

تجزیه ارتباطی صفات زراعی آفتابگردان روغنی (*Helianthus annuus* L.) با نشانگرهای REMAP و IRAP تحت شرایط نرمال و تنش کمبود فسفر

مریم رسول‌زاده اقدم^۱، رضا درویش‌زاده^{۲*}، ابراهیم سپهر^۳، هادی علیپور^۴
۱ و ۲ - به ترتیب کارشناس ارشد، استناد و استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه.
۳ - استناد، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۶/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۲۵)

چکیده

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) یکی از محصولات با ارزش کشاورزی است که عمدتاً به خاطر روغن خوراکی آن کشت می‌شود. فسفر از عناصر پرمصرف غذایی در گیاهان است که نقش‌های متعدد ساختاری در سلول دارد و برای عملکرد کاتالیتیک آنزیم‌های دخیل در متابولیسم ضروری است. در راستای تولید ارقام فسفر-کارا، در آزمایشی، ۱۰۰ لاین خالص آفتابگردان روغنی از نقاط مختلف جهان در دو شرایط بهینه و کمبود فسفر و بر اساس صفات مختلف زراعی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلدانی در سال زراعی ۹۷-۱۳۹۶ ارزیابی شدند. بر اساس نتایج آماره‌های توصیفی، در شرایط کمبود فسفر در مقایسه با شرایط بهینه، میانگین اکثر صفات مورد مطالعه کاهش یافت و بیشترین آسیب ناشی از کمبود فسفر، به ترتیب در صفات درصد فسفر بوته، عملکرد دانه در بوته، وزن طبق و وزن خشک بوته مشاهده شد. در تجزیه ساختار جمعیت بر اساس ۱۲۸ نشانگر IRAP و ۱۲۰ نشانگر REMAP، دو زیر جمعیت (دو=K) در پانل ارتباطی شناسایی شد و عدم تعادل پیوستگی برای نشانگرهای رتروترانسپوزونی، ۳/۰۴ درصد بود. در تجزیه ارتباطی صفات بر اساس نشانگرهای رتروترانسپوزونی و با استفاده از مدل خطی مخلوط، به ترتیب ۱۷ و ۱۹ نشانگر رتروترانسپوزونی پیوسته با صفات در شرایط بهینه و کمبود فسفر شناسایی شد و نشانگر *cfr8-1* بین صفات در شرایط بهینه و کمبود فسفر مشترک بود. نتایج به دست آمده از این مطالعه، اطلاعات ارزشمندی در زمینه مبنای ژنتیکی صفات مورد مطالعه ارائه می‌دهد که می‌توان از این اطلاعات در برنامه‌های اصلاحی و تولید ارقام با میزان عملکرد بالا در آفتابگردان استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، تنوع ژنتیکی، عدم تعادل پیوستگی، فسفر، نشانگرهای مولکولی.

Association analysis of agronomic traits of oilseed sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines with REMAP and IRAP markers under optimum and phosphorus deficit stress

Maryam Rasoulzadeh Aghdam¹, Reza Darvishzadeh^{2*}, Ebrahim Sepehr³, Hadi Alipour⁴
1,2,4. Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.
3. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.
(Received: September 5, 2020 - Accepted: November 15, 2020)

ABSTRACT

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the most valuable agricultural products, mainly cultivated for edible oil. Phosphorus is a suitable nutrient in plants that plays key roles in several cellular structures and catalytic functions of enzymes involved in metabolism. In order to produce and develop phosphorus-efficient cultivars, 100 sunflower lines from different parts of the world were evaluated in an experiment based on agro-morphological traits under two optimal and phosphorus deficient conditions in a completely randomized design with three replications in pots in 2017-18 cropping season. Based on results of descriptive statistics, the average of most studied traits was reduced in phosphorus deficient compared to optimal conditions, and the most damage caused by phosphorus deficiency were observed in plant phosphorus percentage, grain yield per plant and head and plant dried weights, respectively. In population structure analysis based on 128 IRAP and 120 REMAP markers, two sub-populations (K=2) were identified in association panel and amount of linkage disequilibrium for the retrotransposon based molecular markers was 3.4%. In association analysis using MLM model, 17 and 19 markers were identified for traits in optimal and phosphorus deficient conditions, respectively and the *cfr8-1* marker was common between traits in optimal and phosphorus deficient conditions. 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.

Keywords: Genetic diversity, linkage disequilibrium mapping, molecular markers, phosphorous, sunflower.

* Corresponding author E-mail: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

مقدمه

اصلی به‌نژادگران و متخصصان ژنتیک قرار گرفته است، اما تا به امروز با موفقیت محدودی همراه بوده است (Gourley *et al.*, 1994; Bovill *et al.*, 2013).

اساس و پایه برنامه‌های به‌نژادی از جمله انتخاب به کمک نشانگر^۳، آگاهی از نواحی ژنومی کنترل کننده صفات مورد نظر است. در سال‌های اخیر، روش‌های ژنتیک مولکولی با استفاده از چندشکلی DNA، به‌طور فزاینده‌ای برای تعیین مشخصه و شناسایی ژن‌های مسئول تغییرات ژنتیکی صفات مهم زراعی در برنامه‌های اصلاحی گیاهان استفاده شده‌اند. نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها، یکی از نشانگرهای مولکولی مهم در این زمینه هستند. یکی از نشانگرهای این خانواده، IRAP^۴ است که توسط Kalendar *et al.* (1996) معرفی شد. نشانگرهای IRAP، چندشکلی مبتنی بر الحاق رتروترانسپوزون‌ها را با تکثیر ناحیه بین دو عنصر رتروترانسپوزونی آشکار می‌سازند. در این روش، طراحی آغازگرها بر اساس توالی انتهایی رتروترانسپوزون‌ها (LTR^۵ها) صورت می‌گیرد و جهت تکثیر قطعات بین دو رتروترانسپوزون به‌کار برده می‌شوند (Shimamura *et al.*, 1997). این نشانگرها به دلیل طولانی بودن توالی آغازگرها و تکرارپذیری بالا، شبیه نشانگرهای ریزماهواره هستند (Kalendar *et al.*, 1999). نشانگر دیگر این خانواده، REMAP^۶ است که آن هم توسط Kalendar *et al.* (1996) معرفی شد. این نشانگر، شبیه نشانگرهای IRAP است، ولی یکی از دو آغازگر مورد استفاده، مطابق یکی از موتیف‌های SSR با یک یا چند باز لنگر غیرریزمماهواره‌ای در انتهای ۳' آن طراحی می‌شود. در تحقیقی، بررسی تنوع ژنتیکی ۲۳ ژنوتیپ از گونه‌های مختلف جنس *Vitis*، با نشانگرهای S-SAP، IRAP و REMAP مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها و نشانگرهای ISSR، AFLP انجام گرفت. نتایج نشان داد نشانگرهای

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) از گیاهان مهم زراعی است که عمدتاً به خاطر روغن خوراکی کشت می‌شود. دانه‌های روغنی بعد از غلات، دومین منبع مهم تأمین انرژی مورد نیاز جوامع انسانی به شمار می‌رود و از دیرباز کشت این دسته از گیاهان در بسیاری از کشورهای جهان رواج دارد. سطح زیر کشت آفتابگردان روغنی در جهان در سال ۲۰۱۸ برابر با ۲۶۶۶۸۱۰۱ هکتار و میزان تولید ۵۱۹۵۴۷۷۷ تن برآورد شده است (FAO, 2018).

در سطح جهان، تولید بیشتر در اغلب محصولات زراعی، به شدت به استفاده از کودهای تجاری وابسته است؛ موردی که باعث افزایش هزینه برای تولید کنندگان می‌شود. این امر در مورد کود فسفر بیشتر واقعیت دارد، زیرا این عنصر به دلیل تثبیت زیاد در خاک و سرعت انتشار آهسته، سخت‌ترین عنصر درشت‌مغذی قابل‌اخذ توسط گیاهان هست (Gong *et al.*, 2016). معمولاً در بیشتر زراعت‌ها در ابتدای فصل و قبل از کشت محصول، کود فسفر به زمین اضافه می‌شود، اما کمتر از ۲۰ درصد فسفر در سال کاربرد مصرف می‌شود و بقیه در مخازن کم-فسفر موجود در خاک^۱ وارد می‌شود و یا در بعضی موارد، جابجایی از محل و مشارکت در آلودگی مواد مغذی سیستم‌های ساحلی^۲ (واسط بین اکوسیستم‌های زمینی و آبی) رخ می‌دهد (McLaughlin *et al.*, 1988). جستجوی فرصت‌هایی برای بهبود راندمان مصرف کود برای به حداکثر رساندن تولید دانه با مصرف کمتر کود، یک چالش جهانی است که به احتمال زیاد به "انقلاب دوم سبز" منجر خواهد شد (Yan *et al.*, 2006). جدا از نیاز به راهکارهای مدیریتی بلند مدت برای رفع این مشکل، اصلاح محصولات زراعی با بهره‌وری بالا و قادر به پاسخگویی بهتر به فسفر و یا استفاده از فسفر بومی خاک، یک چشم‌انداز جذاب است؛ بنابراین بهبود راندمان مصرف فسفر از طریق تولید و توسعه محصولات زراعی و مرتعی، مدتی است که مورد علاقه

³. Marker assisted selection (MAS)

⁴. Inter-retrotransposon amplified polymorphism

⁵. Long terminal repeats

⁶. Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism

¹. Less available soil pools of phosphorous

². Nutrient pollution of riparian systems

تجزیه بیان ژن مذکور تحت شرایط کمی فسفر خاک نشان داد که این ژن به طور معنی دار باعث افزایش عملکرد دانه می شود. مطالعات تکمیلی نشان داد که ژن مذکور به طور معنی داری باعث افزایش طول ریشچه می شود و بدین ترتیب توانایی جذب فسفر را بهبود می بخشد (Gamuyao *et al.*, 2012).

