

بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های جهش‌یافته آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) و شناسایی نشانگرهای AFLP پیوسته با صفات گیاهچه‌ای تحت شرایط تنش شوری

حمید حاتمی ملکی^۱، مرجان جنت‌دوست^۲، رضا درویش‌زاده^{۳*}

۱. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه

۲. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه

۳. استاد گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۱۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۹/۳۰)

Studying genetic variation of sunflower mutant lines and identification of AFLP markers associated with seedling characteristics under salinity stress conditions

Hamid Hatami Maleki¹, Marjan Jannatdoust², Reza Darvishzadeh^{3*}

1. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran

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

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

(Received: Oct. 1, 2015-Accepted: Dec. 20, 2015)

Abstract

Salinity stress is one of the abiotic stresses which threaten plant species. Achieving any progress in breeding for tolerance to stresses needs existence of genetic diversity. In this research, reaction of 53 sunflower mutant lines seedlings accompanied by their parental line was studied in several salinity levels including 0, 2, 4, 6, 8 ds/m. Also, in molecular experiment, genetic diversity of mutant lines was inspected using AFLP markers. Results revealed significant differences among the studied lines in each of salinity level based on seedling characteristics. Two hundreds loci were amplified using 17 combinations of AFLP primers in the studied lines. Analysis of population structure classified studied mutant lines in two subgroups. Considering association mapping, 43 AFLP markers had significant relation with seedling characteristics. Phenotypic variance of the identified markers varied between 0.13 and 0.42.

Keywords: Association mapping, gamma radiation, genetic diversity, salinity stress, sunflower.

چکیده

تنش شوری از جمله تنش‌های غیرزنده تهدیدکننده گیاهان است. مطالعه تنوع ژنتیکی گیاهان برای پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی گیاهی در راستای ایجاد ارقام متحمل به تنش مهم می‌باشد. در این تحقیق، ابتدا واکنش گیاهچه‌ای ۵۳ لاین جهش‌یافته آفتابگردان به‌همراه والد مادری در سطوح مختلف شوری (صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ دسی‌زیمنس - برمتر) بررسی شد. همچنین، در آزمایش مولکولی تنوع ژنتیکی لاین‌ها با استفاده از نشانگرهای AFLP مطالعه گردید. نتایج نشان داد که از نظر صفات گیاهچه‌ای اختلاف معنی‌داری بین لاین‌های مورد مطالعه در هر یک از سطوح شوری وجود دارد. با استفاده از ۱۷ ترکیب آغازگری AFLP، تعداد ۲۰۰ مکان ژنی در جمعیت مورد مطالعه تکثیر یافت. با تجزیه ساختار جمعیت مورد مطالعه، لاین‌های جهش‌یافته مورد مطالعه در ۲ زیر گروه قرار گرفتند. نتایج مکان‌یابی ارتباطی نشان داد که تعداد ۴۳ نشانگر ارتباط معنی‌دار با صفات گیاهچه‌ای دارند. ضریب تبیین فنوتیپی نشانگرهای شناسایی شده بین ۰/۱۳ تا ۰/۴۲ متغیر بود.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، اشعه گاما، تنش شوری، تنوع ژنتیکی، مکان‌یابی ارتباطی.

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) یکی از گیاهان دانه روغنی رایج و مهم در دنیا است (Hu et al., 2010). دانه آفتابگردان منبع غنی از پروتئین‌ها (۳۵٪)، کربوهیدرات‌ها (۱۸-۲۰٪) و ویتامین‌های مختلفی نظیر D، E، K و A است (Hossain et al., 2010). گیاهان در مراحل مختلف زندگی با شرایط تنش‌ناگونی مواجه هستند. این شرایط توسط عوامل زنده یا غیرزنده ایجاد می‌شود و بر جوانه‌زنی و رشد گیاهان اثر می‌گذارد. تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی محسوب می‌شود که می‌تواند منجر به کاهش جوانه‌زنی، رشد و تولید محصولات زراعی گردد (Almansouri et al., 2001; Kaya et al., 2006; Atak et al., 2006).

بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان برای حفاظت از ذخایر توارثی و پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی گیاهی در راستای ایجاد ارقام متحمل به تنش مهم می‌باشد (Mohammadi & Prasanna, 2003; Rostami-Ahmadvandi et al., 2013). در سال‌های اخیر با استفاده از نشانگرهای مولکولی DNA روابط ژنتیکی و چندشکلی موجود در ژرم‌پلاسم آفتابگردان گزارش شده است. تحقیقات نشان داده است که تنوع القایی از طریق مواد جهش‌زای فیزیکی و شیمیایی نیز می‌تواند مکمل تنوع ژنتیکی طبیعی بوده و به‌عنوان ابزاری سودمند در به‌نژادی گیاهان استفاده شود (Camargo et al., 2000). جهش‌های القایی در گیاهان مختلف از قبیل گندم (Boyd et al., 2002) و نخود (Ahloowalia et al., 2004) ایجاد شده و موفقیت‌هایی در اصلاح مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زای قارچی از قبیل بیماری زنگ زرد و قهوه‌ای در گندم، و پژمردگی فوزاریومی در نخود حاصل شده است. در گیاه آفتابگردان نیز از طریق اشعه گاما جهش‌هایی القاء شده است (Maluszynski et al., 2000). در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم جهش‌یافته گیاهان گزارشات کمی وجود دارد. مرور منابع نشان می‌دهد که از

نشانگرهای مورفولوژیکی (Alvarez et al., 2000) و نشانگرهای مولکولی از قبیل ایزوزایم (Alvarez et al., 2000) و AFLP (Rashid et al., 2009) در بررسی تنوع ژنتیکی در بین لاین‌های جهش‌یافته برنج استفاده شده است. همچنین در مطالعه‌ای، Chen et al. (2011) از نشانگر AFLP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم لوبیا حاوی جهش یافته‌های القایی توسط نیترات سدیم استفاده نموده و گزارش کردند که نیترات سدیم می‌تواند به‌عنوان یک ماده جهش‌زای موثر در جهت افزایش تنوع ژنتیکی موجود در لوبیا به کار برود.

