

ارزیابی نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون ها در شناسایی مکان های مرتبط با صفات زراعی - مورفولوژیک در توده های آفتابگردان آجیلی (*Helianthus annuus* L.)

Evaluation of retrotransposon-based markers for identification of genetic loci associated with agro-morphological characteristics in confectionery sunflower (*Helianthus annuus* L.) accessions

رقیه ضیایی فرد^۱، رضا درویشزاده^{۱*}، ایرج برنوسی^۱، بابک عبدلهی^۱، خسرو مفاخری^۲، زهرا آقاعلی^۳

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، دانشیاران، گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲- دانشجوی دکتری، گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

Ziaiefard R¹, Darvishzadeh R^{*1}, Bernousi I¹, Abdollahi B¹, Mafakheri KH²,
Aghaali Z³

1- MSc Student, Professor, Associate Professors, Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Agriculture, Urmia University

2- PhD Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Agriculture, University of Tabriz

3- PhD Student, Department of Plant Breeding, College of Agriculture, University of Tarbiat Modaress

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۳۱)

چکیده

با توجه به اینکه ارزش اقتصادی یک رقم به صفات مختلف آن بستگی دارد، چگونگی اعمال انتخاب برای چندین صفت به منظور حصول حداکثر ارزش اقتصادی همواره مورد نظر به نژادگران بوده است. از این رو، اطلاع دقیق از رفتار و ارتباط ژنتیکی این صفات به اصلاح توده ها کمک خواهد نمود. به منظور شناسایی نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون مرتبط با صفات زراعی - مورفولوژیک در آفتابگردان آجیلی، مجموعه ای متشکل از ۵۰ توده در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار از لحاظ ۲۰ صفت مطابق دیسکرپتور IBPGR آفتابگردان مورد ارزیابی قرار گرفتند. در آزمایش مولکولی تنوع ژنتیکی ۲۵۰ فرد (پنج فرد از هر توده) با ۱۲ آغازگر رتروترانسپوزنی (هفت آغازگر IRAP و پنج آغازگر REMAP) مطالعه شد. با بررسی ساختار ژنتیکی ژرم پلاسما مورد مطالعه بر اساس مدل Bayesian سه زیرجمعیت در جمعیت نقشه یابی شناسایی شد. بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM) در مجموع ۳۷ مکان مرتبط با صفات زراعی - مورفولوژیک ($P \leq 0.01$) شناسایی شد. نشانگر U81-U82 با ژن های کنترل کننده صفات روز تا گلدهی (DF)، طول دمیرگ (PL)، قطر طبق (CD)، عملکرد (YIELD) و طول دانه (SL) و نشانگر U81-UBC827 با ژن های کنترل کننده صفات قطر ساقه (SD)، عملکرد (YIELD) و عرض دانه (SW) به طور مشترک پیوسته بود. شناسایی نشانگرهای مشترک برای برخی صفات بررسی شده در مطالعه حاضر می تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد. شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به نژادی گیاهان دارد، زیرا گزینش هم زمان چند صفت را امکان پذیر می سازند.

واژه های کلیدی

آفتابگردان آجیلی

مدل خطی مخلوط

مکان یابی ژن

نشانگرهای مولکولی

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) گیاهی یک‌ساله و دیپلوئید ($2n = 2x = 34$) متعلق به تیره Asteraceae است. ارقام آفتابگردان براساس نوع مصرف به دو تیپ روغنی و آجیلی تقسیم می‌شوند (Hu et al. 2010). آفتابگردان یکی از مهم‌ترین گیاهان در تولید روغن‌های گیاهی محسوب می‌شود که به دلیل داشتن بیش‌ترین درصد اسیدهای چرب غیراشباع، در حفظ سلامتی مصرف‌کنندگان نقش مهمی دارد. در تیپ آجیلی آفتابگردان درصد روغن کمتر ولی درصد پروتئین بیش‌تر بوده و عمدتاً به‌صورت آجیل و بعضاً در برخی صنایع غذایی و هم چنین در برنامه‌های غذایی دام و طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hossain et al. 2010). سطح زیر کشت این گیاه در دنیا ۲۴/۶ میلیون هکتار و تولید دانه آن ۳۶/۴ میلیون تن می‌باشد (FAO 2013).

اغلب صفات مهم در گیاهان به‌صورت کمی کنترل می‌شوند. به دلیل پلی‌ژنیک بودن و تاثیرپذیری زیاد این صفات از عوامل محیطی، تجزیه صفات کمی همواره با چالش روبرو بوده است (Movafegh et al. 2009). اگر چه نقشه‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی^۱ (QTLs) بر اساس تجزیه پیوستگی برای شناسایی مناطق ژنومی تاثیرگذار بر روی ساختار آفتابگردان موثر است (Nambeesan et al. 2015) ولی این روش دارای محدودیت‌هایی است از جمله: با استفاده از جمعیت‌های حاصل از دو والد، تنها می‌توان دو آلل را برای هر ژن شناسایی کرد، میزان نوترکیبی در آن محدود است؛ بنابراین وضوح ژنتیکی نسبتاً پایینی را فراهم می‌کند (Zhu et al. 2008). نقشه‌یابی ارتباطی^۲ با تعیین پیوستگی بین چندشکلی مولکولی و تنوع فنوتیپی در جمعیت‌های طبیعی موجود توانسته است این مشکلات را حل کند از این رو جایگزین بسیار مناسبی برای روش‌های نقشه‌یابی QTLها می‌باشد (Yu and Buckler 2006). این روش برای اولین بار به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با عوامل دخیل در بیماری‌های انسانی مورد استفاده قرار گرفت ولی امروزه به‌طور گسترده برای مکان‌یابی QTLها در گیاهان به‌کار برده می‌شود (Yao et al. 2009). در روش نقشه‌یابی ارتباطی نیازی به تهیه جمعیت در حال

تفرق نیست و از جمعیت‌های متنوع موجود جهت شناسایی مکان‌های ژنومی پیوسته با صفات مورد مطالعه استفاده می‌شود. بنابراین امکان شناسایی اکثر آلل‌های پیوسته با صفت یا صفات مورد مطالعه وجود دارد. در این روش به دلیل رخداد نوترکیبی‌های زیاد در طول تاریخچه تکاملی گیاهان، مکان‌یابی با دقت بالایی انجام می‌گیرد و به راحتی می‌توان از نتایج آن در فرایند انتخاب به کمک نشانگر^۳ (MAS) استفاده نمود (Moose and Mumm 2008).