علی رغم اهمیت آفتابگردان روغنی در ایران، تحقیقات زیادی در زمینه شناسایی نشانگرهای مولکولی و مکان های ژنی صفات مهم مرتبط با دانه در شرایط تنش کمبود فسفر در این گیاه، صورت نگرفته است؛ هر چند در زمینه مکان یابی ژنتیکی برخی صفات مهم زراعی در شرایط تنش خشکی (Soleimani *et al.*, 2018)، شوری (Ahmadpour *et al.*, 2018) و مقاومت به بیماری ها (Najafzadeh *et al.*, 2018) تحقیقاتی انجام گرفته است. هدف از مطالعه حاضر، شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی در آفتابگردان روغنی با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون IRAP و REMAP در شرایط فراهمی (نرمال) و تنش کمبود فسفر است.

مواد و روش ها

در این پژوهش، فنوتیپ ۱۰۰ لاین خالص آفتابگردان روغنی در دو شرایط فراهمی (بهینه یا نرمال) و کمبود فسفر در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلدانی و در فضای باز در گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه در سال زراعی ۹۷ - ۱۳۹۶ ارزیابی شد (شکل ۱). منشاء لاین های مورد مطالعه از کشورهای آمریکا، فرانسه، صربستان، مجارستان و ایران بود (فایل تکمیلی ۱). برای کشت و بر اساس نتایج تجزیه خاک (Ali *et al.*, 1993)، خاک منطقه خان ارخی (Khan Arkhi) دانشگاه ارومیه با طول جغرافیایی ۴۵/۵ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۷/۳۲ دقیقه شمالی و با ارتفاع ۱۳۲۰ متر از سطح دریا، از عمق صفر تا ۳۰ سانتی متر با میزان فسفر پایین (۷/۲ mg/kg) انتخاب شد (فایل تکمیلی ۲). تعداد ۶۰۰ گلدان ۱۵ کیلویی تهیه شد که به دو دسته ۳۰۰ تایی تقسیم شدند. در هر دو دسته، گلدان ها با

رتروترانسپوزونی REMAP روابط ژنتیکی بین نمونه های مورد مطالعه را بهتر از نشانگرهای دیگر نمایان می سازد (D'Onofrio *et al.*, 2010).

در دهه های گذشته، تحقیقات بسیاری برای شناسایی ژن های مسئول تغییرات ژنتیکی صفات مهم زراعی با استفاده از نقشه های پیوستگی در نسل های در حال تفرق صورت گرفته است. با توجه به وجود تنوع ژنتیکی طبیعی وسیع برای صفات کمی در ژرم پلاسما و مجموعه های گیاهی، در سال های اخیر تجزیه ارتباط^۱، جایگاه خود را در ژنومیک گیاهی همانند ژنتیک انسانی برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با عوامل ژنتیکی کنترل کننده صفات پیدا کرده است (Alipour & Darvishzadeh, 2019). در این روش، مجموعه بزرگی از افراد یک جمعیت به طور تصادفی جمع آوری می شوند و تجزیه بر اساس عدم تعادل پیوستگی^۲ انجام می گیرد.

مطالعات قبلی نشان داده است که تحمل گیاهان به مقدار کم فسفر، توسط چندین ژن تنظیم می شود (Su *et al.*, 2013; Oono *et al.*, 2006). تحمل به کمبود فسفر و تجزیه و تحلیل QTL صفات مرتبط در برنج (Wissuwa *et al.*, 1998)، ذرت (Zhu *et al.*, 2005)، کلزا (Yang *et al.*, 2011)، لوبیا (Liao *et al.*, 2004) و سویا (Li *et al.*, 2005) انجام گرفته است. Yang *et al.* (2011) با استفاده از رگه های خویش آمیخته نوترکیب (RILs^۳) در کلزا طی یک مطالعه تجزیه QTL، شش صفت فنوتیپی را در مرحله رویشی، تحت شرایط نرمال و تنش کمبود فسفر ارزیابی کردند. در کل برای صفات مورد مطالعه، ۷۲ QTL روی ۱۳ گروه پیوستگی شناسایی کردند که از این بین، ۲۸ QTL برای صفات در شرایط کمبود فسفر، ۲۲ QTL در شرایط نرمال و ۲۱ QTL برای صفاتی بود که به صورت نسبی با در نظر گرفتن دو شرایط محاسبه شده بودند. با ارزیابی یک جمعیت RILs در برنج تحت شرایط کمبود فسفر، ژن مرتبط با تحمل به کمبود فسفر به نام *PSTOL1* شناسایی شد (Wissuwa *et al.*, 1998).

1. Association analysis

2. Linkage disequilibrium

3. Recombinant inbred lines

قبل از ظهر قبل از گرم شدن هوا (Chlo^۵; SPAD)،
 دمای کانوپی توسط دماسنج مادون قرمز
 (CanopyTemp^۶; °C)، ارتفاع بوته (PH^۷; cm)، قطر
 ساقه (StemD^۸; cm)، طول برگ (Llength^۹; cm)،
 عرض برگ (Lwide^{۱۰}; cm)، سطح برگ (LS^{۱۱}; cm^۲)،
 محتوای نسبی آب برگ (درصد) (RWC^{۱۲}; %)، روز تا
 رسیدگی (DM^{۱۳}; day)، زاویه برگ (°) (Langle^{۱۴};
 قطر طبق (HD^{۱۵}; cm)، وزن بوته (Pweigh^{۱۶}; gr)،
 وزن هزار دانه (GW1000^{۱۷}; gr)، وزن طبق
 (Hweight^{۱۸}; gr)، درصد روغن (% Oil)، درصد فسفر
 بوته (% P^{۱۹}) و عملکرد تک بوته (Yield; gr)
 اندازه‌گیری شدند.

ارزیابی ژنوتیپی

در این پژوهش، از داده‌های ژنوتیپی که با نشانگرهای
 مبتنی بر رتروترانسپوزون REMAP و IRAP توسط
 Basirnia *et al.* (2016) با ۲۸ ترکیب آغازگر
 رتروترانسپوزون تهیه شده بود استفاده شد. برای نمونه،
 پروفایل مولکولی تعدادی از افراد با نشانگرهای IRAP
 و REMAP در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است.
 به‌طور خلاصه در تهیه پروفایل مولکولی افراد،
 واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم نهایی
 ۲۰ میکرولیتر، حاوی ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی، دو
 میکرولیتر از بافر 10X PCR (500 mM KCl, 500
 mM Tris-HCl pH 8.4، ۱/۷۵ میلی‌مولار کلرید

خاک با میزان فسفر پایین و ماسه به نسبت دو به یک
 پر شدند. البته خاک با میزان فسفر پایین قبل از
 استفاده با عناصر مختلف کودی (۱۰۰ mg/kg ازت
 به‌صورت اوره در دو تقسیم، ۱۰۰ mg/kg پتاسیم
 به‌صورت سولفات پتاسیم، پنج mg/kg آهن به‌صورت
 سکوسترین آهن ۱۳۸، ۱۵ mg/kg روی به‌صورت
 سولفات روی، پنج mg/kg منگنز به‌صورت سولفات
 منگنز، ۲/۵ mg/kg مس به‌صورت سولفات مس و
 ۲/۵ mg/kg بور به‌صورت اسید بوریک) تقویت شد
 (Sepehr *et al.*, 2009). با توجه به این که در
 آزمایش‌های بررسی واکنش ژنوتیپ‌ها تحت تنش
 کمبود فسفر، گیاه در سطح کفایت عنصر مورد بررسی
 نباید با تنش آن عنصر مواجه شود، در ۳۰۰ گلدان
 مربوط به شرایط فراهمی، فسفر به میزان ۸۰ mg/kg
 به‌عنوان سطح کفایت در نظر گرفته شد (Sepehr *et al.*,
 2009) و به خاک گلدان‌ها (۳۰۰ گلدان شرایط
 فراهمی) از منبع سوپرفسفات تریپل اضافه شد،
 درحالی‌که در دسته دوم (۳۰۰ گلدان مربوط به
 شرایط کمبود فسفر)، کود فسفوری به خاک گلدان‌ها
 اضافه نشد. فاصله دو ردیف گلدان از هم ۵۰ سانتی‌متر
 و فاصله گلدان‌ها از هم در روی ردیف، ۳۰ سانتی‌متر
 در نظر گرفته شد. در فایل تکمیلی ۲، به برخی از
 خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در
 آزمایش اشاره شده است. در هر گلدان، چهار عدد بذر
 آفتابگردان کشت شد. در روزهای اول آزمایش، آبیاری
 گلدان‌ها به‌وسیله آب‌باش هر سه روز یک بار، ولی بعد
 از جوانه‌زدن بذرها و رویت گیاهچه‌ها (سبز شدن
 مزرعه) و مصادف شدن با فصل گرما، آبیاری به‌صورت
 روزانه با سامانه آبیاری قطره‌ای انجام گرفت. پس از
 سبز شدن گیاهچه‌ها در مرحله چهار برگ، دو گیاه در
 هر گلدان نگهداری شد. مبارزه با علف‌های هرز
 به‌صورت وجین دستی و با توجه به نیاز انجام گرفت.
 بعد از گلدهی، صفات مختلف از قبیل روز تا گلدهی
 (DF^۱; day)، تعداد برگ (Nleaf^۲)، طول دم‌برگ
 (PL^۳; cm) میزان کلروفیل با استفاده از SPAD^۴ و

4. The Soil-Plant Analyses Development. Unit of Minolta Camera Co. has developed the SPAD-502 chlorophyll meter (Minolta Camera Co., Japan).