با ارزیابی تنوع فنوتیپی و مولکولی جمعیت می‌توان همچنین علاوه بر اطلاع از غنای آلی، از طریق تجزیه ارتباطی (Association analysis) به‌عنوان یک روش جایگزین بر تجزیه مبتنی بر پیوستگی (Linkage-based analysis) نشانگرهای مولکولی پیوسته با عوامل کنترل‌کننده صفات را شناسایی کرد. شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات و گزینش به‌کمک نشانگر، ابزاری مناسب برای اصلاح صفات با وراثت‌پذیری پایین و همچنین صفات با قابلیت ظهور در مراحل انتهایی رشد و توسعه گیاه می‌باشد. شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با تحمل به شوری و کاربرد آن‌ها در انتخاب به‌کمک نشانگر سبب افزایش کارایی به‌نژادی و قدرت انتخاب می‌شود (Wang et al., 2011). این روش به‌طور وسیع توسط محققین مختلف برای شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفاتی از قبیل مقاومت به سرما در برنج (Kuroki et al., 2007)، زمان خوشه‌دهی و مقاومت به یخ‌زدگی در گندم (Sofalian et al., 2008)، حجم، تعداد ریشه‌های مویین، میانگین قطر و وزن خشک ریشه در جو (Atayee et al., 2013) و مقاومت به بیماری ساقه سیاه فوما در آفتابگردان (Darvishzadeh et al., 2008) استفاده شده است. این تحقیق با هدف ارزیابی واکنش گیاهچه‌ای لاین‌های جهش‌یافته

(M۶) حاصل از تیمار لاین AS613 با دز ۷۵ گری اشعه گاما (Sarrafi *et al.*, 2000; Darvishzadeh *et al.*, 2008)، جهت مطالعات بعدی استفاده گردید. لاین خویش آمیخته AS613 از تلاقی ENSAT-704 × 125 و مدیریت جمعیت در حال تفرق با بالک تک بذری حاصل شده است (Sarrafi *et al.*, 2000). کد و نام ۵۳ لاین جهش‌یافته به‌همراه لاین والدی در جدول ۱ آورده شده است.

آفتابگردان به تنش شوری و ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای AFLP مرتبط با تنوع صفات مورد ارزیابی از طریق تجزیه ارتباطی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش بذور ۵۳ لاین جهش‌یافته نسل ششم

جدول ۱. نام و کد ژنوتیپ‌های جهش‌یافته آفتابگردان مورد استفاده در تحقیق حاضر

شماره	کد	نام لاین	شماره	کد	نام لاین
-	-	AS613	۲۷	192	M5-796-2
۱	165	M5-225-2	۲۸	194	M5-495-1
۲	166	M5-39-2-1	۲۹	196	M5-792-2
۳	167	M5-381-1-1	۳۰	197	M5-771-1
۴	168	M5-375-1	۳۱	198	M5-214-1
۵	169	M5-691-1	۳۲	199	M4-886-3
۶	170	M5-53-2	۳۳	202	M5-16-2
۷	171	M5-653-1	۳۴	203	M5-78-1
۸	172	M5-39-2-2	۳۵	205	M5-133-1
۹	173	M5-263-2	۳۶	206	M5-135-2
۱۰	175	M5-641-2-1	۳۷	207	M5-52-1-1
۱۱	176	M5-66-1	۳۸	209	M5-85-3
۱۲	177	M5-696-1-1	۳۹	211	M5-281-1
۱۳	178	M5-509-1	۴۰	212	M5-531-2
۱۴	179	M5-46-1	۴۱	213	M5-32-1-1
۱۵	180	M5-826-2-1	۴۲	214	M5-652-1
۱۶	181	M5-133-2	۴۳	215	M5-435-2
۱۷	182	M5-99-2	۴۴	216	M5-502-2-2
۱۸	183	M5-862-1	۴۵	217	M5-38-1
۱۹	184	M5-696-1-2	۴۶	218	M5-575-1
۲۰	185	M5-54-1A	۴۷	220	M5-286-1
۲۱	186	M5-357-1	۴۸	221	M5-582-2
۲۲	187	M5-186-1	۴۹	222	M5-826-2-2
۲۳	188	M5-378-1	۵۰	223	M5-143-2
۲۴	189	M5-844-1	۵۱	224	M4-901-2
۲۵	190	M5-676-1-1	۵۲	225	M5-32-2
۲۶	191	M5-485-2	۵۳	226	M5-36-2

اندازه‌گیری ویژگی‌های رشدی گیاهچه‌ها تحت شرایط تنش شوری

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه انجام شد. هر واحد آزمایشی شامل یک پتری‌دیش با قطر ۹۵ میلی‌متر و حاوی ۲۰ عدد بذر بود. بذرها با هیپوکلرید سدیم ۵ درصد ضدعفونی و سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو شدند و سپس در پتری‌دیش‌هایی شامل سه لایه کاغذ واتمن و ۸ میلی‌لیتر آب مقطر با شوری (NaCl) صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر بسته به نوع تیمار کشت و به اتاق رشد با دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵۸٪ و دوره روشنایی ۱۶ ساعت با شدت نور $200 \mu\text{Em}^{-2}$ منتقل شدند. بذرها زمانی جوانه‌زده محسوب می‌شدند که ریشه‌چه حدود یک میلی‌متر طول داشت (Khan *et al.*, 2004). با بررسی روزانه وضعیت جوانه‌زنی، سرعت (Germination rate; GR) و درصد جوانه‌زنی (Percentage of germination; PG) محاسبه گردید. ۱۳ روز پس از انتقال بذور به پتری‌دیش‌ها، ۶ صفت گیاهچه‌ای شامل طول ساقه‌چه (Shoot length; SL)، طول ریشه‌چه (Root length; RL)، وزن تر ساقه‌چه (Shoot fresh weight; SFW)، وزن تر ریشه‌چه (Root fresh weight; RFW)، وزن خشک ساقه‌چه (Shoot dry weight; DSW) و وزن خشک ریشه‌چه (Root dry weight; DRW) اندازه‌گیری گردید.