در یک بررسی تجزیه 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 (*Helianthus annuus* L.) با استفاده از ۱۲ آغازگر رتروترانسپوزونی (۷ آغازگر IRAP^۴ و ۵ آغازگر REMAP^۵) تحت شرایط نرمال و تنش خشکی انجام گرفت. بر اساس مدل خطی عمومی^۶ (GLM) و مدل خطی مخلوط^۷ (MLM) به‌ترتیب ۱۹ و ۱۸ مکان ژنی مرتبط با صفات مورد مطالعه ($P < 0.01$) شناسایی شد (Jannatdoust et al. 2015). در بررسی مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفت قطر طبق و ۱۰ صفت مرتبط با مورفولوژی دانه در ۱۲۰ فرد از جمعیت F_2 آفتابگردان با استفاده از ۴۴ نشانگر SSR^۸ و ۱۶۵ نشانگر TRAP^۹، در نهایت ۵۱ QTL برای صفات مورد مطالعه شناسایی شد که عمدتاً بر روی کروموزم شماره ۶ قرار داشتند. این نشان می‌دهد که این صفات توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند (Yue et al. 2009). در آفتابگردان روغنی مکان‌یابی ژنتیکی برای برخی صفات مهم زراعی (Abdi et al. 2012)، عملکرد (Vanitha et al. 2014)، تحمل به سرما (Allinne et al. 2009) و مقاومت به بیماری‌ها (Davar et al. 2010) انجام شده‌است. ولی علی‌رغم اهمیت اقتصادی آفتابگردان آجیلی در ایران، در زمینه شناسایی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مهم در این گیاه تحقیقات

³ Marker-assisted selection

⁴ Inter retrotransposon amplified polymorphism

⁵ Retrotransposon microsatellite amplified polymorphism

⁶ General linear model

⁷ Mixed linear model

⁸ Simple sequence repeat

⁹ Target region amplification polymorphism

¹ Quantitative trait loci

² Association mapping

فناوری دانشگاه ارومیه در سال ۱۳۹۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی قرار داده شدند. فاصله‌ی گلدان‌ها در روی ردیف‌ها ۴۰ و بین دو ردیف ۶۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. آبیاری گلدان‌ها در طول فصل رشد با سیستم قطره‌ای انجام گرفت. در طول دوره‌ی رشد رویشی هر ۱۰ روز یکبار کوددهی با کود کامل آگریمیل ۲۰-۲۰-۲۰ (NPK) انجام گرفت. در مرحله بعد از گلدهی و پس از برداشت دانه صفات مختلف زراعی و مورفولوژیک شامل: تعداد کل برگ (LN)، طول دم‌برگ (PL, cm)، طول پهنک برگ (LL, cm)، عرض پهنک برگ (LW, cm)، ارتفاع بوته (PH, cm)، قطر ساقه (SD, cm)، قطر طبق (CD, cm)، روز تا گلدهی (DF)، روز تا رسیدگی (DM)، وزن دانه در طبق (YIELD, g)، وزن خشک بوته (APDW, g)، وزن خشک طبق (CW, g)، طول دانه (SL, mm) و عرض دانه (SW, mm)، وزن صددانه (100SW, g)، وزن تک دانه (SSW, g)، و وزن مغز تک دانه (DHW, g) اندازه‌گیری شدند. نسبت مغز به کل تک دانه (DHW/SSW) و هم‌چنین شاخص برداشت (HI) (نسبت وزن دانه در طبق به وزن خشک کل اندام هوایی بوته) نیز در هر کدام از ۱۰ تکرار برای هر توده محاسبه شد.

زیادی صورت نگرفته است (Jannatdoust et al. 2015). هدف از این تحقیق، تجزیه ارتباط برای صفات زراعی-مورفولوژیک در آفتابگردان آجیلی با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر تروترنسپوزون IRAP و REMAP می‌باشد. شناسایی مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات می‌تواند به اصلاح‌گران در پیشبرد برنامه‌های گزینشی در طول برنامه‌های اصلاحی جهت معرفی ارقام با پتانسیل عملکرد بالا کمک اساسی نماید.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۵۰ توده آفتابگردان آجیلی جمع‌آوری شده از نواحی مختلف کشور استفاده شد (جدول ۱). ابتدا از هر توده ۲۰ گلدان کوچک با قطر دهانه‌ی ۷ سانتی‌متر و ارتفاع ۸ سانتی‌متر حاوی مخلوط پیت ماس و پرلیت کشت شد. پس از ۱۵ روز از کشت، ۱۰ گیاهچه از هر توده انتخاب و هر یک به یکی از گلدان‌های بزرگ‌تر با قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر و با ارتفاع ۲۶ سانتی‌متر منتقل شدند. گلدان‌های بزرگ با ترکیب ۱:۱ خاک زراعی و ماسه پر و در فضای باز در محوطه پژوهشکده زیست