5. Chlorophyll rate

6. Canopy temperature

7. Plant height

8. Stem diameter

9. Leaf length

10. Leaf wide

11. Leaf area

12. Relative water content

13. Day to maturity

14. Leaf angle

15. Head diameter

16. Plant weight

17. 1000 grain weight

18. Head weight

19. Phosphorous

1. Day to flowering

2. Number of leaf

3. Petiole length

سانتی‌گراد (بسته به ساختار آغازگر) به مدت ۴۰ ثانیه و دمای توسعه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و مرحله سوم: دمای توسعه نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه. جداسازی قطعات با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ (Invitrogen ultra-pure) به مدت چهار ساعت در ۶۵ ولت صورت گرفت. رنگ‌آمیزی قطعات با استفاده از اتیدیوم بروماید با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انجام شد. عکس‌برداری و ذخیره اطلاعات با استفاده از سیستم ژل داکيومنتیشن (Gel Logic 212 PRO, USA) زیر نور UV انجام گرفت.

منیزیم (شرکت سیناژن، تهران، ایران)، ۰/۲۵ میلی-مولار از هر dNTP (BioFluxbiotech; <http://biofluxbiotech.com>) و ۱/۱ واحد آنزیم تک-پلی‌مرز (شرکت سیناژن، تهران، ایران) و ۱۰ میکرومولار از هر آغازگر به همراه آب دیونیزه در ترموسایکلر ۹۶ پایه (Eppendorf master cycler gradient Type 5331; Eppendorf AG, Hamburg, Germany) انجام شد. چرخه‌های دمایی برای تکثیر به صورت زیر برنامه‌ریزی شد: مرحله اول: واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، مرحله دوم: ۳۷ چرخه که هر چرخه شامل دمای واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۳ تا ۶۰ درجه



شکل ۱- نمایی از آزمایش ارزیابی صفات آگرومورفولوژیک در ۱۰۰ لاین خالص آفتابگردان روغنی تحت شرایط نرمال و تنش کمبود فسفر

Figure 1. A view of experiment conducted to study the agro-morphological traits of 100 oil seed sunflower lines under normal and phosphorous deficit stress conditions.

SPSS نسخه ۲۵ محاسبه شد. تجزیه ساختار جمعیت، دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیرجمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط با روش Bayesian در نرم‌افزار Structure 2.3.4 انجام گرفت (Pritchard *et al.*, 2000). بین یک تا ۱۰ زیرجمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و برای افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها، پنج تکرار منظور شد. در تجزیه‌ها، از مدل ترکیبی Admixture با استقلال فراوانی آلی، ۱۰۰/۰۰۰ تکرار Burn-in و ۱۰۰/۰۰۰ تکرار Markov Chain Monte Carlo استفاده شد تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. تجزیه ارتباطی جهت بررسی ارتباط نشانگرهای مولکولی با تنوع فنوتیپی صفات با

تجزیه‌های آماری

تجزیه داده‌ها در هر یک از شرایط نرمال و تنش کمبود فسفر، بر اساس مدل آماری طرح پایه کاملاً تصادفی با رویه مدل خطی عمومی در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام گرفت. برای این منظور، نخست نرمال بودن توزیع خطاها با روش شاپیرو-ویلک در نرم‌افزار SAS بررسی شد. آماره‌های توصیفی برای داده‌های حاصل از ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌ها تحت شرایط نرمال و تنش کمبود فسفر در نرم‌افزار SAS محاسبه شد و توزیع نرمال داده‌های حاصل از ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌ها تحت شرایط نرمال و تنش کمبود فسفر با آزمون کلموگروف اسمیرنوف در نرم‌افزار

مواقعی، اختلاف بین تیمارها به حدی است که با وجود بالا بودن ضریب تغییرات (بالا بودن واریانس اشتباه آزمایشی)، باز اختلافات خود را نشان داده‌اند و این مورد در چندین اثر پژوهشی گزارش شده است (Xu *et al.*, 2000; Zarei *et al.*, 2007). آماره‌های توصیفی برای داده‌های حاصل از ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌ها تحت شرایط فراهمی و تنش کمبود فسفر در جدول ۳ و ۴ خلاصه شده است. بیشترین درصد ضریب تغییرات فنوتیپی در شرایط فراهمی فسفر، به ترتیب برای وزن طبق خالی (۶۹/۸۴)، وزن خشک بوته (۶۸/۹۲) و عملکرد دانه (۵۵/۰۷) و کمترین آن، به ترتیب برای صفات روز تا رسیدگی (۳/۹۵)، روز تا ۵۰ درصد گلدهی (۷/۲۸) و دمای کانوبی (۷/۶۵) مشاهده شد (جدول ۳). در شرایط کمبود فسفر نیز بیشترین درصد ضریب تغییرات فنوتیپی، به ترتیب به وزن طبق خالی (۶۹/۷۲)، عملکرد دانه (۶۶/۱۷) و وزن خشک بوته (۵۴/۱۶) و کمترین آن، به ترتیب به صفات روز تا رسیدگی (۴/۴۸)، دمای کانوبی (۶/۹۵) و روز تا ۵۰ درصد گلدهی (۸/۳۳) تعلق داشت (جدول ۴). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت در بین لاین‌های آفتابگردان روغنی مورد بررسی در هر دو شرایط فراهمی و کمبود فسفر و از نظر صفات عملکرد دانه و وزن خشک بوته، بیشترین تنوع وجود دارد که می‌توان از این صفات به منظور انتخاب و اصلاح برای دستیابی به لاین‌های مطلوب آفتابگردان روغنی بهره جست. تنوع زیاد برای یک صفت در مواد اصلاحی، موفقیت پروژه‌های به‌نژادی را تضمین می‌کند؛ به همین دلیل پارامتر ضریب تغییرات فنوتیپی، یکی از مهم‌ترین و با ارزش‌ترین شاخص‌های برآورد تنوع در جمعیت‌ها به شمار می‌رود. این معیار تحت تأثیر واحد اندازه‌گیری صفت و یا دامنه تغییرات آن قرار نمی‌گیرد؛ به همین دلیل نسبت به دیگر معیارهای تنوع از اهمیت بیشتری برخوردار است. صفات با ضریب تغییرات فنوتیپی پایین، پاسخ به گزینش کمتری نشان خواهند داد.

استفاده از نرم‌افزار TASSEL 3.0 انجام گرفت. از آنجا که اطلاعات ژنوتیپی ۸۸ فرد از ۱۰۰ فرد در دسترس بود، به همین خاطر تجزیه ساختار جمعیت و تجزیه ارتباط با اطلاعات فنوتیپی و ژنوتیپی ۸۸ فرد انجام گرفت. برای تجزیه ارتباطی از رویکرد مدل خطی مخلوط (MLM^۱) استفاده شد. در تجزیه ارتباطی صفات، از میانگین سه تکرار هر ژنوتیپ استفاده شد؛ در حقیقت نوسانات بین تکرارها، نشان‌دهنده خطای آزمایشی بود و بهترین برآورد برای تعیین مقدار حقیقی اثر تیمار (ژنوتیپ)، میانگین تیمار مربوطه می‌باشد؛ بنابراین ارتباطی ارزشمند خواهد بود که نشانگر با میانگین صفت نشان داده باشد.

نتایج و بحث

تجزیه تنوع فنوتیپی

تجزیه واریانس تک‌متغیره، اختلاف معنی‌داری بین لاین‌ها برای کلیه صفات مورد بررسی در هر یک از شرایط فراهمی و تنش کمبود فسفر نشان داد (جدول ۱ و ۲) که بیانگر وجود تنوع در میان لاین‌های مورد مطالعه برای صفات مورد بررسی در هر یک از شرایط می‌باشد. مقادیر ضریب تغییرات محیطی (CV) در جدول تجزیه واریانس، بین ۱/۷۰ درصد تا ۵۲/۸۶ درصد متغیر بود. کمترین CV مربوط به صفت روز تا رسیدگی در شرایط فراهمی و بیشترین مقدار مربوط به صفت وزن خشک گیاه در شرایط تنش کمبود فسفر بود (جدول ۱ و ۲). Nooryazdan *et al.* (2010) بیشترین مقدار ضریب تغییرات را برای صفات وزن دانه (عملکرد دانه)، طول دم‌برگ و قطر ساقه در آفتابگردان روغنی گزارش نمودند. ضریب تغییرات، دقت آزمایش را نشان می‌دهد و مقادیر کمتر از ۳۰ درصد، حاکی از دقت بالای آزمایش است، ولی اگر ضریب تغییرات بیش از ۳۰ درصد باشد، نشان‌دهنده لزوم تکرار آزمایش است (Jayaraman, 1999). البته در مواقعی اگر آماره F تیمار معنی‌دار باشد، لازم به تکرار آزمایش نیست. اعتقاد بر این است در چنین

^۱. Mixed linear model

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در ۱۰۰ لاین آفتابگردان روغنی تحت شرایط فراهمی فسفر

Table 1. Variance analysis of the studied traits in 100 oil seed sunflower lines under optimal phosphorus conditions.

Source of variation	df	Mean square									
		Day to flowering	Number of leaf	Chlorophyll rate	Petiole length	Canopy temperature	Plant height	Stem diameter	Leaf length	Leaf wide	Leaf area
Line	99	83.75**	33.75**	292.70**	10.43**	9.93**	1778.81**	54.05**	18.88**	22.21**	25844968**
Error	200	21.34	9.11	74.08	4.44	3.22	312.18	20.28	7.85	11.4	7940474
CV (%)		6.96	16.2	20.35	22.92	7.02	15.28	20.28	18.37	26.09	19.81

Source of variation	df	Mean square									
		Relative water content	Day to maturity	Leaf angle	Head diameter	Plant dry weight	1000 grain weight	Seed yield per plant	Weight of empty head	Phosphorous percentage	Oil percentage
Line	99	150.04**	69.70**	351.83**	16.59**	0.01**	997.44**	448.42**	378.94**	0.002**	84.17**
Error	200	86.76	4.31	161.26	6.86	0.002	283.39	58.74	57.81	0.001	9.72
CV (%)		12.21	1.70	10.13	22.17	46.25	31.22	31.73	39.13	30.98	7.96

df: درجه آزادی؛ CV: ضریب تغییرات؛ ns, *, **: به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

df: degree of freedom; CV: Coefficient of variation. ns, *, **: Not significant and significant at 5% and 1% of probability levels, respectively.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در ۱۰۰ لاین آفتابگردان روغنی تحت شرایط کمبود فسفر

Table 2. Variance analysis of the studied traits in 100 oil seed sunflower lines under phosphorus deficit conditions.