استخراج DNA ژنومی و نشانگر AFLP

از اطلاعات الگوی پلی‌مورفیسم تهیه شده با نشانگرهای AFLP توسط درویش‌زاده و همکاران (۲۰۰۸) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباط استفاده شد. به‌طور خلاصه DNA ژنومی گیاهچه‌های ۱۰ تا ۱۵ روزه با استفاده از روش Fulton *et al.* (1995) استخراج و سپس کمیت و

کیفیت DNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ تعیین شد. ترکیبات آغازگری مختلف از MseI/EcoRI (جدول ۲) برای انگشت‌نگاری AFLP مطابق با روش Rachid Al-Chaarani *et al.* (2004) مورد استفاده قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

امتیازدهی الگوی باندها، به صورت یک برای وجود باند و صفر برای عدم وجود باند انجام گرفت. فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب Dice محاسبه گردید و سپس تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم Neighbour-Joining در نرم‌افزار Darwin 3.0 انجام شد. با بکارگیری روش Bayesian در نرم‌افزار Structure 2.3.4، تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیر جمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط انجام گرفت (Pritchard *et al.*, 2000). در این نرم‌افزار، مقادیر زیرجمعیت‌های فرضی اولیه (مقادیر اولیه K) بین ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها جهت افزایش دقت، ۵ تکرار لحاظ گردید. همچنین جهت حصول منحنی حداکثر درست‌نمایی از مدل Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰ تکرار آزمایش (Burn-in) و ۱۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده گردید. میزان عدم تعادل لینکاژی (LD) با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 محاسبه گردید. عدم تعادل پیوستگی (Linkage Disequilibrium) ارتباط غیر تصادفی بین آلل‌ها در جایگاه‌های ژنی مختلف را می‌نامند که از این پیوستگی ژنتیکی غیرتصادفی بین نشانگرها و ژن‌های کنترل‌کننده صفات می‌توان برای تعیین مکان ژن‌ها استفاده نمود. در مرحله بعدی با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1، شناسایی نشانگرهای مرتبط و دارای ارتباط معنی‌دار با صفات مورد ارزیابی،

براساس مدل خطی عمومی (GLM) وابسته به مدل Q (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت) و مدل خطی مخلوط (MLM) وابسته به مدل Q+K انجام گرفت.

جدول ۲. ترکیبات آغازگرهای AFLP مورد استفاده

ترکیب آغازگری	تعداد نوارهای پلی مورف	ترکیب آغازگری	تعداد نوارهای پلی مورف
E31M48	9	E33M61	8
E31M50	13	E33M62	10
E31M62	10	E37M48	8
E33M47	13	E37M50	27
E33M48	9	E37M62	9
E33M49	15	E38M62	8
E33M50	16	E40M50	9
E33M59	15	E40M59	9
E33M60	11		
Total= 200			

نتایج و بحث

تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ژنوتیپ‌های جهش‌یافته آفتابگردان

مقادیر آماره‌های توصیفی مربوط به صفات گیاهچه‌ای در ژنوتیپ‌های جهش‌یافته آفتابگردان تحت شرایط تنش شوری صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج ارزیابی‌های مورفولوژیک بیانگر وجود تنوع در بین لاین‌های جهش‌یافته آفتابگردان در هر یک از سطوح تنش شوری می‌باشد. در این مطالعه، از تکنیک AFLP به منظور ارزیابی تنوع مولکولی در بین جهش‌یافته‌های القایی آفتابگردان استفاده گردید (جدول ۲). با توجه به اینکه در نشانگر AFLP تعداد زیادی مکان ژنی به‌طور همزمان تکثیر می‌شوند، از نشانگرهای AFLP به‌وفور جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های با درجات مختلفی از شباهت و بویژه بین ژنوتیپ‌های با فاصله ژنتیکی کم استفاده می‌شود. همچنین با توجه به فراوانی کم جهش‌ها، در بررسی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های جهش‌یافته، نیازمند سیستم نشانگری حساسی مانند AFLP می‌باشد (Witkowitz *et al.*, 2003). در مجموع ۲۰۰ نوار چندشکل توسط ۱۷ ترکیب آغازگری نشانگر AFLP شناسایی شدند. بیشترین تعداد نوار

چندشکل (۲۷ عدد) در ترکیب آغازگری E37M50 و کمترین تعداد نوار چندشکل (۸ عدد) مربوط به ترکیبات آغازگری E33M61، E37M48 و E38M62 می‌باشد (جدول ۲). تعداد زیاد نوارهای چندشکل در مطالعه حاضر می‌تواند دلیلی بر کارایی بالای نشانگر AFLP در شناسایی چندشکلی‌ها باشد (Chen *et al.*, 2011). کارایی نشانگر AFLP در مطالعه ژرم‌پلاسم‌های جهش‌یافته گیاهانی از قبیل نرگس (Lu *et al.*, 2007)، برنج (Rashid *et al.*, 2009)، و لوبیا (Chen *et al.*, 2011) گزارش شده است. در مطالعه‌ای، Rashid و همکاران (۲۰۰۹) از طریق اشعه گاما ژنوتیپ‌های جهش‌یافته‌ای در برنج باسماتی ایجاد نمودند که از لحاظ عملکرد و اجزای آن از والدین خود برتر بودند و سپس با استفاده از نشانگرهای AFLP ژنوتیپ‌ها را در دو گروه مجزا قرار دادند. اخیراً، Chen و همکاران (۲۰۱۱) در ارزیابی تنوع ژنتیکی لوبیا شامل جهش‌یافته‌های القایی (از طریق نیترات سدیم) و ارقام تجاری، تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای گزارش کردند. زمانی که گیاه در معرض شرایط تنش‌زای محیطی قرار می‌گیرد طیف وسیعی از پاسخ‌ها را در سطح مولکولی، سلولی و در سراسر گیاه ایجاد می‌کند. این پاسخ‌ها گاهی با القا تغییرات در تبادف ژن‌ها و یا در میزان

بیان برخی ژن‌ها در گیاه همراه است. اشعه گاما می‌تواند باعث القا تغییراتی از نوع تغییر در توالی نوکلئوتیدها در گیاه شود که فراوانی این تغییرات به‌مقدار زیادی به‌شدت و مدت تابش و تعداد رادیکال‌های آزاد تولید شده در سلول‌های تابش دیده بستگی دارد (Sherif *et al.*, 2011).