جدول ۱- کد و نام ۵۰ توده آفتابگردان آجیلی مورد مطالعه

کد توده	محل جمع‌آوری	کد توده	محل جمع‌آوری	کد توده	محل جمع‌آوری
۱۸	ارومیه (انگنه ۴)	۲۶	بوکان محلی	۴	ارومیه (انگنه ۴)
۵	ارومیه (اردوشاهی ۱)	۸	پیرانشهر (اندیزه)	۷	ارومیه (اردوشاهی ۱)
۴۴	ارومیه (باباگنجه ۶)	۴۷	پیرانشهر (بالابان)	۱	ارومیه (باباگنجه ۶)
۴۵	ارومیه (باروج)	۱۲	پیرانشهر (سروکانی)	۱۶	ارومیه (باروج)
۲۱	ارومیه (جبل‌کندی ۲)	۴۱	خوی ۶	۴۲	ارومیه (جبل‌کندی ۲)
۴۶	ارومیه (علی‌بیگللو)	۱۵	خوی ۱۰	۲۵	ارومیه (علی‌بیگللو)
۵۰	ارومیه (للولو ۵)	۱۰	سردشت	۳۸	ارومیه (للولو ۵)
۴۳	ارومیه (مرنگلو)	۶	سقز	۴۸	ارومیه (مرنگلو)
۲	ارومیه (نوشین‌شهر)	۹	مرند ۲-۱۳۸۹	۲۲	ارومیه (نوشین‌شهر)
۲۹	ارومیه (وقاصلوی سفلی)	۴۹	مرند (دیزج‌قلعی)	۲۶	ارومیه (وقاصلوی سفلی)
۲۰	ارومیه (وقاصلوی اولیا)	۳۹	مرند (یامچی پسته‌ای)	۲۷	ارومیه (وقاصلوی اولیا)
۱۷	اصفهان (دولت‌آباد)	۳۷	مشهد	۱۳	اصفهان (دولت‌آباد)
۱۴	اصفهان (طالخنوچه)	۲۳	ملایر سفید ۳	۳۴	اصفهان (طالخنوچه)
۳۱	بانه ۱	۳۲	میانه (بسین)	۱۹	بانه ۱
۳۳	بانه ۲	۳۵	همدان ۱	۲۴	بانه ۲
۲۸	بانه ۳	۳۶	همدان ۲	۳۰	بانه ۳
۳	بوکان		مرند ۱-۱۳۸۹	۴۰	بوکان

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده

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

از مجموع ۲۱ ترکیب آغازگری REMAP مورد بررسی، پنج ترکیب که الگوی بانندی واضحی داشتند انتخاب و بر روی جمعیت استفاده شدند. ترکیبات آغازگری REMAP مورد استفاده عبارت بودند از: U81-UBC827, CR-UBC816, 1064LTR-UBC826, 1063LTR-UBC826, U82-UBC827 (جدول ۲). آغازگرهای ISSR مورد استفاده معمولاً در انتهای ۳' خود دارای یک یا دو باز لنگر برای جلوگیری از لغزش در داخل توالی تکراری و افزایش وضوح الگوی نواری بودند. واکنش‌های PCR برای آغازگرهای REMAP مشابه با روش اعمال شده برای نشانگرهای IRAP بود. تفکیک محصولات تکثیر با استفاده از ژل آگارز (Biozyme agarose) ۱/۸ درصد و دستگاه الکتروفورز BioRAD با ولتاژ ۶۵ ولت و بافر TBE نیم برابر در مدت زمان ۳ ساعت انجام گرفت. محصولات PCR با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و عکس‌برداری زیر نور UV با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت انجام گرفت.

آزمون نرمال بودن توزیع اشتباهات آزمایشی مطابق روش Shapiro and Wilk (۱۹۶۵) و تجزیه واریانس صفات بر اساس مدل آماری طرح پایه به ترتیب با دستور PROC UNIVARIATE و رویه GLM در نرم‌افزار SAS نسخه 9.1 انجام گرفت. وراثت-پذیری صفات با توجه به امید ریاضی میانگین مربعات در جدول‌های تجزیه واریانس برآورد شد. باندهای حاصل از تکثیر PCR به صورت حضور (یک) یا عدم حضور (صفر) امتیازدهی و ماتریس حاصل برای بررسی ساختار جمعیت استفاده شد. به منظور تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیر جمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط، از روش Bayesian در نرم‌افزار Structure 2.3.4 استفاده شد (Pritchard et al. 2000). در این روش، هر یک از ژنوتیپ‌ها با

DNA ژنومی از ۵ فرد (تکرار) هر توده در مرحله چهار برگی با روش CTAB^۱ استخراج شد. DNA ژنومی استخراج شده در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (10 mM Tris, 1 Mm EDTA, pH 8.0) حل و کیفیت آن بر روی ژل آگاروز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. خلوص و غلظت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (BioPhotometer Eppendorf) نیز در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

از مجموع ۱۵ آغازگر IRAP، ۴ آغازگر منفرد و ۳ ترکیب آغازگری IRAP الگوی بانندی چند شکل تولید نمودند و برای تهیه پروفیل مولکولی ۲۵۰ فرد از ۵۰ توده آفتابگردان آجیلی (فرد ۲۵۰×۵) انتخاب شدند. خانواده‌های رتروترانسپوزونی مورد استفاده شامل آغازگرهای منفرد CR, U81, CF, 1062, U81-U82, CR-U81, CF-CR شامل ترکیبات (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) در حجم نهایی ۲۰ μL شامل ۲۰ ng DNA ژنومی، بافر ۱۰x (۵۰۰ mM) ۲ μL، کلرید منیزیم، ۱.۴ mM (KCl, 500 mM Tris-HCl pH 8.4)، ۰.۲۵ mM از هر دزوکسی ریبونوکلوئید (Biofluxbiotech)، ۰.۳ از آنزیم Taq DNA polymerase (پنج واحد بر میکرولیتر) و ۱۰ μM از هر آغازگر به همراه آب دیونیزه در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل: ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه جهت واسرشت‌سازی اولیه، ۳۶ چرخه به صورت ۹۴°C به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال (بسته به ترکیب آغازگر) به مدت ۴۰ ثانیه و دمای توسعه (۷۲°C) به مدت ۲ دقیقه و چرخه آخر دمای توسعه‌ی نهایی (۷۲°C) به مدت ۱۰ دقیقه بود.