Source of variation	df	Mean square									
		Day to flowering	Number of leaf	Chlorophyll rate	Petiole length	Canopy temperature	Plant height	Stem diameter	Leaf length	Leaf wide	Leaf area
Line	99	104.40**	37.09**	607.68**	11.43**	10.44**	1384.92**	58.48**	27.56**	27.56**	91729838**
Error	200	19.04	15.69	59.88	4.39	2.79	348.84	22.46	27.56	11.66	10881095
CV (%)		6.3	21.24	17.96	24.25	6.5	17.79	32.00	30.94	30.94	24.96

Source of variation	df	Mean square									
		Relative water content	Day to maturity	Leaf angle	Head diameter	Plant dry weight	1000 grain weight	Seed yield per plant	Weight of empty head	Phosphorous percentage	Oil percentage
Line	99	130.65**	97.85**	714.83**	18.25**	0.01**	801.58**	267.58**	388.36**	0.001**	72.25**
Error	200	90.75	5.21	235.87	7.35	0.01	274.83	37.99	4730	0.0004	17.16
CV (%)		13.06	1.79	12.74	26.24	52.86	31.88	38.38	43.81	42.10	11.88

df: درجه آزادی؛ CV: ضریب تغییرات؛ ns, *, **: به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

df: degree of freedom; CV: Coefficient of variation. ns, *, **: Not significant and significant at 5% and 1% of probability levels, respectively

تجزیه ساختار جمعیت

لاین در گروه، ۱۵ لاین در زیر گروه اول (رنگ قرمز) و ۳۶ لاین در زیر گروه دوم (رنگ سبز) گروه بندی شدند؛ درحالی که ۳۷ لاین با احتمال عضویت کمتر از ۷۰ درصد، به عنوان لاین های مختلط شناسایی شدند. ساختار یک جمعیت، نتیجه انتخاب و در سطوح بالاتر، حاصل اختلاط در آن جمعیت می باشد که منجر به عدم تعادل پیوستگی بین نشانگرهای غیر پیوسته (نشانگرهای با فاصله زیاد در روی یک کروموزوم یا نشانگرهای واقع در کروموزوم های مختلف) می شود (Cardon & Palmer, 2003; Rostok *et al.*, 2006). آگاهی از ساختار جمعیت، به عنوان یک پیش نیاز در تجزیه ارتباطی می تواند برای جلوگیری از ارتباطات مثبت و دروغین بین نشانگرها و صفات استفاده می شود (Pritchard & Donnelly, 2001).

با ۲۸ آغازگر مورد استفاده در این تحقیق، در کل ۲۴۸ مکان تکثیر شدند که از این تعداد جایگاه ژنومی، ۱۲۸ جایگاه مربوط به نشانگرهای IRAP و ۱۲۰ جایگاه مربوط به نشانگرهای REMAP بود. برای نمونه، پروفایل مولکولی تعدادی از افراد با نشانگرهای IRAP و REMAP در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج تجزیه ساختار جمعیت بر اساس داده های نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون IRAP و REMAP، دو زیر جمعیت احتمالی (دو=K) در پانل ارتباطی مورد مطالعه شناسایی شد (شکل ۴). بر اساس نتایج ارائه شده در بارپلات (شکل ۵)، با در نظر گرفتن احتمال بیشتر از ۷۰ درصد برای عضویت هر

جدول ۳- آماره‌های توصیفی صفات مورد بررسی در ۱۰۰ لاین آفتابگردان روغنی تحت شرایط فراهمی فسفر

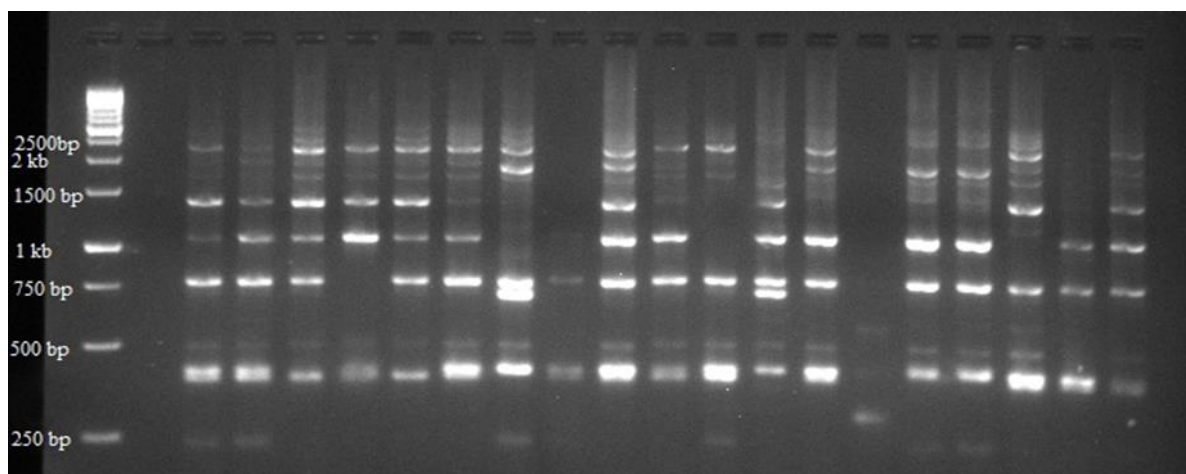
Table 3. Descriptive statistics of studied traits of 100 oil seed sunflower lines under optimal phosphorus conditions.

Characters	Mean	Standard deviation	Range	Phenotypic coefficient of variation	Kurtosis	Skewness	Normality test (P-value)
Day to flowering (day)	65.27	4.75	78.67 - 56.33	7.28	-0.42	0.31	0.20
Number of leaf	19.68	3.06	32.00 - 13.33	15.57	2.81	1	0.03
Chlorophyll rate (SPAD)	43.57	7.28	66.93 - 31.47	16.72	0.77	0.85	0.00
Petiole length (cm)	9.31	2.14	19.89 - 5.83	22.98	4.65	1.35	0.20
Canopy temperature (°C)	25.74	1.97	33.08 - 21.27	7.65	0.74	0.19	0.20
Plant height (cm)	117.99	23.78	185.00 - 62.87	20.16	0.67	0.31	0.20
Stem diameter (mm)	17.63	4.2	35.11 - 9.43	23.82	3.72	1.3	0.01
Leaf length (mm)	15.57	2.4	23.56 - 10.67	15.44	0.4	0.52	0.20
Leaf wide (mm)	13.23	2.7	22.05 - 8.33	20.43	0.1	0.52	0.01
Leaf area (cm ²)	14641.25	2856.03	25280.00 - 9761.33	19.51	3.14	1.61	0.00
Relative water content (%)	77	7.32	100.04 - 48.66	9.5	2.43	-0.28	0.20
Day to maturity (day)	121.97	4.82	134.33 - 115.00	3.95	0.4	1.09	0.00
Leaf angle (degree)	125.03	11.37	155.00 - 90.67	9.09	0.25	-0.08	0.18
Head diameter (cm)	12.32	2.38	21.17 - 7.33	19.3	2.59	1.09	0.20
Plant dry weight (gr)	0.11	0.08	0.47 - 0.04	68.92	10.04	2.96	0.00
1000 grain weight (gr)	59.82	17.86	108.00 - 24.33	29.85	0.39	0.72	0.00
Seed yield per plant (gr)	27.03	14.89	83.80 - 4.97	55.07	3.7	1.77	0.01
Weight of empty head (gr)	22.94	16.02	126.37 - 4.57	69.84	19.1	3.72	0.00
Phosphorous percentage (%)	0.09	0.03	0.16 - 0.03	35.03	-0.46	0.59	0.02
Oil percentage (%)	39.4	5.31	55.67 - 23.00	13.47	1.05	-0.11	0.20

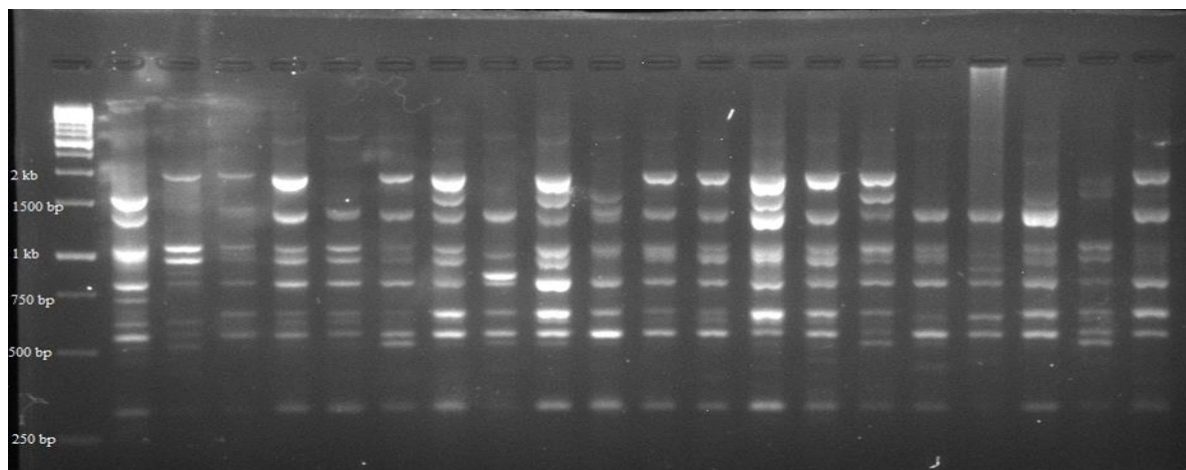
جدول ۴- آماره‌های توصیفی صفات مورد بررسی در ۱۰۰ لاین آفتابگردان روغنی تحت شرایط کمبود فسفر

Table 4. Descriptive statistics of studied traits of 100 oil seed sunflower lines under phosphorus deficit conditions.