جدول ۳. آماره‌های توصیفی صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های جهش‌یافته آفتابگردان

Trait	Salt (dS/m)	Mean	Max	Min	STDEV	Trait	Salt (dS/m)	Mean	Max	Min	STDEV	
RFW	0	0.125	0.207	0.018	0.041	GR	0	0.005	0.006	0.004	0.0004	
	2	0.082	0.204	0.015	0.039		2	0.402	0.627	0.295	0.075	
	4	0.112	0.411	0.014	0.071		4	0.453	0.645	0.043	0.088	
	6	0.070	0.143	0.011	0.038		6	0.611	0.611	0.611	1.92	
	8	0.1039	0.178	0.010	0.051		8	0.45	0.716	0.279	0.071	
SFW	0	0.240	0.32	0.006	0.058	PG	0	68.13	76.66	38.33	8.44	
	2	0.188	0.346	0.036	0.076		2	65.46	75	35	10.13	
	4	0.150	0.303	0.017	0.073		4	61.78	75	36.66	10.51	
	6	0.100	0.215	0.021	0.044		6	61.25	75	33.33	9.40	
DRW	8	0.130	0.236	0.019	0.044	RL	8	56.04	75	11.66	13.90	
	0	0.009	0.230	0.002	0.029		0	7.65	10.18	1.87	1.48	
	2	0.007	0.018	0.002	0.002		2	6.48	35.96	1.2	4.62	
	4	0.008	0.065	0.002	0.008		4	6.06	11.58	2.31	2.35	
DSW	6	0.006	0.011	0.001	0.002	SL	6	5.40	11	0	3.08	
	8	0.007	0.010	0.001	0.002		8	6.67	13.18	1.3	2.89	
	0	0.017	0.123	0.006	0.023		0	10.29	18.38	1.78	3.32	
	2	0.014	0.070	0.005	0.008		2	6.48	10.91	1.33	2.38	
AS613 (parent genotype)	4	0.015	0.089	0.004	0.012	AS613 (parent genotype)	4	5.29	10.16	1.51	2.34	
	6	0.010	0.059	0.004	0.007		6	3.30	7	0	1.67	
AS613 (parent genotype)	8	0.012	0.100	0.003	0.012	AS613 (parent genotype)	8	4.34	7.94	1.04	1.46	
	Mean						Mean					
AS613 (parent genotype)	Salt (dS/m)					AS613 (parent genotype)	Salt (dS/m)					
	RFW	0.169	0.337	0.009	0.039		6	0.320	0.235	0.011	0.0325	53.33
	SFW	0.291	0.238	0.005	0.41		8	0	0	0	0	
	DRW	0.197	0.154	0.006	0.024							
	DSW											
GR	66.66	66.66	50									

*Mean: میانگین، Max: حداکثر، Min: حداقل، STDEV: انحراف معیار، RFW: وزن تر ریشه‌چه، SFW: وزن تر ساقه‌چه، DRW: وزن خشک ریشه‌چه، DSW: وزن خشک ساقه‌چه، GR: سرعت جوانه‌زنی، PG: درصد جوانه‌زنی، RL: طول ریشه‌چه، SL: طول ساقه‌چه.

G3 از نظر ژنتیکی به ژنوتیپ والدی (AS613) نزدیک بوده و با آن در یک گروه قرار گرفته‌اند. به‌منظور بهره‌مندی از اطلاعات تنوع فنوتیپی و مولکولی در جمعیت لاین‌های حاصل از جهش برای انجام تجزیه ارتباط، ساختار جمعیت با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر AFLP مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه ساختار جمعیت به زیرجمعیت‌ها، شناسایی ژنوتیپ‌های مختلط را نیز امکان‌پذیر می‌سازد (Dadras *et al.*, 2014). برای انجام تجزیه ارتباط در حالت ایده‌آل نباید ساختاری در

در این مطالعه، گروه‌بندی لاین‌های جهش‌یافته مورد مطالعه با استفاده از ضریب فاصله Dice و الگوریتم Neighbour-Joining، آن‌ها را در گروه‌های مجزایی قرار داد (شکل ۱) که با توجه به مقادیر Bootstrap، تمایز گروه‌ها در دندروگرام مشخص می‌باشد. با توجه به شکل ۱، اشعه گاما به‌عنوان ماده جهش‌زای فیزیکی می‌تواند در ایجاد و افزایش تنوع ژنتیکی پایه آفتابگردان موثر واقع شود. نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان می‌دهد که از بین ژنوتیپ‌های جهش‌یافته القایی مورد مطالعه، ژنوتیپ‌های G1 و

در تعداد محدودی گروه (۲ گروه) قرار گرفتند. در این تحقیق، با احتمال بیشتر از ۷۰ درصد، ۱۳ ژنوتیپ متعلق به زیر ساختار اول (قرمز) و با احتمال بیشتر از ۷۰ درصد، ۴۰ ژنوتیپ متعلق به زیر ساختار دوم (سبز) می‌باشند (شکل ۳). جدول ۴، درصد عضویت ژنوتیپ‌های جهش‌یافته مورد مطالعه به هر یک از زیرجمعیت‌ها را نشان می‌دهد. با توجه به جدول ۴، بیشترین میزان Q مربوط به زیر ساختار دوم (سبز) با مقدار ۰/۹۹۴ می‌باشد. وجود ساختار در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بیانگر اهمیت استفاده از ماتریس ساختار جمعیت در مطالعات مرتبط با مکان‌یابی ارتباطی در ژرم‌پلاسم ژنوتیپ‌های جهش‌یافته آفتابگردان است تا بتوان درصد خطاهای مثبت (نشانگرهای پیوسته شناسایی شده که در اصل پیوسته نمی‌باشند) را کاهش داد.