^۱ Cetyl trimethyl ammonium bromide

محیطی را بر روی صفت مورد نظر نشان می‌دهد. هر چقدر نسبت ضریب تغییرات ژنوتیپی به ضریب تغییرات فنوتیپی بیشتر باشد، نشان می‌دهد که اثر محیط بر روی صفت مورد مطالعه کم است و لذا انتخاب برای اصلاح آن مناسب است و هر چقدر این نسبت کمتر باشد، نشان دهنده تاثیر کم ژنوتیپ نسبت به اثرات محیط در تنوع مشاهده شده است. وراثت پذیری صفات بین ۱ تا ۵۴ درصد متغیر بود. مطابق با نظریه (Stansfield 1991) چنانچه توارث-پذیری صفتی بیش‌تر از ۰/۵ باشد، صفت دارای توارث‌پذیری بالا، چنانچه توارث‌پذیری عمومی صفتی بین ۰/۲ تا ۰/۵ باشد، صفت دارای توارث‌پذیری متوسط و چنانچه توارث‌پذیری صفت مورد نظر کمتر از ۰/۲ باشد، صفت دارای توارث‌پذیری پایین می‌باشد. طبق این نظریه صفت روز تا گلدهی (DF) دارای توارث‌پذیری بالا، ارتفاع بوته (PH)، تعداد برگ (LN)، عرض برگ (LW)، قطر طبق (CD)، قطر ساقه (SD)، وزن ۱۰۰ دانه (100SW)، وزن خشک بوته (APDW)، طول دانه (SL) و روز تا رسیدگی (DM) دارای توارث‌پذیری متوسط و صفات عملکرد دانه (YIELD)، وزن خشک طبق (CW)، شاخص برداشت (HI)، طول برگ (LL)، طول دمبرگ (PL)، وزن تک دانه (SSW)، وزن مغز دانه (DHW)، نسبت مغز به کل تک دانه (DHW/SSW) و عرض دانه (SW) دارای توارث‌پذیری پایین هستند. این یافته‌ها با نتایج Eyvaznejad Hafez et al. (2014) که صفات طول و عرض برگ و طول دمبرگ بیش‌ترین وراثت‌پذیری را داشتند، مغایرت دارد که علت آن می‌تواند به دلیل متفاوت بودن نوع جمعیت مورد استفاده در تحقیق باشد.

تنوع مولکولی جمعیت مورد مطالعه با استفاده از ۷ آغازگر IRAP و ۵ آغازگر REMAP 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 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 و طبیعت دگرگشی آفتابگردان نسبت داد (Mandel et al. 2011). تجزیه کلاستر با روش Neighbor Joining در نرم‌افزار DARwin5، ۵۰ توده آفتابگردان

یک احتمال و به‌صورتی به زیرجمعیت‌های فرضی متناسب می‌شوند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. بین ۱ تا ۱۰ زیرجمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها پنج تکرار در نظر گرفته شد. برای این منظور از مدل ترکیبی Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰۰ تکرار آزمایش (burn-in) و ۱۰۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده شد تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیر جمعیت‌ها) ماتریس Q را محاسبه می‌کند که در این ماتریس، ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ به هر یک از زیرجمعیت‌ها محاسبه شده است. 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 et al. (۲۰۰۵) که بر آماره ΔK استوار بوده و شیب تابع احتمالی $\ln P(D)$ را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی در آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد. جهت شناسایی و بررسی ارتباط معنی‌دار نشانگرهای مورد بررسی با صفات مورد مطالعه از مدل خطی مخلوط (MLM) در نرم‌افزار TASSEL 2.1 استفاده شد. در مدل MLM ماتریس ضرایب Q و ماتریس K (ماتریس روابط خویشاوندی) به‌عنوان کوواریت در نظر گرفته می‌شوند.

نتایج و بحث

اجزای واریانس و ضرایب تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی برای صفات مورد بررسی محاسبه و در جدول ۳ خلاصه شده است. بالاترین پایین‌ترین ضریب تغییرات ژنتیکی به ترتیب برای صفات وزن خشک اندام هوایی و نسبت مغز به کل تک دانه مشاهده شد. بر اساس نتایج حاصل در تمامی صفات مورد مطالعه ضریب تنوع فنوتیپی از ضریب تنوع ژنتیکی بیشتر می‌باشد با وجود این، نسبت ۲ ضریب بسته به نوع صفت مورد مطالعه متفاوت است. از ضرایب تنوع ژنتیکی، محیطی و فنوتیپی برای تعیین وجود یا عدم وجود تنوع استفاده می‌شود. مقایسه این ضرایب تأثیر عوامل

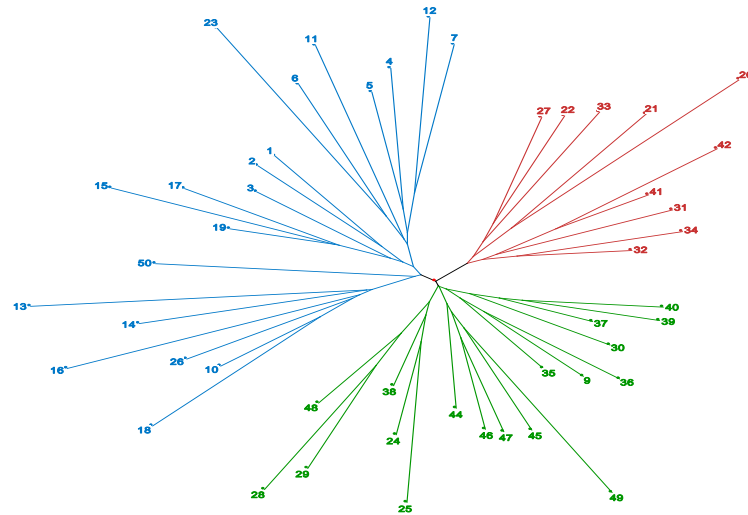
ژنوتیپ‌های موجود بر اساس مکان‌ها شباهتی در دسته بندی نشان نمی‌دهند ممکن است عدم شناخت منشا دقیق گیاه باشد یعنی ژنوتیپ‌هایی که در یک منطقه جغرافیایی وجود دارند در اصل از مکان دیگری منشا گرفته ولی تحت نام جدیدی در مقصد کشت شده باشند. چنین نتایجی اغلب بدین علت رخ می‌دهد که جابه‌جایی ژنوتیپ‌ها از منطقه‌ای به سایر بخش‌های کشور بیش‌تر بر پایه خصوصیات مورفولوژیک صورت می‌گیرد. تجزیه ساختار ژنتیکی ژرم پلاسِم مورد مطالعه (فرد $50 \times 5 = 250$) بر اساس مدل Bayesian در نرم‌افزار Structure انجام گرفت.