Characters	Mean	Standard deviation	Range	Phenotypic coefficient of variation	Kurtosis	Skewness	Normality test (P-value)
Day to flowering (day)	70.33	5.86	84.00 - 57.67	8.33	-0.53	-0.15	0.20
Number of leaf	17.38	2.88	29.33 - 12.00	16.54	2.93	1.06	0.00
Chlorophyll rate (SPAD)	36.18	5.48	51.53 - 22.37	15.14	0.18	0.25	0.03
Petiole length (cm)	8.62	1.99	14.94 - 3.44	23.08	0.50	0.44	0.02
Canopy temperature (°C)	25.39	1.76	29.64 - 19.40	6.95	0.87	-0.28	0.20
Plant height (cm)	101.60	21.00	169.00 - 55.67	20.66	0.68	0.41	0.20
Stem diameter (mm)	14.18	4.02	26.53 - 5.97	28.37	0.16	0.51	0.20
Leaf length (mm)	13.92	2.56	19.61 - 7.94	18.42	-0.43	-0.14	0.20
Leaf wide (mm)	10.78	2.73	17.66 - 5.44	25.34	-0.36	0.23	0.15
Leaf area (cm ²)	11917.54	3592.41	24642.67 - 4113.67	30.14	1.72	0.65	0.00
Relative water content (%)	72.59	13.04	176.66 - 40.21	17.97	41.08	4.96	0.09
Day to maturity (day)	127.54	5.71	138.67 - 117.00	4.48	-1.12	0.47	0.00
Leaf angle (degree)	120.26	16.23	158.33 - 66.67	13.49	0.59	-0.47	0.20
Head diameter (cm)	10.17	2.27	15.50 - 5.67	22.32	-0.63	0.13	0.20
Plant dry weight (gr)	0.08	0.05	0.24 - 0.03	54.16	1.80	1.31	0.00
1000 grain weight (gr)	50.11	14.81	98.67 - 20.00	29.56	0.44	0.56	0.20
Seed yield per plant (gr)	15.35	10.16	56.77 - 2.23	66.17	5.49	2.03	0.00
Weight of empty head (gr)	14.05	9.79	71.00 - 2.80	69.72	11.03	2.59	0.00
Phosphorous percentage (%)	0.05	0.02	0.11 - .02	34.74	1.57	1.03	0.01
Oil percentage (%)	34.79	4.90	44.67 - 19.00	14.09	1.34	-0.58	0.20



شکل ۲- تصویر انگشت نگاره IRAP تعدادی از لاین‌های آفتابگردان مورد مطالعه با استفاده از آغازگرهای 1063-1064
Figure 2. IRAP fingerprints of some sunflower lines using 1063-1064 primers. First lane from left to right: M, 1kb DNA ladder (Fermentas) in base pairs.



شکل ۳- تصویر انگشت نگاره REMAP تعدادی از لاین‌های آفتابگردان مورد مطالعه با استفاده از ترکیب آغازگری 1065-UBC818
Figure 3. REMAP fingerprints of some sunflower lines using 1066-UBC818 primers. First lane from left to right: M, 1kb DNA ladder (Fermentas) in base pairs.

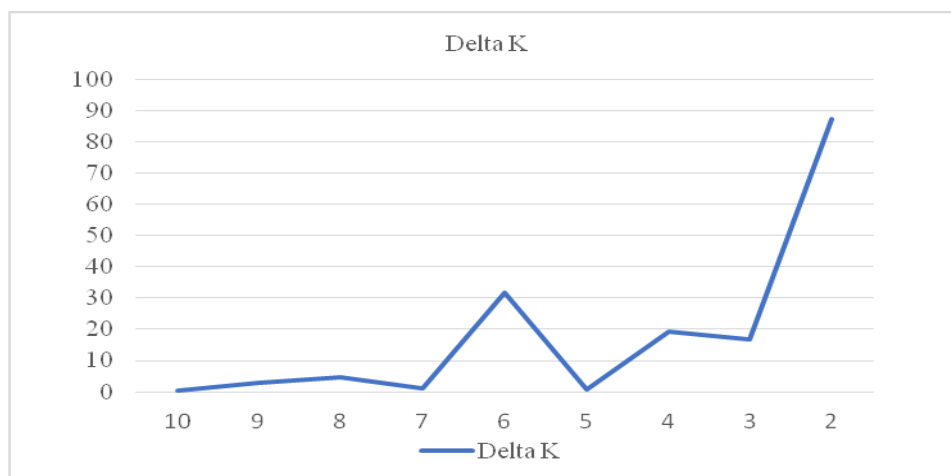
بیشتری بین دو مکان ژنی اتفاق افتد، LD سریع‌تر زوال پیدا می‌کند. اگر LD داخل یک منطقه خیلی سریع زوال پیدا کند، برای پوشش آن منطقه ژنومی به تعداد زیادی نشانگر در آن ناحیه نیاز خواهد بود. از طرف دیگر، اگر LD خیلی آهسته زوال پیدا کند، اندازه بلوک‌های هاپلوتایپی بسیار بزرگ خواهد بود و در نتیجه به‌طور واضح نمی‌توان مکان ژنی علی را شناسایی کرد. به عبارت دیگر، زوال LD روی فاصله فیزیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه، تراکم نشانگری مورد نیاز و سطح وضوح مطالعه نقشه‌یابی تأثیر می‌-

عدم تعادل پیوستگی

در تجزیه ارتباطی که مکان‌یابی QTLها بر اساس عدم تعادل پیوستگی صورت می‌گیرد، علاوه بر اطلاع از ساختار جمعیت، اطلاع از گستره عدم تعادل پیوستگی (LD) در ژنوم نیز از اهمیت بالایی برخوردار است، به‌طوری‌که توان آماره تجزیه ارتباطی به‌وسیله مقدار LD بین چندشکلی علی و اندازه جمعیت مورد استفاده تعیین می‌شود (Al-Maskri *et al.*, 2012). در طول زمان، میزان LD در نتیجه اتفاقات نوترکیبی کاهش می‌یابد. در صورتی‌که تعداد اتفاقات نوترکیبی

گذارد. در این مطالعه، از بین ۱۰۰۷۵ جفت نشانگر IRAP & REMAP ۳/۰۴ درصد در سطح احتمال یک درصد در عدم تعادل پیوستگی بودند (شکل ۶). از آنجا که اندازه پنجره نرم‌افزار TASSEL برای نمایش نمودار LD ماتریس جفت نشانگرها محدود می‌باشد، به این دلیل از تمامی جفت نشانگرهای ممکن

(۱۰۰۷۵ جفت نشانگر)، تنها بخشی نمایش داده شده است. این نمودار صرفاً نمایش کلی از عدم تعادل پیوستگی بین نشانگرها را ارائه می‌دهد. برای تفاسیر و بررسی عدم تعادل پیوستگی بین جفت نشانگرها از داده‌های خام خروجی نرم‌افزار استفاده می‌شود.



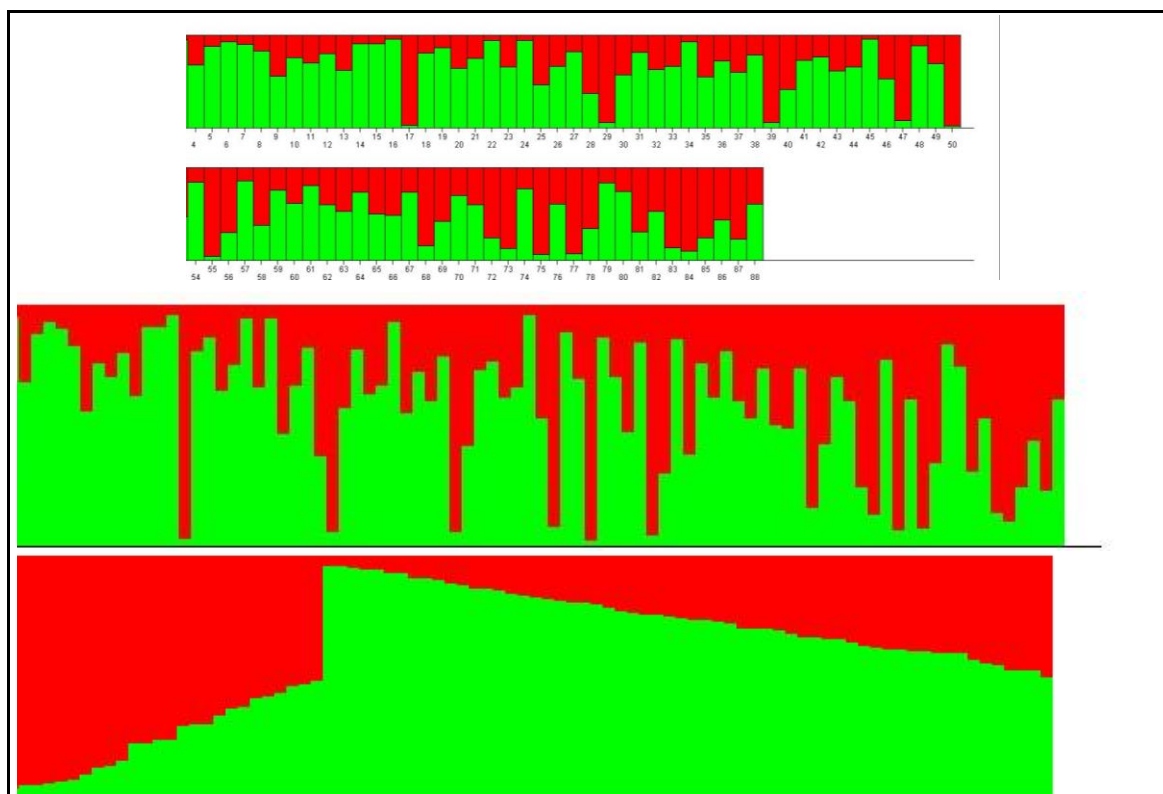
شکل ۴- تعیین ساختار جمعیت بر اساس نشانگرهای IRAP و REMAP با نرم‌افزار Structure 2.3.4. محور عمودی مقدار K و محور افقی تعداد زیر جمعیت را نشان می‌دهد.