جمعیت مورد مطالعه وجود داشته باشد، زیرا وجود ساختار در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند عامل بازدارنده در جهت دستیابی به نتایج قابل اعتماد باشد (Pritchard *et al.*, 2000). در این بررسی، نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به زیرجمعیت‌های متمایز از نظر ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است. با توجه به تغییرات مقدار ΔK به ازای تعداد مختلف گروه‌ها (K) (Evanno *et al.*, 2005) (شکل ۲) و حداکثر بودن منحنی در $K=2$ ، ژنوتیپ‌های جهش‌یافته مورد مطالعه در ۲ گروه قرار گرفتند. در توافق با نتایج این پژوهش، در تحقیقات قبلی (Mandel *et al.*, 2011 and 2013) نیز ژنوتیپ‌های آفتابگردان مورد مطالعه

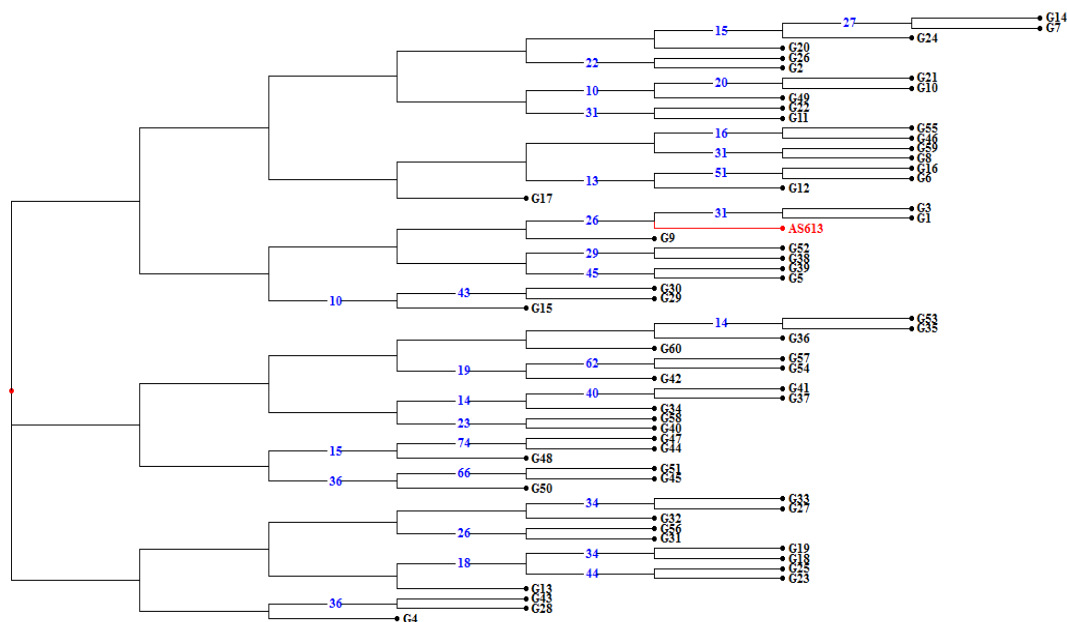
جدول ۴. درصد عضویت ژنوتیپ‌های جهش‌یافته آفتابگردان در زیر گروه‌های شناسایی شده

Admixed subgroups		Genotype name	Label	Admixed subgroups		Genotype name	Label
Q2	Q1			Q2	Q1		
0.993	0.007	194	28	0.761	0.239	178	1
0.902	0.098	196	29	0.983	0.017	165	2
0.977	0.023	197	30	0.853	0.147	166	3
0.981	0.019	198	31	0.989	0.011	167	4
0.016	0.984	199	32	0.907	0.093	168	5
0.909	0.091	202	33	0.007	0.993	169	6
0.165	0.835	203	34	0.981	0.019	170	7
0.969	0.031	205	35	0.013	0.987	171	8
0.892	0.108	206	36	0.022	0.978	172	9
0.77	0.23	207	37	0.991	0.009	173	10
0.986	0.014	209	38	0.048	0.952	175	11
0.984	0.016	211	39	0.988	0.012	176	12
0.991	0.009	212	40	0.737	0.263	177	13
0.769	0.231	213	41	0.894	0.106	179	14
0.034	0.966	214	42	0.975	0.025	180	15
0.012	0.988	215	43	0.987	0.013	181	16
0.972	0.028	216	44	0.984	0.016	182	17
0.992	0.008	217	45	0.011	0.989	183	18
0.982	0.018	218	46	0.963	0.037	184	19
0.993	0.007	220	47	0.109	0.891	185	20
0.891	0.109	221	48	0.828	0.172	186	21
0.982	0.018	222	49	0.949	0.051	187	22
0.033	0.967	223	50	0.994	0.006	188	23
0.965	0.035	224	51	0.071	0.929	189	24
0.992	0.008	225	52	0.014	0.986	190	25
0.971	0.029	226	53	0.994	0.006	191	26
				0.875	0.125	192	27

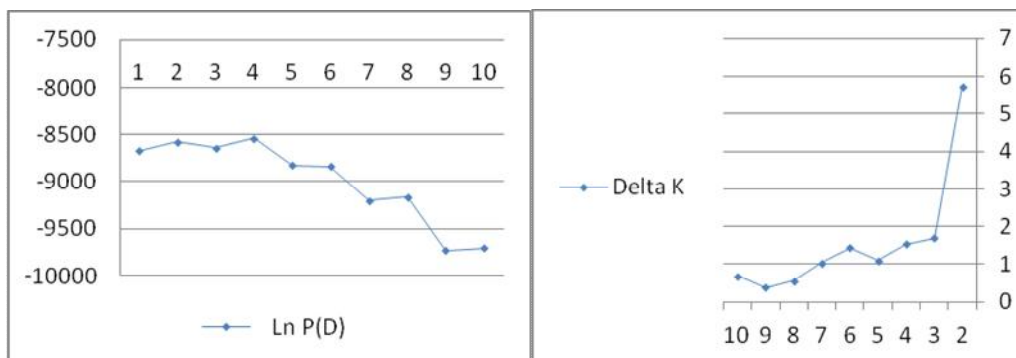
جدول ۵. نشانگرهای پیوسته (مشترک شناسایی شده با استفاده از دو روش GLM و MLM) با صفات مورد مطالعه در سطوح مختلف تنش شوری