آجیلی مورد مطالعه را به سه گروه تقسیم‌بندی کرد (شکل ۱)، که هر یک از گروه‌ها شامل توده‌هایی از مناطق مختلف جغرافیایی بود. در زیرجمعیت اول ۲۰ توده، در زیرجمعیت دوم ۱۸ توده و در زیر جمعیت سوم ۱۰ توده قرار گرفتند. قرارگیری ژنوتیپ‌های متعلق به مناطق مختلف جغرافیایی در یک گروه بیانگر تنوع ژنتیکی در هر منطقه‌ی جغرافیایی و عدم تمرکز منابع ژنتیکی با ویژگی خاص در هر ناحیه است. از این رو به‌منظور طراحی برنامه به نژادی برای گیاه و در یک منطقه، احتمالاً امکان دسترسی به منابع ژنتیکی با قابلیت‌های مورد نظر و سازگار با همان شرایط وجود دارد (Bidkhani Nejad et al. 2015). یکی از دلایلی که

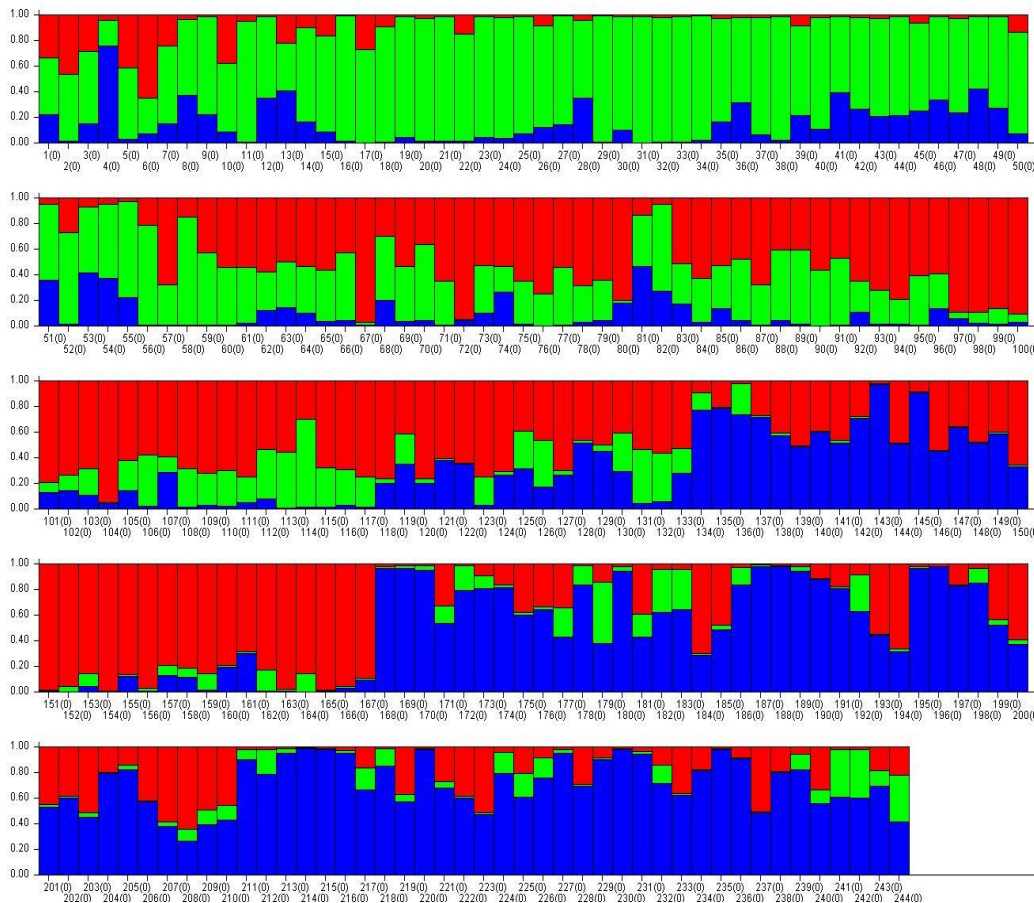
جدول ۳- آماره‌های توصیفی، اجزای واریانس و وراثت پذیری صفات مورد مطالعه در توده‌های آفتابگردان آجیلی

صفت ^o	Mean	Rang	Vg	Ve	Vph	CVg	CVph	CVg/CVph	h ²
YIELD	۵۲/۲۴	۴۷/۶۲	۵۷/۲۹	۴۶۴/۷۵	۵۲۲/۰۴	۱۴/۴۹	۴۳/۷۴	۳۳/۱۳	۰/۱۱
100SW	۹/۸۷	۹/۳۶	۲/۱۲	۶/۳۹	۸/۵۲	۱۴/۷۶	۲۹/۵۶	۴۹/۹۳	۰/۲۵
APDW	۱۳۷/۱۴	۱۳۰/۵۴	۸۳۵/۷۰	۲۱۳۱/۶۴	۲۹۶۷/۳۴	۲۱/۰۸	۳۹/۷۲	۵۳/۰۷	۰/۲۸
CW	۳۱/۱۷	۲۶/۳۶	۲۴/۰۰	۱۲۳/۰۷	۱۴۷/۰۷	۱۵/۷۲	۳۸/۹۱	۴۰/۴۰	۰/۱۶
HI	۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۱۲/۱۵	۳۵/۸۴	۳۳/۸۹	۰/۱۱
CD	۱۶/۹۰	۱۰/۱۰	۳/۴۶	۸/۴۵	۱۱/۹۰	۱۱/۰۰	۲۰/۴۲	۵۳/۸۸	۰/۲۹
LN	۳۱/۹۲	۱۹/۸۷	۱۱/۳۴	۲۲/۴۶	۳۳/۸۰	۱۰/۵۵	۱۸/۲۲	۵۷/۹۳	۰/۳۴
LL	۲۳/۰۸	۳۸/۸۳	۸/۹۸	۹۳/۷۴	۱۰۲/۷۲	۱۲/۹۹	۴۳/۹۱	۲۹/۵۷	۰/۰۹
LW	۲۰/۳۳	۶/۲۲	۱/۴۴	۵/۳۵	۶/۸۰	۵/۹۱	۱۲/۸۲	۴۶/۰۹	۰/۲۱
PL	۱۴/۰۴	۶/۰۴	۱/۳۷	۶/۳۲	۷/۷۰	۸/۳۵	۱۹/۷۷	۴۲/۲۳	۰/۱۸
SD	۷/۵۸	۲/۴۹	۰/۲۵	۰/۸۵	۱/۱۰	۶/۵۳	۱۳/۸۱	۴۷/۳۱	۰/۲۲
PH	۱۹۴/۵۲	۹۳/۵۰	۳۶۷/۷۴	۸۲۷/۱۷	۱۱۹۴/۹۲	۹/۸۶	۱۷/۷۷	۵۵/۴۸	۰/۳۱
DF	۸۷/۴۹	۲۸/۸۰	۳۹/۹۲	۳۳/۸۷	۷۳/۷۹	۷/۲۲	۹/۸۲	۷۳/۵۵	۰/۵۴
DM	۱۲۹/۹۱	۵۱/۳۳	۶۹/۱۲	۹۳/۸۷	۱۶۲/۹۹	۶/۴۰	۹/۸۳	۶۵/۱۲	۰/۴۲
SSW	۰/۴۴	۰/۵۰	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۳	۱۸/۰۸	۴۲/۴۳	۴۲/۶۰	۰/۱۸
DHW	۰/۲۵	۰/۲۷	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۱۶/۳۳	۴۰/۶۷	۴۰/۱۵	۰/۱۶
DHW/SSW	۰/۵۹	۰/۲۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۲/۲۱	۱۸/۴۰	۱۲/۰۰	۰/۰۱
SL	۱۸/۸۰	۱۰/۲۵	۳/۲۹	۷/۲۴	۱۰/۵۳	۹/۶۴	۱۷/۲۶	۵۵/۸۸	۰/۳۱
SW	۷/۶۹	۳/۶۳	۰/۳۸	۲/۵۰	۲/۸۷	۷/۹۷	۲۲/۰۴	۳۶/۱۶	۰/۱۳