Figure 4. Determining the structure of population based on IRAP and REMAP markers with Structure 2.3.4 software. Vertical and horizontal axis shows the K value and the number of subpopulations, respectively.

و جمعیت اولیه کمی در اختیار است، با سخت‌گیری بسیار زیاد، خیلی از نشانگرها را به راحتی حذف نمود. در تجزیه ارتباطی بر اساس مدل خطی مخلوط، ۱۷ نشانگر رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP پیوسته با صفات در شرایط فراهمی فسفر شناسایی شد که از این تعداد، سه نشانگر رتروترانسپوزونی با صفت دمای کانوپی، چهار نشانگر با صفت وزن هزار دانه، چهار نشانگر با صفت سطح برگ، یک نشانگر با صفت طول برگ، دو نشانگر با صفت تعداد برگ، یک نشانگر با صفت طول دم‌برگ، یک نشانگر با صفت قطر طبق، یک نشانگر با صفت درصد فسفر و سه نشانگر با صفت درصد روغن پیوسته بودند. نشانگر *efc8-1* بین صفات وزن هزار دانه و تعداد برگ مشترک بود (جدول ۵).

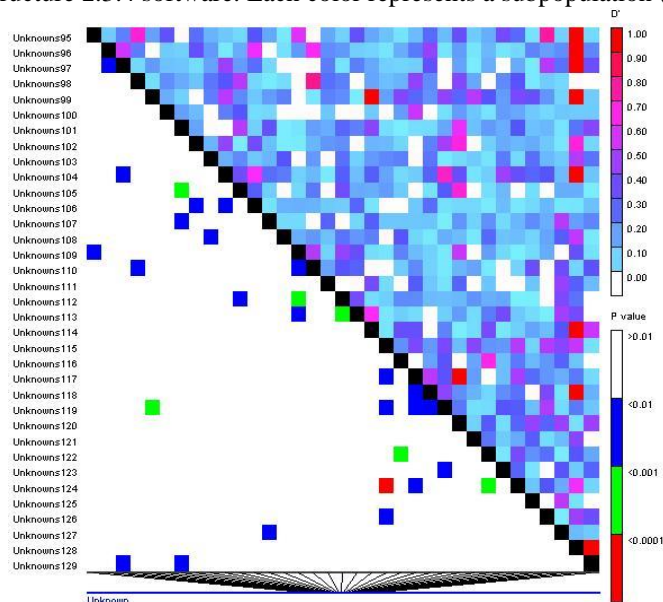
تجزیه ارتباطی صفات

بر اساس نتایج آزمون کلموگروف-اسمیرنوف روی داده‌ها در هر یک از شرایط نرمال و تنش کمبود فسفر، تعدادی از صفات توزیع نرمال نداشتند. از آنجا که نرمال‌سازی داده‌ها از طریق تبدیل داده ممکن است با کشیدن دم‌های کج به سمت مرکز توزیع، تفاوت بین افراد را نادرست نشان دهد (Doerge & Churchill, 1994; Mutschler *et al.*, 1996; Poormohammad *et al.*, 2009)، تمام تجزیه و تحلیل‌های ارتباطی بر روی داده‌های بدون تغییر انجام شد. در این مطالعه که یک بررسی ابتدایی است، تصحیح بونفرونی انجام نگرفت، چرا که در صورت انجام، ممکن است نشانگرهایی که نسبتاً معنی‌دار هستند حذف شده و در مطالعات تکمیلی در نظر گرفته نشوند. بنابراین بهتر است در مطالعات اولیه که تعداد نشانگر



شکل ۵- گروه‌بندی ۸۸ ژنوتیپ آفتابگردان با استفاده از نشانگرهای IRAP و REMAP در نرم‌افزار Structure 2.3.4 بر اساس مدل Bayesian هر رنگ، یک زیر جمعیت را نشان می‌دهد (K=۲).

Figure 5. Bayesian model-based grouping of 88 oilseed sunflower lines using IRAP and REMAP markers in Structure 2.3.4 software. Each color represents a subpopulation (K=2).



شکل ۶- پلات عدم تعادل پیوستگی (LD plot) بین جفت مکان‌های نشانگرها در ۸۸ لاین آفتابگردان با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 3.0. بالای قطر نشان‌دهنده میزان عدم تعادل پیوستگی با آماره D' و پایین قطر P-value عدم تعادل بین جفت نشانگرها را نشان می‌دهد.

Figure 6. Linkage disequilibrium plot (LD plot) between pairs of molecular markers loci in sunflower lines using TASSEL 3.0 software. Above of diameter indicates the degree of linkage disequilibrium using the D' statistic and the lower of diameter indicates the P-value Linkage disequilibrium between pairs of markers.

جدول ۵- نشانگرهای IRAP و REMAP شناساسی شده برای صفات ارزیابی شده آفتابگردان در شرایط بهینه فسفر با مدل خطی مخلوط

Table 5. Identified IRAP and REMAP markers for evaluated sunflower traits under optimal phosphorus conditions with mixed linear model

Characters (unit)	Marker	F	P-value	R ² marker
Canopy temperature (°C)	64a132	8.394399	0.004798	0.097904
	uf12	8.241346	0.00518	0.095759
	cfc9	7.227124	0.008994	0.092944
1000 grain weight (gr)	cfc8-1	8.377711	0.005081	0.132879
	cfc8-2	8.408755	0.005005	0.133473
	618574-1	7.049471	0.009484	0.082607
	618574-2	7.051986	0.009472	0.082639
Leaf length (cm)	CR1	8.661846	0.004188	0.100328
	62653	7.773988	0.006797	0.095085
	64655	7.035974	0.009653	0.084858
	623	7.856341	0.006569	0.1114
Leaf angle (degree)	646510	9.568599	0.002736	0.114014
Number of leaf	63654	8.250149	0.005279	0.117868
	cfc8-1	7.566953	0.007586	0.096222
Petiole length (cm)	648182	7.832263	0.00638	0.091055
Head diameter (cm)	cf8264	7.290392	0.0084	0.085213
Phosphorous percentage (%)	63645	8.702906	0.004165	0.104875
Oil percentage (%)	646510	7.864589	0.006342	0.091538
	646511	11.07442	0.001324	0.128888
	cr9	7.08774	0.009299	0.081239

عرض برگ و ارتفاع بوته مشترک بود. نشانگر *cfc8-1* در شرایط فراهمی و کمبود فسفر مشترک بود. بر اساس نتایج آماره‌های توصیفی، میانگین اکثر صفات مورد مطالعه در شرایط کمبود فسفر در مقایسه با شرایط بهینه کاهش یافت و بیشترین آسیب ناشی از کمبود فسفر، به ترتیب در صفات درصد فسفر بوته، عملکرد دانه در بوته، وزن طبق و وزن خشک بوته مشاهده شد. در حدود ۵/۷ میلیارد هکتار از زمین‌های کشاورزی در جهان دارای کمبود^۱ فسفر هستند (Batjes, 1997; Heuer *et al.*, 2009). در توافق با یافته‌های این تحقیق، مشاهده شده است که کمبود فسفر، رشد و عملکرد گیاهان زراعی دیگر از قبیل برنج (*Oryza sativa* L.) (Wissuwa & Ae, 2001)، ذرت (*Zea mays* L.) (Plenet *et al.*, 2000)، گندم (*Triticum aestivum* L.) (Lazaro *et al.*, 2010)، سورگوم (*Sorghum bicolor* L.) (Camacho *et al.*,)

در تجزیه ارتباطی در شرایط کمبود فسفر، تعداد ۱۹ نشانگر رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP پیوسته با صفات مورد مطالعه شناسایی شد (جدول ۶) که از این تعداد دو نشانگر رتروترانسپوزونی با صفت دمای کانوبی، یک نشانگر با صفت روز تا گلدهی، سه نشانگر با صفت وزن هزار دانه، یک نشانگر با صفت طول دمبرگ، دو نشانگر با صفت سطح برگ، چهار نشانگر با صفت عرض برگ، سه نشانگر با صفت قطر طبق، دو نشانگر با صفت وزن طبق، یک نشانگر با صفت وزن بوته، سه نشانگر با صفت روز تا رسیدگی، یک نشانگر با صفت درصد فسفر، یک نشانگر با صفت میزان کلروفیل و یک نشانگر با صفت ارتفاع بوته پیوسته بودند. نشانگر *cfc8-1* بین صفات دمای کانوبی، وزن هزار دانه، قطر طبق، وزن طبق و وزن بوته، نشانگر *ufur17* بین صفات وزن هزار دانه و سطح برگ، نشانگر *cfl* بین صفات طول برگ، عرض برگ و قطر طبق، نشانگر 655 بین صفات طول برگ، عرض برگ و قطر طبق و نشانگر 61657 بین صفات طول برگ،

¹. Lack

باعث بهبود عملکرد در خاک‌های فسفر-فقیر شوند. توسعه ارقام بهبود یافته و جدید با استفاده از تکنولوژی MAS از طرفی استفاده از کودهای تجدیدناپذیر را تقلیل خواهد کرد و از طرف دیگر منجر به بهبود کارایی استفاده از فسفر در محصولات زراعی در سیستم‌های کشاورزی کم‌نهاد^۲ خواهد شد. چندین نمونه موفق وجود دارد که در آن‌ها، استفاده از اطلاعات QTL برای بهبود صفات مرتبط با کارایی فسفر، توسعه ارقام فسفرکارا را تسهیل کرده است که از این بین می‌توان به برنج (Chin et al., 2011) و ذرت (Zhang et al., 2013c; Gu et al., 2016) اشاره کرد.