R ² Marker	Locus	Trait	Salt (dS/m)	R ² Marker	Locus	Trait	Salt (dS/m)
0.2093	E33M59-2	RFW	4	0.1364	E33M49-6	DSW	صفر
0.1728	E40M59-4	DSW		0.1801	E33M59-1	DSW	
0.1637	E33M49-5	PGS		0.205	E33M60-9	GR	
0.1874	E33M50-11	GR		0.1986	E31M48-4	RL	
0.1874	E37M50-11	GR	0.1986	E33M48-4	RL		
0.1539	E33M59-3	SFW	6	0.2628	E31M50-10	SL	
0.1734	E40M50-1	RFW		0.1572	E31M50-13	SL	
0.1491	E33M59-3	DRW		0.1527	E33M47-10	SFW	
0.1695	E33M47-9	PGS		0.1978	E33M49-5	DRW	
0.1524	E33M49-3	PGS		0.2901	E37M50-2	DSW	
0.1607	E33M59-1	PGS		0.3395	E40M50-4	DSW	
0.1487	E37M50-4	PGS		0.1662	E33M59-14	PGS	
0.1832	E37M62-1	PGS		0.4208	E38M62-3	PGS	
0.2176	E37M48-7	GR		0.1436	E33M49-5	GR	
0.2495	E37M50-2	GR		0.1887	E37M50-13	GR	
0.1864	E37M50-13	SL	0.1576	E33M47-10	SL	2	
0.1973	E37M50-13	RL	0.1743	E37M48-6	RL		
0.1574	E33M60-9	RL	0.3117	E40M50-2	RL		
0.1602	E33M59-4	RFW	0.1826	E40M50-5	RL		
0.2109	E31M48-4	DSW	8	0.1812	E40M50-6	RL	
				0.1626	E40M59-4	RL	

GLM: general linear model; MLM: mixed linear model.



شکل ۱. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جهش‌یافته آفتابگردان با استفاده از ضریب فاصله Dice و الگوریتم Neighbour-Joining



شکل ۲. نمودارهای دوسویه برای تعیین تعداد مناسب زیر جمعیت ($K=2$) در لاین‌های جهش‌یافته آفتابگردان مورد مطالعه



شکل ۳. گروه‌بندی مبتنی بر مدل Bayesian در نرم‌افزار STRUCTURE برای ژنوتیپ‌های جهش‌یافته آفتابگردان مورد مطالعه. هر رنگ یک زیر جمعیت را نشان می‌دهد.

به‌عنوان شاخصی برای نشان دادن میزان عدم تعادل پیوستگی بین ۰ و ۱ با میانگین 0.31 و میزان D' (شاخصی برای نشان دادن میزان عدم تعادل) بین ۰ و ۱ با میانگین 0.25 بدست آمد (شکل ۴). میانگین r^2 کمتر از 0.21 نشانگر پیوستگی ژنتیکی می‌باشد (Matthies *et al.*, 2012). وجود سطح بالایی از نامتعادلی پیوستگی ژنی بیانگر کارایی انجام مکان‌یابی ارتباطی در ژرم‌پلاسم جهش‌یافته آفتابگردان مورد مطالعه می‌باشد.

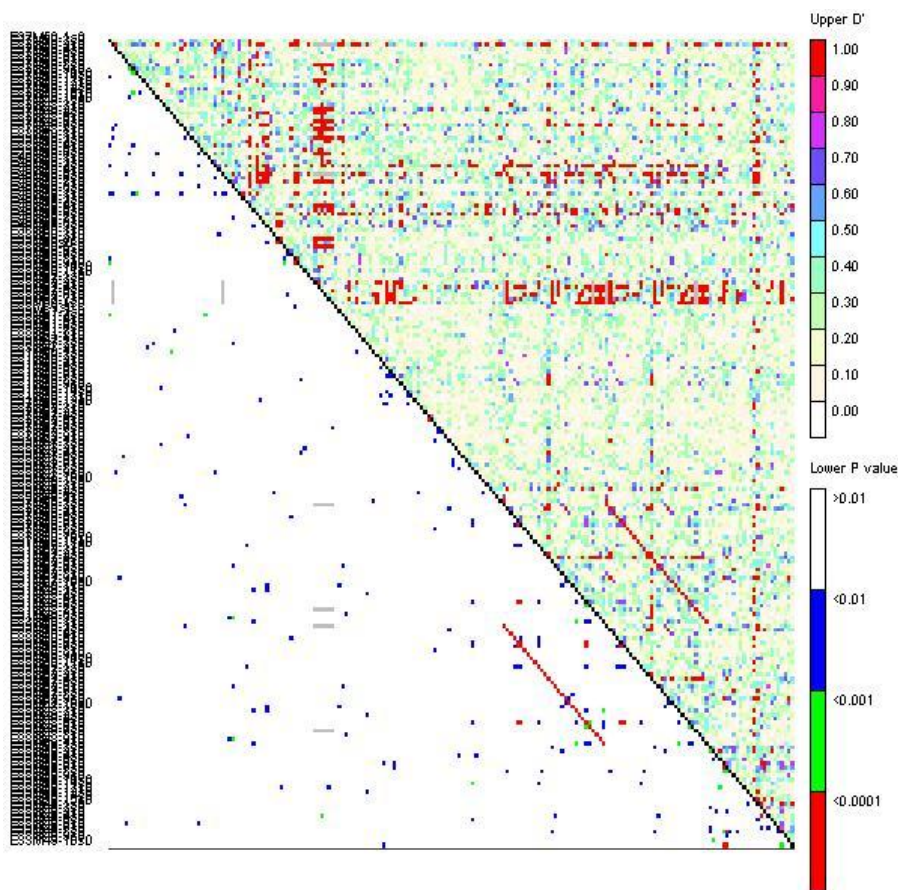
نتایج مکان‌یابی ارتباطی برای صفات گیاهچه‌ای در ژنوتیپ‌های جهش‌یافته آفتابگردان در جدول ۵ ارائه شده است. در این تحقیق، تعداد ۴۳ نشانگر AFLP پیوسته با صفات مورد مطالعه ($P < 0.01$) به‌طور مشترک با استفاده از هر دو مدل GLM و MLM، شناسایی شدند (جدول ۵). با توجه به جدول ۵، بیشترین مقدار ضریب تبیین فنوتیپی (R^2) مربوط به ترکیب E38M62 می‌باشد که ۴۲ درصد از تغییرات صفات درصد و سرعت جوانه‌زنی را کنترل نموده و می‌توان

عدم تعادل پیوستگی (LD) و شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات

در مطالعات مکان‌یابی ارتباطی علاوه بر ترکیب ساختار جمعیت، گستره عدم تعادل پیوستگی (LD) در ژنوم نیز از اهمیت اساسی برخوردار است (Maskri *et al.*, 2012). حضور LD، یک پیش‌نیاز برای مکان‌یابی ارتباطی بوده (Sorkheh *et al.*, 2008) و به‌عنوان ارتباط غیر تصادفی آلل‌ها در مکان‌های ژنی که به‌طور جداگانه در یک کروموزوم قرار دارند، تعریف می‌شود (Mackay & Powell, 2007). از جمله عواملی که مقدار LD را افزایش می‌دهد، می‌توان به اپیستازی، سیستم اتوگامی، نوآرایی‌های ژنومی، رانده شدن و ایزولاسیون ژنتیکی، ساختار جمعیت، اندازه کوچک جمعیت، انتخاب و درجه خویشاوندی اشاره نمود و در مقابل عوامل کاهشنده مقدار LD، دگرآمیزی (آلوگامی)، تبدیل ژنی، مقادیر بالای نوترکیبی و جهش می‌باشند (Oraguzie *et al.*, 2007). در این مطالعه میزان r^2

پارامترهای جوانه‌زنی در لاین‌های جهش یافته آفتابگردان تحت تنش خشکی انجام شد، برای صفت درصد جوانه‌زنی بذور در شرایط تنش خشکی و نرمال به ترتیب ۸ و ۶ عدد QTL، با ضریب تبیین ۱۲/۵٪ الی ۲۰٪ و ۱۲/۹۰٪ الی ۲۳/۴۰٪ شناسایی شدند. در مطالعه دیگری (Davar *et al.*, 2011) مکان‌یابی صفات مرتبط با بنیه بذر و رشد و توسعه بذور در آفتابگردان انجام گرفت و برای صفت روز تا جوانه‌زنی (DSE) ۷ QTL با R^2 بین ۶/۹٪ تا ۱۴/۶۲٪ شناسایی شدند. در مطالعه دیگری (Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2005) برای صفت درصد جوانه‌زنی بذور آفتابگردان، ۴ QTL در گروه‌های پیوستگی ۳، ۶ و ۹ با R^2 بین ۸٪ تا ۱۶٪ شناسایی نمودند.

گفت که این ترکیب بیش از سایر ترکیبات مورد مطالعه در نواحی کدکنده این صفات حضور دارد. ترکیب E33M49 دارای کمترین مقدار ضریب تبیین فنوتیپی بوده (۰/۱۳۶۴) و با صفت وزن خشک ساقه‌چه ارتباط معنی‌دار داشت. نتایج مکان‌یابی ارتباطی (جدول ۵) نشان داد که در سطح شوری صفر، ۴ صفت مورد مطالعه با ۷ نشانگر AFLP پیوسته بودند. در سطح شوری ۲، ۷ صفت مورد مطالعه با ۱۲ نشانگر AFLP، در سطح شوری ۴، ۴ صفت مورد مطالعه با ۵ نشانگر AFLP، در سطح شوری ۶، ۷ صفت مورد مطالعه با ۱۲ نشانگر AFLP و در سطح شوری ۸، ۲ صفت مورد مطالعه با ۳ نشانگر AFLP پیوسته بودند. در مطالعه‌ای که توسط Ebrahimi & Sarrafi (2012) به‌منظور مطالعه تنوع ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای مرتبط با



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

همچنین، در تحقیق انجام گرفته توسط Abdollahi Mandoulakani و همکاران (۲۰۱۵) در گندم، با تبدیل نشانگرهای رتروترانسپوزونی پیوسته با مقاومت به زنگ به نشانگرهای SCAR و آزمون آن‌ها در شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم در جمعیت‌های مختلف ژنتیکی گندم مشخص گردید که نشانگرهای SCAR نشانگرهای قدرتمندی برای استفاده در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر می‌باشند.

سپاسگزاری

بدینوسیله نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه که امکانات لازم برای انجام این تحقیق را فراهم نمودند، صمیمانه تشکر نمایند. از پروفسور احمد صرافی از INP-ENSAT فرانسه به‌خاطر در اختیار قرار دادن بذور لاین‌های جهش‌یافته تشکر و قدردانی می‌گردد.

در این تحقیق نشانگرهای هم‌مکان برای صفات مورد مطالعه شناسایی شدند (جدول ۵) که از آن جمله می‌توان نشانگر E33M49-5 را برای صفات درصد جوانه‌زنی (شوری ۴ dS/m)، سرعت جوانه‌زنی و وزن خشک ریشه‌چه (شوری ۲ dS/m)، نشانگر E31M48-4 را برای صفات طول ریشه‌چه (شوری صفر) و وزن خشک ساقه‌چه (شوری ۸ dS/m) و نشانگر E33M59-1 را برای صفات وزن خشک ساقه‌چه (شوری صفر) و درصد جوانه زنی (شوری ۶ dS/m) نام برد. وجود چنین نشانگرهایی اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد، زیرا گزینش هم‌زمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازند (*et Tuberosa* (al., 2002). بدین منظور با تبدیل نشانگرهای غالب AFLP شناسایی شده به نشانگرهای هم بارز و اختصاصی جایگاه‌های ژنی نظیر SCAR، می‌توان با قابلیت اطمینان بیشتری از این نشانگرها در گزینش به کمک نشانگر (MAS) استفاده نمود.

REFERENCES

- Abdollahi Mandoulakani B, Yaniv E, Kalendar R, Raats DH, Bariana S, Bihanta MR, Schulman AH (2015) Development of IRAP- and REMAP-derived SCAR markers for marker-assisted selection of the stripe rust resistance gene Yr15 derived from wild emmer wheat. *Theor. Appl. Genet.* 128: 211-219.
- Ahloowalia BS, Maluszynski M, Nichterlein K (2004) Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135: 187-204.
- Almansouri M, Kinet JM, Lutts S (2001) Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant Soil* 231: 243-254.
- 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.
- Alvarez A, Fuentes JL, Deus JE, Duque MC, Cornide MT (2000) Genetic diversity analysis in rice mutants using isozyme and morphological markers. *Cultivos Tropicales* 21: 39-44.
- Atak M, Kaya, MD, Kaya G, Cıkılı Y, Ciftçi CY (2006) Effects of NaCl on the germination, seedling growth and water uptake of triticale. *Turk. J. Agric. For.* 30: 39-47.
- Atayee R, Mohammadi V, Talaie A, Naghavi MR (2013) Association mapping of root traits in Barley. *Iranian J. Field Crop Sci.* 44: 347-357 (In Farsi).
- Boyd LA, Smith PH, Wilson AH, Minchin PN (2002) Mutations in wheat showing altered field resistance to yellow and brown rust. *Genome* 45: 1035-1040
- Camargo CEDO, Neto AT, Filho AWP, Felico, JC (2000) Genetic control of aluminum tolerance in mutant lines of the wheat cultivar Anahuac. *Euphytica*