Mean: میانگین، Rang: اختلاف بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین عدد، Vg: واریانس ژنتیکی، Ve: واریانس محیطی، Vph: واریانس فنوتیپی، CVg: ضریب تغییرات ژنتیکی، CVph: ضریب تغییرات فنوتیپی، h²: وراثت پذیری. YIELD: وزن دانه در طبق، 100SW: وزن صد دانه، APDW: وزن خشک بوته (وزن خشک اندام هوایی منهای وزن خشک دانه در طبق)، CW: وزن خشک طبق، HI: شاخص برداشت، CD: قطر طبق، LN: تعداد کل برگ، LL: طول پهنک برگ، LW: عرض پهنک برگ، PL: طول دم‌برگ، SD: قطر ساقه، PH: ارتفاع بوته، DF: روز تا گلدهی، DM: روز تا رسیدگی، SSW: وزن تک دانه، DHW: وزن مغز تک دانه، DHW/SSW: نسبت مغز به کل تک دانه، SL: طول دانه، SW: عرض دانه.



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 جدول ۱ آمده است.



شکل ۲- تجزیه کلاستر ژرم پلاسما آفتابگردان آجیلی مورد مطالعه (فرد ۲۵۰×۵۰) مبتنی بر مدل Bayesian در نرم‌افزار Structure. محور y ضریب عضویت هر فرد به زیر جمعیت‌ها را نشان می‌دهد. رنگ‌های سبز، آبی و قرمز بیانگر سه زیر جمعیت شناسایی شده در ژرم پلاسما مورد مطالعه می‌باشد.

جدول ۴- نتایج حاصل از تجزیه ارتباط با استفاده مدل MLM

نام صفت	نام مارکر	نوع مارکر	F-Marker	P-Marker	نام صفت	نام مارکر	نوع مارکر	F-Marker	P-Marker					
DF	U81-U82	IRAP	11.9	0.001**	100SW	CF-CR	IRAP	6.1	0.01*					
	1064-UBC826	REMAP	11.9	0.001**		CR-UBC816	REMAP	6.1	0.01*					
DM	U82-UBC827	REMAP	7.26	0.008**	YIELD	CR-U82	IRAP	9.14	0.003**					
	U81-U82	IRAP	11.72	0.001**		U81-UBC827	REMAP	7.26	0.008**					
PH	1064-UBC826	REMAP	11.72	0.001**	U81-U82	IRAP	7.54	0.007**	CF	IRAP	6.9	0.009**		
	U82-UBC827	REMAP	6.93	0.009**		CF	IRAP	7.48		0.007**				
SD	CF-CR	IRAP	6.63	0.01**	CW	CF	IRAP	7.02	0.009**	DHW	CF-CR	IRAP	7.02	0.009**
	CR-UBC816	REMAP	6.63	0.01*		CR	IRAP	7.02	0.009**					
LW	U81-UBC827	REMAP	7.31	0.007**	SSW	CF	IRAP	9.16	0.003**	DHW/SSW	CR-U82	IRAP	7.6	0.007**
	U82-UBC827	REMAP	13.96	0.0002**		CR-U82	IRAP	7.6	0.007**					
PL	U81-U82	IRAP	14.39	0.0002**	APDW	CR-UBC816	REMAP	14.08	0.0002**	SL	CR	IRAP	7.34	0.008**
	U81-U82	IRAP	10.10	0.002**		CR	IRAP	13.58	0.0003**					
CD	1064-UBC826	REMAP	14.39	0.0002**	SW	U81-UBC827	REMAP	8.5	0.004**	U81-U82	IRAP	9.2	0.003**	
	1064-UBC826	REMAP	10.10	0.002**		U81-U82	IRAP	16.1	0.0001**					
	CR-U82	IRAP	9.5	0.002**		CR-U82	IRAP	4.87	0.003**		U81-U82	IRAP	7.37	0.007**
	U81-U82	IRAP	10.45	0.001**										
	U81-U82	IRAP	14.28	0.0002**										

DF: روز تا گلدهی، DM: روز تا رسیدگی، PH: ارتفاع بوته، SD: قطر ساقه، LW: عرض پهنک برگ، PL: طول دم‌برگ، CD: قطر طبق، 100SW: وزن صد دانه، YIELD: وزن خشک دانه در طبق، CW: وزن خشک طبق، DHW: وزن مغز تک دانه، SSW: وزن تک دانه، DHW/SSW: نسبت مغز به کل تک دانه، APDW: وزن خشک بوته، SL: طول دانه، SW: عرض دانه.

نشانگرهای غیر پیوسته 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 به طور شایعی درون زیرجمعیت‌ها تثبیت شده‌اند، از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد (Flint-Garcia et al. 2005; Breseghello and Sorrells 2006).