برخی از نشانگرها بین صفات در شرایط فراهمی و تنش کمبود فسفر مشترک بودند. همچنین تعدادی نشانگر مشترک بین صفات در هر یک از شرایط مورد مطالعه شناسایی شد. نشانگر *cfcr8-1* بین صفات در شرایط فراهمی و کمبود فسفر مشترک بود. نشانگرهای مشترک برای صفات در بین شرایط، معمولاً دارای اثر متقابل کمتری با شرایط محیطی می‌باشند (نشانگرهای پایدار)؛ بنابراین گزینش با آن‌ها برای صفتی در یکی از شرایط (مثلاً شرایط نرمال)، باعث بهبود صفت در شرایط دیگر (تنش) نیز خواهد شد. در کل، وجود نشانگر مشترک بین چندین صفت، معمولاً به دلیل پلیوتروپی و یا پیوستگی شدید ژن‌ها می‌باشد؛ 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 (Ahmadpour et al., 2018). البته در گزینش همزمان نباید از فاز پیوستگی غافل بود؛ بسته به حالت سیس و یا ترانس، فعالیت انتخاب، راحت‌تر و یا دشوارتر خواهد بود.

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، اطلاعات ارزشمندی در زمینه اساس ژنتیکی صفات مورد مطالعه در شرایط تنش کمبود فسفر ارائه می‌دهد که می‌توان از این اطلاعات در برنامه‌های به‌نژادی و تولید ارقام هیبرید

(Bonser et al., 2002)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) (Mahamood et al., 1996)، سویا (*Glycine max* L.) (al., 2009) و ارزن دم‌روباهی (*Setaria italica*) (Ceasar et al., 2014) را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در این وضعیت، کاهش تولید مواد غذایی از اراضی فسفر-فقیر^۱ ممکن است منجر به کمبود مواد غذایی شود (Childers et al., 2011).

در این مطالعه و بر اساس نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون با استفاده از مدل خطی مخلوط، به ترتیب ۱۷ و ۱۹ نشانگر مولکولی پیوسته با صفات آگرومورفولوژیک مورد مطالعه در شرایط فراهمی و کمبود فسفر شناسایی شدند. از دیدگاه ژنتیک، سه روش برای توسعه محصولات زراعی که به‌طور موثر می‌توانند فسفر را از خاک کسب کنند وجود دارد که عبارتند از: به‌نژادی به روش‌های کلاسیک، به‌نژادی مولکولی یا به‌نژادی به کمک نشانگرهای مولکولی و مهندسی ژنتیک. قبلاً به‌نژادی کلاسیک از طریق روش‌هایی مانند تلاقی برگشتی و انتخاب دوره‌ای، منجر به توسعه ارقام سویا با صفات زراعی عالی شده است که آن‌ها را قادر ساخته است تا در خاک‌های با کمبود فسفر، رشد کنند و تولید محصول نمایند. در سال‌های اخیر، اصلاح به کمک نشانگرهای مولکولی پس از شناسایی QTL برای صفات تحت تنش کمبود فسفر، محبوبیت زیادی کسب کرده است. در محصولاتی مانند برنج، لوبیا، سویا، *Brassica oleracea* و ذرت، QTL‌هایی که تحمل در برابر تنش کمبود فسفر را کنترل می‌نمایند، شناسایی شده‌اند. جدا از این محصولات و مخصوصاً غلات، شناسایی QTL برای صفات مرتبط با تحمل کمبود فسفر در گیاهان دیگر هنوز مورد توجه قرار نگرفته است. در گیاهان مطالعه شده، QTL‌ها عمدتاً برای صفات مرتبط با رشد، تولید زیست توده و صفات مرتبط با عملکرد شناسایی شده‌اند. QTL‌های شناسایی شده می‌توانند برای بهبود بازده مصرف فسفر در گیاهان زراعی از طریق اصلاح به کمک نشانگر (MAS) و اصلاح نژاد مورد استفاده قرار گیرند و بدین ترتیب

². Low input agriculture

¹. Phosphorous-deficient soil

جدید آفتابگردان با میزان عملکرد بالا و کارایی فسفر بالا بهره برد.

جدول ۶- نشانگرهای IRAP و REMAP شناسایی شده برای صفات ارزیابی شده آفتابگردان در شرایط کمبود فسفر با مدل خطی مخلوط

Table 6. Identified IRAP and REMAP markers for evaluated sunflower characters under phosphorus deficit conditions with mixed linear model.

Characters (unit)	Marker	F	P-value	R ² marker
Canopy temperature (°C)	uf9	12.01344	8.35E-04	0.146081
	cfc8-1	8.137503	0.005717	0.131074
Day to flowering (day)	658182	8.310145	0.004992	0.096098
1000 grain weight (gr)	ufur17-1	8.874765	0.003791	0.102577
	ufur17-2	8.869205	0.003801	0.102524
	cfc8-1	8.144062	0.005699	0.131145
Petiole length (cm)	cf3	13.1675	5.14E-04	0.178692
Leaf area (cm ²)	ufur17-1	12.55601	6.51E-04	0.144381
	618572	11.58639	0.00102	0.132332
Leaf angle (degree)	6181811	8.341238	0.004928	0.095781
	648405	7.383089	0.007977	0.084777
Leaf length (cm)	61657	10.07783	0.002149	0.117533
	655	8.561839	0.00451	0.104156
	cf1	7.308662	0.008441	0.093236
Leaf wide (cm)	cf1	9.597013	0.00272	0.128222
	638262	9.334287	0.003014	0.104134
	655	7.267425	0.008619	0.08528
	61657	8.262723	0.005213	0.097033
Head diameter (cm)	655	9.895548	0.002355	0.119483
	cf1	8.592876	0.004441	0.107383
	cfc8-1	7.246331	0.008908	0.101616
Head weight (gr)	648573	16.91298	9.00E-05	0.19634
	cfc8-1	9.589111	0.002829	0.126199
Plant dry weight (gr)	cfc8-1	7.778363	0.006828	0.103038
Day to maturity (day)	648409	7.90046	0.006134	0.091612
	61658	7.104422	0.009343	0.085475
	618406	7.458274	0.007677	0.086485
Phosphorous percentage (%)	6484010	7.382904	0.007978	0.08579
Chlorophyll rate (SPAD)	658261	7.814081	0.006423	0.091811
Plant height (cm)	61657	7.21586	0.008827	0.085677

زیستی (Najafzadeh *et al.*, 2018) نیز نشان داده‌اند. بنابراین بر اساس مطالعه حاضر و مطالعات قبلی می‌توان نتیجه‌گیری نمود که جمعیت پانل ارتباطی مورد استفاده بالقوه منبع خوبی برای فعالیت‌های اصلاحی در آفتابگردان می‌باشد.

جمعیت لاین‌های مورد مطالعه در این تحقیق که از کشورهای مختلف و منشأهای اولیه متفاوتی جمع‌آوری شده‌اند، تنوع گسترده از نظر صفات مختلف تحت شرایط خشکی (Soleimani *et al.*, 2018)، شوری (Ahmadpour *et al.*, 2018) و تنش‌های

REFERENCES

1. Al-Maskri, A. Y., Sajjad, M. & Khan, S. H. (2012). Association mapping: a step forward to discovering new alleles for crop improvement. *International Journal of Agriculture & Biology*, 14(1), 153-160.
2. Ahmadpour, S., Sofalian, O., Darvishzadeh, R. & 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), 279-286.
3. Ali Ehyaei, M. & Behbehani Zadeh, A. A. (1993). *Methods of Soil Chemical Analysis*. Technical Publication No. 893. Soil and Water Research Institute of Agricultural Extension and Education, Tehran. Iran. (in Persian)
4. Alipour, H. & Darvishzadeh, R. (2019). Association mapping of quantitative traits in molecular cereal breeding. *Cereal Research*, 9(3), 271-298. (in Persian)
5. Basirnia, A., Darvishzadeh, R. & Abdollahi Mandoulakani, B. (2016). Retrotransposon insertional polymorphism in sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines revealed by IRAP and REMAP markers. *Plant Biosystems*, 150(4), 641-652.
6. Bovill, W. D., Huang, C. Y. & McDonald, G. K. (2013). Genetic approaches to enhancing phosphorus-use efficiency (PUE) in crops: challenges and directions. *Crop Pasture Science*, 64, 179-198.
7. Cardon, L. R. & Palmer, L. J. (2003). Population stratification and spurious allelic association. *Lancet*, 361, 598-604.
8. Doerge, R. W. and Churchill, G. A. (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, 138, 963-971.
9. Food and Agriculture Organization (2018). *FAOSTAT in FAO*. Retrieved August 31, 2020, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
10. Gamuyao, R., Chin, J. H., Pariasca-Tanaka, J., Pesaresi, P., Catausan, S., Dalid, C., Slamet-Loedin, I., Tecson-Mendoza, E. M., Wissuwa, M. & Heuer, S. (2012). The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature*, 7412, 535-539.
11. Gong, X., Wheeler, R., Bovill, W. D. & McDonald, G. K. (2016). QTL mapping of grain yield and phosphorus efficiency in barley in a Mediterranean-like environment. *Theoretical and Applied Genetics*, 129, 1657-1672.
12. Gourley, C. J. P., Allan, D. L. & Russelle, M. P. (1994). Plant nutrient efficiency: a comparison of definitions and suggested improvement. *Plant Soil*, 158, 29-37.
13. Jayaraman, K. (1999). A Statistical Manual for Forestry Research, Food and Agricultural Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, 234 pp.
14. Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Souniemi, A. & Schulman, A. H. (1999). IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 704-711.
15. Li, Y. D., Wang, Y. J., Tong, Y. P., Gao, J. G., Zhang, J. S. & Chen, S. Y. (2005). QTL mapping of phosphorus deficiency tolerance in soybean (*Glycine max* Merr.). *Euphytica*, 142, 137-142.
16. Liao, H., Yan, X. L., Rubio, G., Beebe, S. E., Blair, M. W. & Lynch, J. P. (2004). Genetic mapping of basal root gravitropism and phosphorus acquisition efficiency in common bean. *Functional Plant Biology*, 31, 959-970.
17. Mc Laughlin, M. J., Alston, A. M. & Martin, J. K. (1988). Phosphorus cycling in wheat-pasture rotations. I. The source of phosphorus taken up by wheat. *Australian Journal of Soil Research*, 26, 323-331.
18. Mutschler, M. A., Doerge, R. W., Liu, S. C., Kuai, J. P., Liedl, B. E. and Shapiro, J. A. (1996). QTL analysis of pest resistance in the wild tomato *Lycopersicon pennellii*: QTLs controlling acylsugar level and composition. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 709-718.
19. Najafzadeh, R., Darvishzadeh, R., Musa-Khalifani, K., Abrinbana, M. & Alipour, H. (2018). Retrotransposable regions of sunflower genome having relevance with resistance to Sclerotiniaspecies: *S. sclerotiorum* and *S. minor*. *Australasian Plant Pathology*, 47, 511-519.
20. Onofrio, C., Orenzis, G., Giordani, T., Natali, L., Cavallini, A. & Scalabrelli, G. (2010). Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. *Tree Genetics and Genomes*, 6, 451-466.
21. Oono, Y., Kobayashi, F., Kawahara, Y., Yazawa, T., Handa, H., Itoh, T. & Matsumoto, T. (2013). Characterization of the wheat (*Triticum aestivum* L.) transcriptome by de novo-assembly for the