- 114: 47-53.
- Chen CL, Wang HH, Jeng TL, Chuang SJ, Wei ML, Min SJ (2011) Genetic diversity in NaN₃-induced common bean mutants and commercial varieties detected by AFLP. *Crop Breed Appl. Biotech.* 11: 365-369.
- Dadras AR, Sabouri H, Mohammadi Nejad G, Sabouri A, Shoai-Deylami M (2014) Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. *Mol. Biol. Rep.* 41: 3117-3129.
- Darvishzadeh R, Poormohammad Kiani S, Huguet T, Sarrafi A (2008) Genetic variation and identification of molecular marker associated with partial resistance to *Phoma macdonaldii* in gamma-irradiation-induced mutants of sunflower. *Can. J. Plant Pathol.* 30: 106-114.
- Davar R, Majd A, Darvishzadeh R, Sarrafi A (2011) Mapping quantitative trait loci for seedling vigour and development in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using recombinant inbred line population. *Plant Omics J.* 4: 418-427
- Ebrahimi A, Sarrafi A (2012) Genetic variability and identification of markers associated with germination parameters in gamma-irradiation induced mutants of sunflower under water stress condition. *Iranian J. Genet. Plant Breed.* 1: 1-8.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- Fulton TM, Chunwongse J, Tanksley SD (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 207-209.
- Hossain MI, Khatun A, Talukder MSA, Dewan MMR, Uddin MS (2010) Effect of drought on physiology and yield contributing characters of sunflower. *Bangladesh J. Agric. Res.* 1: 113-124.
- Hu J, Seiler G, Kole C (2010) *Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower.* Routledge, USA.
- Kaya MD, Okçu G, Atak M, Cıkılı Y, Kolsarıcı O (2006) Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Eur. J. Agron.* 24: 291-295.
- Khan MM, Iqbal MJ, Abbas R (2004) Loss of vigour and viability in aged onion (*Allium cepa* L.) seeds. *Int. J. Agric. Biol.* 6: 708-11.
- Kuroki M, Saito K, Matsuba S, Yokogami N, Shimizu H, Ando I, Sato Y (2007) A quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 8. *Theor. Appl. Genet.* 115: 593-600.
- Lu G, Zhang X, Zou Y, Zou Q, Xiang X, Cao J (2007) Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers. *Plant Cell Tiss. Org.* 88: 319-327.
- Mackay L, Powell W (2007) Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. *Trends Plant Sci.* 12: 57-63.
- Maluszynski M, Nichterlein K, Van Zanten L, Ahloowalia BS (2000) Officially released mutant varieties the FAO/IAEA database. *Mut. Breed.* 12: 1-84.
- Mandel JR, Dechaine JM, Marek LF, Burke JM (2011) Genetic diversity and population structure in cultivated sunflower and a comparison to its wild progenitor, *Helianthus annuus* L. *Theor. Appl. Genet.* 123:693-704.
- Mandel JR, Milton FE, Donovan LA, Knapp JS, Burke JM (2013) Genetic diversity and population structure in the rare Algodones sunflower (*Helianthus niveus* ssp. tephrodes). *Conserv. Genet.* 14: 31-40.
- Matthies IE, Hintum T, Weise S, Roder MS (2012) Population structure

- revealed by different marker types (SSR or DArT) has an impact on the results of genome-wide association mapping in European barley cultivars. *Mol. Breed.* 30: 951–966.
- Mohammadi SA, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants- salient statistical tools and considerations. *Crop Sci.* 43: 1235-1248.
- Oraguzie NC, Wilcox PL, Rikkerink EHA, De Silva HN (2007) Linkage Disequilibrium, Association Mapping in Plants. Springer. New York.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Rachid Al-Chaarani G, Gentzbittel L, Huang X, Sarrafi A (2004) Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits using AFLP and SSR in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109: 1353-1360.
- Rachid Al-Chaarani G, Gentzbittel L, Wedzony M, Sarrafi A (2005) Identification of QTLs for germination and seedling development in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Sci.* 169: 221- 227.
- Rashid M, Ren-hu L, Wei J, Yong-han X, Fu-lin W, Yue-zhi T, Jun-mei W, Cheema AA, Jin-qing C, He G (2009) Genomic diversity among Basmati rice (*Oryza sativa* L) mutants obtained through 60Co gamma radiations using AFLP markers. *Afr. J. Biotech.* 8: 6777-6783.
- Rostami-Ahmadvandi, H, Cheghamirza, K, Kahrizi, D, Bahraminejad, S (2013) Comparison of morpho-agronomic traits versus RAPD and ISSR markers in order to evaluate genetic diversity among *Cuminum cyminum* L. accessions. *Aust. J. Crop Sci.* 7(3):361-367.
- Sarrafi A, Kayyal H, Rachid Al-Chaarani G, Cantin F, Chaline AS, Durielle AS (2000) Inheritance of organogenesis parameters in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Genet. Breed.* 54: 227-331.
- Sherif F, Khattab S, Ghoname E, Salem N, *et al.* (2011) Effect of gamma irradiation on enhancement of some economic traits and molecular changes in *Hibiscus Sabdariffa* L. *Life Sci. J.* 8: 220-229.
- Sofalian O, Mohammadi SA, Aharizad S, Moghaddam M, Shakiba MR (2008) Mapping of QTLs for frost tolerance and heading time using SSR markers in bread wheat. *Afr. J. Biotech.* 9: 5260-5264.
- Sorkheh K, Malysheva-Otto LV, Wirthensohn MG, Tarkesh-Esfahani S, Martínez-Gómez P (2008) Linkage disequilibrium, genetic association mapping and gene localization in crop plants. *Genet. Mol. Biol.* 31: 805-814.
- 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.
- Wang ZF, Wang JF, Bao YM, Wu YY, Zhang HS (2011) Quantitative trait loci controlling rice seed germination under salt stress. *Euphytica* 178: 297-307.
- Witkiewicz J, Urbanczyk-Wochniak E, Przybecki Z (2003) AFLP marker polymorphism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) Near isogenic lines differing in sex expression. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8: 375-381.