نقشه‌یابی ارتباطی به منظور تشخیص و شناسایی ارتباط بین نشانگر-صفت نیازمند وجود تنوع ژنتیکی و فنوتیپی بالا در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد (Zhu et al. 2008). وجود ساختار و روابط خویشاوندی در جمعیت مورد مطالعه منجر به ایجاد ارتباط کاذب نشانگر-صفت در نقشه‌یابی ارتباطی می‌شود (Ataei et al. 2013; Breseghello and Sorrells 2006). مدل‌های مختلفی برای کاهش نتایج مثبت کاذب در تجزیه ارتباط مورد استفاده قرار می‌گیرد که از آن جمله می‌توان به ماتریس K در داخل مدل K و ماتریس Q در داخل مدل Q اشاره نمود. مدل دیگر Q + K می‌باشد که ترکیبی از دو مدل قبلی است و تاثیر آن در کاهش نتایج مثبت کاذب بیشتر از دو مدل Q و K است (Xu et al. 2000; Yan et al. 2009; Zhao et al. 2007).

بر اساس نتایج، سه زیر جمعیت در پانل مورد مطالعه شناسایی شد که هیچ یک از آن‌ها بر مبنای مناطقی که ژنوتیپ‌ها از آنجا جمع‌آوری شده بودند به طور کامل از هم تفکیک نشدند (شکل ۲). اختلاط شدید مشاهده شده در این ژرم پلاسما این فرض که تبار ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نوع مخلوط باشد را پیشنهاد می‌کند. یعنی فرد i ام ممکن است بخش‌هایی از ژنوم خود را از تبار خود در جمعیت k به ارث برده باشد (Ebrahimi et al. 2014). البته تعداد ناکافی نشانگرهای چندشکل استفاده شده در این مطالعه می‌تواند یکی از عوامل اساسی عدم مشاهده رابطه مشخص بین افراد هر گروه بر اساس تقسیم‌بندی‌های جغرافیایی باشد. بنابراین احتمالاً بتوان با افزایش تعداد و تغییر نوع نشانگرهای مورد استفاده به تفکیک بهتری در ژرم پلاسما مورد مطالعه دست یافت (Ebrahimi et al. 2014). بر اساس نتایج ارائه شده (شکل ۲)، با احتمال بیش‌تر از ۷۰ درصد، ۳۶ فرد متعلق به زیر ساختار اول (قرمز) و ۳۶ فرد متعلق به زیر ساختار دوم (سبز) و ۴۸ فرد متعلق به زیر ساختار سوم (آبی) می‌باشند و ۱۲۴ فرد از افراد مورد مطالعه 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

کننده مقاومت به بیماری اسکروتینیا در آفتابگردان نیز با استفاده از مدل خطی مخلوط شناسایی شد. در این مطالعه یک ژن کاندید که ۲۰ درصد از تغییرات داده‌های فنوتیپی را توجیه می‌نمود، شناسایی شد (Fusari et al. 2012).

در این مطالعه تعدادی نشانگر مشترک برای صفات مختلف شناسایی شدند. برای مثال U81-U82 به‌طور مشترک برای صفات روز تا گلدهی (DF)، روز تا رسیدگی (DM)، طول دمبرگ (PL)، قطر طبق (CD)، عملکرد (YIELD)، وزن خشک بوته (APDW) و طول دانه (SL)، U82-UBC826 به‌طور مشترک برای صفات روز تا رسیدگی (DM)، ارتفاع بوته (PH) و عرض برگ (LW)، U81-UBC827 به‌طور مشترک برای صفات قطر ساقه (SD)، عملکرد (YIELD) و عرض دانه (SW) و 1064-UBC826 به‌طور مشترک برای صفات روز تا رسیدگی (DM) و طول دمبرگ (PL) در سطح احتمال یک درصد شناسایی شد. در مطالعه Abdi et al. (2013) نیز QTL‌های مشترکی بر روی کروموزوم ۱۰ برای صفات مختلف در آفتابگردان روغنی 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). لازم است به منظور تایید و اطمینان آماری بیشتر به نتایج حاصل، تکرارپذیری نشانگرهای پیوسته در جمعیت‌های بزرگ‌تر با استفاده از یادداشت برداری از صفات مورد مطالعه در چندین مکان صورت گیرد و سپس، از نشانگرهای تایید شده در برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان به‌منظور اصلاح صفات مورفولوژیک، توسعه واریته‌هایی با عملکرد بالاتر و انتخاب به کمک نشانگر استفاده شود.

تجزیه ارتباط براساس مدل خطی مخلوط (MLM) با لحاظ کردن $Q + K$ انجام شد. براساس مدل MLM در مجموع ۳۷ مکان (۲۳ مکان IRAP و ۱۴ مکان REMAP) ارتباط معنی‌داری با صفات زراعی-مورفولوژیک در سطح احتمال یک درصد نشان دادند ($P \leq 0.01$). در مدل مذکور به‌علت حذف اثر ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی از تجزیه‌ها، پیوستگی‌های دروغین کاهش می‌یابد (Zhang et al. 2012). تعداد دو مکان پیوسته با صفت روز تا گلدهی (DF)، سه مکان پیوسته با روز تا رسیدگی (DM)، یک مکان پیوسته با ارتفاع بوته (PH)، سه مکان پیوسته با قطر ساقه (SD)، یک مکان پیوسته با عرض برگ (LW)، شش مکان پیوسته با طول دمبرگ (PL)، دو مکان پیوسته با قطر طبق (CD)، سه مکان پیوسته با وزن ۱۰۰ دانه (100SW)، سه مکان پیوسته با عملکرد دانه در طبق (YIELD)، یک مکان پیوسته با وزن خشک طبق (CW)، دو مکان پیوسته با وزن مغز تک دانه (DHW)، دو مکان پیوسته با وزن تک دانه (SSW)، سه مکان پیوسته با نسبت مغز به کل تک دانه (DHW/SSW)، دو مکان پیوسته با وزن خشک بوته (APDW)، دو مکان پیوسته با طول دانه (SL) و یک مکان پیوسته با عرض دانه (SW) شناسایی شد. بیش‌ترین تعداد مکان پیوسته (شش مکان) برای صفت طول دمبرگ (PL) و کمترین تعداد (یک مکان) برای صفات ارتفاع بوته (PH)، عرض برگ (LW)، وزن خشک طبق (CW) و عرض دانه (SW) شناسایی شد (جدول ۴). در یک مطالعه ساختار جمعیت و نقشه-یابی ارتباطی برای صفات مختلف مورفولوژیک در آفتابگردان روغنی با استفاده از نشانگرهای IRAP، REMAP و SSR بررسی شد. مدل MLM توانست ۲۲۴ مکان ژنی مرتبط با صفات مورد بررسی را شناسایی کند (Darvishzadeh 2016). Vanitha et al. (2014) با استفاده از نشانگرهای SSR، ۲۹ نشانگر را در آفتابگردان روغنی شناسایی نمودند که رابطه معنی‌داری با صفات مختلف آگرومورفولوژیک نشان می‌دادند. مکان‌های ژنی کنترل

منابع

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 Journal 5: 149-158.

