricultural Research*, 35(1), pp.113-124. doi: **10.3329/bjar.v35i1.5872**
- 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*, 95, pp.400–407. doi: **10.1007/s001220050576**
- 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.
- 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(4), pp.520-530. doi: **10.1038/hdy.2010.93**
- 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. doi: **10.15835/nsb427501**
- Liu, X., Du, J., Khan, A.M.D., Cheng, J., Wei, C., Mei, Z., Chen, H., He, T. and Fu, J., 2020. Analysis of genetic diversity and similarities between different Lycium varieties based on ISSR analysis and RAMP-PCR markers. *World Academy of Sciences Journal*, 2, pp.83–90. doi: **10.3892/wasj.2020.39**
- 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, pp.1-11. doi: **10.3389/fpls.2016.00909**
- Nezhadahmadi, A., Prohdan, Z.H., and Faruq, G., 2013. Drought tolerance in wheat. *The Scientific World Journal*, 11, pp.1–12. doi: **10.1155/2013/610721**
- Noryan, M., Hervan, I.M., Hossein Sabouri, H., Kojouri, F.D. and Mastinu, A., 2021. Drought Resistance Loci in Recombinant Lines of Iranian *Oryza sativa* L. in *Germination Stage BioTech*, 10(4), 26. doi: **10.3390/biotech10040026**
- Peakall, R. and Smouse, P.E., 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), pp.2537-2539. doi: **10.1093/bioinformatics/bts460**
- Perrier, X. and Jacquamoud-collect, J.P., 2006. DARWin software. <http://Darwin.cirad.fr/>
- Pekcan, V., Evci, G., Yilmaz, M.I., Nalcai, A.S.B., Erdal, Ş.Ç., Cicek, N., Ekmekci, Y. and Kaya, Y., 2016. Effects of drought on morphological traits of some sunflower lines. *Ekin Journal of Crop Breeding*, 2(2), pp.54-68.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), pp.945-959. doi: **10.1093/genetics/155.2.945**
- Oraguzie, N.C., Wilcox, P.L., Rikkerink, E.H.A. and de Silva, H.N., 2007. Linkage disequilibrium, Association Mapping in Plants. Springer. New York. NY. pp.11-39.
- Radanović, A., Miladinović, D., Cvejić, S., Jocković, M. and Jocić, S., 2018. Sunflower genetics from ancestors to modern hybrids—A Review. *Genes*, 9(11), pp.528. doi: **10.3390/genes9110528**

- Rasoulzadeh Aghdam, M., Darvishzadeh, R., Sepehr, E. and Alipour, H., 2021. Association analysis of agronomic traits of oilseed sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines with REMAP and IRAP markers under optimum and phosphorus deficit stress. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 52(4), pp.179-196. [In Persian]. doi: **10.22059/ijfcs.2020.309464.654749**
- 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.
- 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. doi: **10.1016/j.cj.2020.04.004**
- Robert, G.A., Rajasekar, M. and Manivannan, P., 2015. Triazole-induced drought stress amelioration on growth yield, and pigments composition of *Helianthus annuus* L. (sunflower). *International Multidisciplinary Research Journal*, 5, pp.6–15.
- Salazar, J.A., Rasouli, M. and Martínez-Gomez, P., 2014. Random amplified microsatellite polymorphism (RAMP) application in prunus characterization and mapping. *Acta Horticulturae*, 5, pp.61–64. doi: **10.17660/actahortic.2014.1028.8**
- 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, pp.247-253.
- Sinclair, T.R. and Ludlow, M.M., 1986. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13, pp.329–341. doi: **10.1071/pp9860329**
- Shirmohammadli, 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 of Genetic Resources*, 4(2), pp.122-129. doi: **10.22080/jgr.2019.15415.1115**
- Sharfun-Nahar, M.M. and Hashmi, M.H., 2005. Seed-borne mycoflora of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 37(2), pp.451- 457.
- 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. doi: **10.1038/nbt.1800**
- Thirumarimurugan, M., Sivakumar, V.M., Xavier, A.M., Prabhakaran, D. and Kannadasan, T., 2012. Preparation of biodiesel from sunflower oil by transesterification. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2(6), pp.441-444.
- Toum, L., Perez-Borroto, L.S., Peña-Malavera, A.N., Luque, C., Welin, B., Berenstein, A., Do Porto, D.F., Vojnov, A., Castagnaro, A.V. and Pard, E.M., 2020. Selecting putative drought-tolerance markers in two contrasting soybeans. *Scientific Reports*, 12(1), pp.10872. doi: **10.1038/s41598-022-14334-3**
- 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., 2006a. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, 38(2), pp.203-208. **doi: 10.1038/ng1702**
- Yu, J. and Buckler, E.S., 2006b. Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), pp.155-160. **doi: 10.1016/j.copbio.2006.02.003**