- discovery of phosphate starvation-responsive genes: Gene expression in Pi-stressed wheat. *BMC Genomics*, 14, 77.
22. Poormohammad Kiani, S., Maury, P., Nouri, L., Ykhlef, N., Grieu, P. & Sarrafi, A. (2009). QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments. *Plant Breeding*, 128, 363-373.
 23. Pritchard, J. K., Stephens, M., Rosenberg, N. A. & Donnelly, P. (2000). Association mapping in structured populations. *American Journal of Human Genetics*, 67 (1), 170-181
 24. Pritchard, J. K. & Donnelly, P. (2001). Case control studies of association in structured or admixed populations. *Theoretical Population Biology*, 60, 227-237.
 25. Rostok, N., Ramsay, L., Mac Kenzie, K., Cardle, L. & Bhat, P. R. (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.
 26. Sepehr, E., Malakouti, M. J., Kholdebarin, B., Samadi, A. & Karimian N. (2009). Genotypic variation in P efficiency of selected Iranian cereals in greenhouse experiment. *International Journal of Plant Production*, 3(3), 17-28.
 27. Shimamura, M., Yasue, H., Ohshima, K., Abe, H., Kato, H., Kishiro, T., Goto, M., Munechika, I. & Okada, N. (1997). Molecular evidence from retrotransposons that wales from a clade within even-toed ungulates. *Nature*, 88, 666-670.
 28. Soleimani Gezeljeh, A., Darvishzadeh, R., Ebrahimi, A. & Bihanta, M. R. (2018). Identification of SSR and retrotransposon-based molecular markers linked to morphological characters in oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) under natural and water-limited states. *Journal of Genetics*, 97, 189-203.
 29. Su, J. Y., Xiao, Y. M., Li, M., Liu, Q. Y., Li, B., Tong, Y. P., Jia, J. Z. & Li, Z. S. (2006). Mapping QTLs for phosphorus-deficiency tolerance at wheat seedling stage. *Plant and Soil*, 281, 25-36.
 30. Wissuwa, M., Yano, M. & Ae, N. (1998). Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 777-783.
 31. Xu, W., Subudhi, P. K., Crasta, O. R., Rosenow, D. T., Mullet, J. E. & Nguyen, H. T. (2000). Molecular mapping of QTLs conferring stay-green in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Genome*, 43, 461- 469.
 32. Yan, X. L., Wu, P., Ling, H. Q., Xu, G. H., Xu, F. S. & Zhang, Q. F. (2006). Plant nutriomics in China: an overview. *Annals of Botany*, 98, 473-482.
 33. Yang, M., Ding, G. D., Shi, L., Xu, F. S. & Meng, J. L. (2011). Detection of QTL for phosphorus efficiency at vegetative stage in *Brassica napus*. *Plant and Soil*, 339, 97-111.
 34. Zarei, L., Farshadfar, E., Haghparast, R., Rajabi, R. & Mohammadi Sarab Badieh, M. (2007). Evaluation of some indirect traits and indices to identify drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asian Journal of Plant Sciences*, 6, 1204- 1210.
 35. Zhu, J. M., Kaeppler, S. M. & Lynch, J. P. (2005). Mapping of QTL controlling root hair length in maize (*Zea mays* L.) under phosphorus deficiency. *Plant and Soil*, 270, 299-310.

فایل تکمیلی ۱- نام و منشأ لاین‌های آفتابگردان دانه روغنی مورد مطالعه

Supplementary file 1. Name and origin of studied oil seed sunflower lines

Code	Line name	Country	Research Centre	Code	Line name	Country	Research Centre
1	H100A/83HR4	France	ASGROW	51	RHA265	USA	USDA
2	H209A/LC1064	France	ASGROW	52	PM1-3	USA	USDA
3	H205A/H543R	France	ASGROW	53	RT948	France	RUSTICA
4	AS5306	France	ENSAT	54	283-ENSAT	-	-
5	RHA858	USA	USDA	55	QHP-1	France	INRAMONT
6	H209A/83HR4	France	ASGROW	56	SDR19	USA	USDA
7	AS3211	France	ENSAT	57	HA337B	USA	USDA
8	254-ENSAT	France	ENSAT	58	H100B	France	ASGROW
9	AS5304	France	ASGROW	59	B454/03	Hungary	-
10	1009329.2(100K)	France	ENSAT	60	HA304	USA	USDA
11	270-ENSAT	France	ENSAT	61	RT931	France	RUSTICA
12	AS613	France	ASGROW	62	HA335B	USA	USDA
13	A-F1POPA	France	NOVARTIS	63	NS_B5	France	NOVARTIS
14	OES	France	INRAMONT	64	SDB3	USA	USDA
15	H100A/LC1064	France	ASGROW	65	LC1064C	France	ASGROW
16	RHA266	USA	USDA	66	NS-R5	France	NOVARTIS
17	PAC2	France	ENSAT	67	DM-2	USA	USDA
18	H157A/LC1064	France	ASGROW	68	H156A/RHA274	France	ASGROW
19	5DES20QR	France	BRN	69	SDB1	USA	USDA
20	1009337(100K)	France	ENSAT	70	HAR-4	USA	USDA
21	AS3232	France	ENSAT	71	AS5305	France	ASGROW
22	12ASB3	France	ASGROW	72	RHA274	USA	USDA
23	8ASB2	France	ASGROW	73	H158A/H543R-B	France	ASGROW
24	9CSA3	France	Caussade semences	74	H100A/RHA274	France	ASGROW
25	H049+FSB	France	-	75	H209A/H566R	France	ASGROW
26	SSD-580	France	ASGROW	76	ASO-1-POP-A	France	ENSAT
27	5AS-F ₁ /A ₂ *R ₂	France	ASGROW	77	AS6305	France	ENSAT
28	7CR16=PRH6	France	C.F	78	B-F1POPB	France	NOVARTIS
29	ENSAT699	France	ENSAT	79	D34	USA	USDA
30	SSD-581	France	ASGROW	80	CAY	France	ENSAT
31	TMB-51	France	INRAMONT	81	346	Iran	SPII
32	10-59	Iran	SPII	82	NS-F ₁ -A ₅ *R ₅	France	NOVARTIS
33	110	Iran	SPII	83	36	Iran	SPII
34	H603R	France	INRAMONT	84	38	Iran	SPII
35	4	Iran	SPII	85	SDB2	France	INRAMONT
36	703-CHLORINA	France	ENSAT	86	H158A/LC1064	-	-
37	NSF ₁ -A ₄ *R ₅	France	NOVARTIS	87	H156A/H543R	France	ASGROW
38	28	Iran	SPII	88	H543R/H543R	France	ASGROW
39	30	Iran	SPII	89	H543R	France	-
40	F1250/03	Hungary	-	90	15038	France	ASGROW
41	SDR18	USA	USDA	91	SF076	France	ENSAT
42	LP-CSYB	France	ENSAT	92	8A*LC1064C*	-	-
43	803-1	Serbia	IFVC	93	SF085	France	ENSAT
44	1009370-1(100K)	France	ENSAT	94	SF092	-	-
45	CSWW2X	France	Caussade semences	95	HC91	Iran	SPII
46	1009370-3(100K)	France	ENSAT	96	10-59	Iran	SPII
47	H158A/H543R-A	France	ASGROW	97	H-100A-90RL8	-	-
48	H100A	France	ASGROW	98	SF109	France	ENSAT
49	15031	France	ASGROW	99	SF105	France	ENSAT
50	H205A/83HR4	France	ASGROW	100	SF-023	-	-

فایل تکمیلی ۲- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

Supplementary file 2. Physical and chemical properties of soil used in the experiment

EC	pH	Lime	Silt	Sand	Clay	Soil texture	Organic carbon	Item
(dS/m)	-		%			-	(%)	Unit
0.78	7.92	31.5	30	30	40	Clay loam	0.74	Amount
K	P	Cu	Mn	Fe	Zn	Organic matter (%)		Item
(mg/kg)								Unit
102	7.2	1.3	10.3	11	0.11	1.28		Amount

EC: Electrical conductivity; pH: Potential hydrogen; Zn: Zinc; Fe: Iron; Mn: Magnesium; Cu: Copper; P: Phosphorus; K: Potassium
dS/m: DeciSiemens per meter.