Abdi N, Darvishzadeh R, Hatami Maleki H, Haddadi P, Sarraf A (2013) Identification of quantitative trait loci for relative water content and chlorophyll concentration traits in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus*

- annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. *Zemdirbyste-Agriculture* 100: 159-166.
- Allinne C, Maury P, Sarrafi A, Griefu P (2009) Genetic control of physiological traits associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions. *Plant Science* 177: 349-359.
- Al-Maskri AH, Sajjad M, Khan SH (2012) Association mapping: a step forward to discovering new alleles for crop improvement. *International Journal of Agriculture and Biology* 14: 153-160.
- Ataei R, Mohammadi V, Talei A, Naghavi MR (2013) Association mapping for root characteristics in barley (*Hordeum vulgare*). *Iranian Journal of Field Crop Science* 44: 347-357. (In Farsi).
- Bidkhani Nejad F, Mohammadi Mirik A, Dashti H (2015) Evaluation of two subspecies of flax (*Linum usitatissimum*) in different geographical regions for genetic diversity of seed yield and its components. *Iranian Journal of Field Crop Science* 45: 603-611 (In Farsi).
- Bresegheo 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.
- 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. *Phytopathologia Mediterranea*. 49: 330-341.
- Darvishzadeh R (2016) Population structure, linkage disequilibrium and association mapping for morphological traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 30: 236-246.
- Ebrahimi MA, Mir M, Zinalabedini M, Imani A (2014) Application of microsatellite markers and some morphological traits in core collection identification of *Prunus dulcis* Mill. *Crop Biotechnology* 8: 57-75. (In Farsi).
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Eyvaznejad Hafez N, Darvishzadeh R, Bernousi I, Moghaddam M, Jalilian J, Hatami-Maleki H, Hadi H, Rahimi M (2014) Evaluation of genetic diversity and classification of sunflower recombinant inbred lines using agro-morphological traits. *Journal of Agronomy Science* 5: 77-87. (In Farsi).
- 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 Journal* 44: 1054-1064.
- 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.
- Hu J, Seiler G, Kole C (2010) Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower. Routledge, USA, 342 pp.
- Jannatdoust M, Darvishzadeh R, Ziaiefard R, Azizi H, Gholinezhad E (2015) Association mapping for grain quality related traits in confectionery sunflower (*Helianthus annuus* L.) using retrotransposon markers under normal and drought stress conditions. *Crop Biotechnology* 9: 15-28. (In Farsi).
- 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.
- Mackay I, Powell W (2007) Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. *Trends in Plant Sciences* 12: 57-63.
- 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. *Theoretical and Applied Genetics* 123: 693-704.
- Moose SP, Mumm RH (2008) Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology* 147: 969-977.
- Movafegh S, Rabiee B, Zare-Feizabadi A, Taheri G (2009) Mapping QTLs controlling yield in two Iranian rice cultivars-F₂ populations. *Iranian Journal of Field Crops Research* 7: 673-683. (In Farsi).
- Nambeesan SU, Mandel JR, Bowers JE, Marek LF, Ebert D, Corbi J, Rieseberg LH, Knapp SJ, Burke JM (2015) Association mapping in sunflower (*Helianthus annuus* L.) reveals independent control of apical vs. basal branching. *BMC Plant Biology* 15: 1-12.
- Oraguzie NC, Wilcox PL, Rikkerink EHA, de Silva HN (2007) Linkage disequilibrium, Association Mapping in Plants. Springer, New York, NY pp: 11-39.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Rafalski A, Morgante M (2004) Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size. *Trends in Genetics* 20: 103-111.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18656-18661.
- Shapiro SS, Wilk MB (1965) An analysis of variance test for normality (Complete samples). *Biometrics* 52: 591-611.
- Stansfield WD (1991) *Theory and Problems in Genetics*. McGraw-Hill, 452 pp.
- Tuberosa R, Salvi S, Sanguineti MC, Landi P, Maccaferri M, Conti S (2002) Mapping QTLs regulating morphophysiological 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: 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.
- Xu W, Subudhi PK, Crasta OR, Rosenow DT, Mullet JE, Nguyen HT (2000) Molecular mapping of QTLs conferring stay-green in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Genome* 43: 461-469.
- Yan J, Shan T, Warburton M, Buckler E, McMullen M, Crouch J (2009) Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers. *PLoS ONE* 4: 8451.
- Yao J, Wang L, Liu L, Zhao C, Zheng Y (2009) Association mapping of agronomic traits on chromosome 2A of wheat. *Genetica* 137: 67-75.
- Yu JM, Buckler ES (2006) Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 155-160.
- Yue B, Cai X, Yuan W, Vick B, Hu J (2009) Mapping quantitative trait loci controlling seed morphology and disk diameter in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia* 32: 17-36.
- Zhang Q, Wu C, Ren F, Li Y, Zhang C (2012) Association analysis of important agronomical traits of maize inbred lines with SSRs. *Australian Journal of Crop Science* 6: 1131-1138.
- Zhao J, Paulo MJ, Jamer D, Lou P, Eeuwijk FV, Bonnema G, Vreugdenhil D, Koornneef M (2007) Association mapping of leaf traits, flowering time, and phytate content in *Brassica rapa*. *Genome* 50: 963-973.
- Zhu CM, Gore E, Buckler S, Yu J (2008) Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome* 1: 5-20.