Identification of REAMP markers related to morpho-physiological and agronomic traits in oilseed sunflower (*Helianthus annuus* L.) under normal and limited irrigation conditions

Nasrin Akbari¹, Reza Darvishzadeh^{2*}

¹ PhD Student in Plant Breeding-Molecular Genetics and Genetic Engineering, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

² Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

*Corresponding Author: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

Received: 22 January 2023

Accepted: 17 March 2023

DOI: 10.22034/CSRAR.2024.382749.1316

Abstract

Introduction: Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the most valuable agricultural products, mainly cultivated for edible oil. As an oilseed plant, the sunflower has the fifth place in the world after soybeans, rapeseed, cotton and peanut. Due to climatic changes, reduction of water received from rains and incorrect management of water consumption, the crop production experienced severe drought stress during the growth period which causes the fluctuation and decrease of the product. Considering the importance of studying and selecting cultivars tolerant to abiotic stresses such as drought stress, investigating the genetic diversity for adaptive responses in sunflower cultivars and genotypes, as well as identifying QTLs are necessary for breeding programs. The aim of this study is to investigate genetic diversity and identify markers related to drought tolerance in the inbred lines population of oilseed sunflower using the REAMP (retrotransposon microsatellite amplified polymorphism) markers.

Materials and Methods: In the present research, the genetic diversity of an oilseed sunflower population including 100 inbred lines was evaluated in terms of morpho-physiological traits using a 10x10 simple lattice design with two replications under two normal and limited irrigation conditions during two consecutive years. Different morpho-physiological traits were measured under both conditions. DNA extraction was done from 78 lines out of 100 investigated genotypes by CTAB method. Then, in order to evaluate the quality and quantity of extracted DNA, 1% agarose gel electrophoresis and spectrophotometry were used. The molecular profile of genotypes was prepared using 7 REAMP primers combinations. Based on molecular data and Neighbor Joining algorithm in DARWin 6.0.21 software the studied genotypes were grouped in three groups. Cluster and population structure analyses as well as analysis of molecular variance were performed with GenAIEx and Structure 2.3.3. The number of possible sub-populations (optimal K) was determined based on the delta K (ΔK) method. For optimal K, the Qst matrix was calculated. Using mixed linear model (MLM) related to Q + K matrices (matrix of population structure coefficients + matrix of kinship relations) molecular markers associated with studied morpho-physiological traits were identified.

Results and Discussion: Based on the results of cluster analysis, the genotypes were grouped into 3 groups. Each group included genotypes from different geographical areas. The results of principal component analysis showed that the first three components explain 71.32% of the total changes. Principal coordinate analysis was not able to completely separate the genotypes into separate groups. Molecular analysis of variance showed that 91% of the variation are within group and the rest 9% are between the groups, which indicates high genetic diversity within the groups. According to the mixed linear model, totally 20 molecular markers showed a significant relationship ($P \leq 0.01$) with the studied morpho-physiological traits under both normal and limited irrigation conditions. "6181810" marker with oil content and "cf8267" marker with two leaf length and leaf width traits showed a significant relationship ($P \leq 0.01$) under limited irrigation conditions. "658268" marker showed a significant relationship with yield and leaf width traits under both normal and limited irrigation conditions.

Observing the relationship between one marker and several traits can be derived from the effects of pleiotropy or the linkage of genomic regions involved in the control of these traits.

Conclusion: The results obtained from this study present valuable information on the genetic basis of studied traits that can be used for breeding and developing high performance varieties in sunflower. In this research some common markers were identified. Identification of markers that showed linkage with several traits in both conditions, such as “658268” and “cf8267” markers, are more important in the breeding program due to the possibility of simultaneous breeding of several traits.

Keywords: Association analysis, Drought stress, Retrotransposon based molecular markers