

تجزیه ارتباطی صفات زراعی در ژنوتیپ‌های آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) با نشانگرهای SSR در شرایط نرمال و تنش کمبود فسفر

مریم رسول‌زاده اقدام^۱، رضا درویش‌زاده^{۲*}، ابراهیم سپهر^۳، هادی علیپور^۴

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه. ارومیه، ایران.

۲. استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه. ارومیه، ایران.

۳. استاد، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه. ارومیه، ایران.

۴. استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه. ارومیه، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۱۹)

Association analysis for agronomic traits with SSR markers in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes under optimum and phosphorus deficiency conditions

Maryam Rasoulzadeh Aghdam¹, Reza Darvishzadeh^{2*}, Ebrahim Sepehr³, Hadi Alipour⁴

1. M.Sc. in Plant Breeding, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

2. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

3. Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

(Received: Aug. 17, 2020 - Accepted: Dec. 9, 2020)

Abstract

In order to breeding phosphorus-efficient genotypes, 100 sunflower genotypes coming from different parts of the globe were evaluated based on agro-morphological traits under optimal and phosphorus deficient (7.2 mg/kg) conditions in a completely randomized design with three replications in potted conditions in Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University in 2017 cropping season. In molecular experiments, the molecular profile of genotypes was prepared with 30 pairs microsatellite (SSR) primers. The results showed that the mean of most studied traits such as stem diameter, leaf wide, leaf surface, chlorophyll rate and 1000 grain weight was reduced significantly in phosphorus deficient conditions compared to optimal ones, which shows that phosphorus deficiency has a negative effect on the studied traits. The polymorphic information content (PIC) in the studied genotypes ranged from 0.055 for ORS718 primer to 0.687 for HA3040 primer. In population structure analysis, based on 30 SSR loci, potentially 2 sub-populations (K=2) were identified in the association panel. About 1.15% of possible SSR locus pairs showed significant level of linkage disequilibrium ($P < 0.01$). In association analysis using MLM model, 17 SSR markers were identified for traits in each one of optimal and phosphorus deficient conditions. Some markers such as P807, P608, P307, P718 and P878 were common between traits under optimal and phosphorus deficit conditions. The results of the current study provide valuable information on the marker aided selection and the genetic basis of studied traits under phosphorus deficit conditions. This information can be used in selecting individuals during breeding programs and developing inbred lines to achieve the production of new sunflower hybrid cultivars with high yield and high phosphorus efficiency.

Keywords: DNA markers, genetic diversity, linkage disequilibrium, phosphorous deficit stress, sunflower.

چکیده

در راستای اصلاح ارقام زراعی فسفر-کارا، ۱۰۰ ژنوتیپ آفتابگردان روغنی از نقاط مختلف جهان در دو شرایط بهینه و کمبود فسفر (۷/۲ mg/kg) بر اساس صفات مختلف زراعی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلدانی در دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه در سال زراعی ۱۳۹۶ ارزیابی شدند. در آزمایش مولکولی پروفیل مولکولی افراد با ۳۰ جفت آغازگر میکروستالات (SSR) تهیه گردید. نتایج نشان داد میانگین تمامی صفات از جمله قطر ساقه، عرض برگ، سطح برگ، قطر طبق، میزان کلروفیل و وزن هزار دانه در شرایط کمبود فسفر در مقایسه با شرایط بهینه به طور معنی‌دار کاهش یافته است که نشان دهنده تأثیر منفی کمبود فسفر روی صفات مورد بررسی است. میزان دامنه میزان اطلاعات چند شکل (PIC) در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بین ۰/۰۵۵ برای آغازگر ORS718 تا ۰/۶۸۷ برای آغازگر HA3040 متغیر بود. در تجزیه ساختار جمعیت بر اساس ۳۰ مکان میکروستالات (SSR)، ۲ زیر جمعیت احتمالی (K=2) در پانل ارتباطی شناسایی شد. حدود ۱/۱۵ درصد از جفت مکان‌های SSR مورد مطالعه به طور معنی‌دار در عدم تعادل پیوستگی بودند ($P \leq 0.01$). در تجزیه ارتباطی صفات بر اساس نشانگرهای SSR با استفاده از مدل خطی مخلوط ۱۷ مکان SSR در هر یک از شرایط بهینه و کمبود فسفر با صفات مورد مطالعه پیوسته بودند. برخی از نشانگرها همچون P807, P608, P307, P718 و P878 بین صفات در شرایط بهینه و تنش کمبود فسفر مشترک بودند. نتایج بدست آمده از این مطالعه، اطلاعات ارزشمندی در زمینه گزینش به کمک نشانگر و مبنای ژنتیکی صفات مورد مطالعه در شرایط تنش کمبود فسفر ارائه می‌دهد که می‌توان از این اطلاعات در گزینش افراد طی برنامه‌های به‌نژادی و تولید لاین-های خالص در جهت تحقق تولید ارقام هیبرید جدید آفتابگردان با میزان عملکرد بالا و کارایی فسفر بالا بهره برد.

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

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) یک گیاه دیپلوئید ($2n=2x=34$) با تعداد کروموزوم پایه ۱۷ و اندازه ژنوم حدود ۲۸۷۱ تا ۳۱۸۹ Mpb متعلق به خانواده‌ی کاسنیان می‌باشد (Bazin *et al.*, 2011; Fernandez *et al.*, 2012). ارقام روغنی آفتابگردان حدود ۸ درصد از کل تولید دانه‌های روغنی دنیا را به خود اختصاص داده است و پس از سویا (۵۵ درصد)، کلزا (۱۴ درصد) و پنبه دانه (۱۰ درصد)، چهارمین منبع تامین روغن خوراکی در دنیا محسوب می‌گردند (Anonymous, 2010). روغن آفتابگردان حاوی ویتامین‌های محلول در چربی شامل A، E، D، K (Bhutta, 1998)، غنی از اسیدهای چرب غیراشباع لینولئیک و فاقد کلسترول است و به همین دلیل جزو روغن‌هایی با مرغوبیت بالا محسوب می‌شود (Sharfun-Nahar, 2005). همچنین روغن آفتابگردان از پتانسیل بسیار خوبی برای استفاده به عنوان سوخت بیودیزل برخوردار است (Thirumarimurugan *et al.*, 2012).

فسفر از عناصر اصلی مورد نیاز برای رشد و نمو گیاهان، مخصوصاً آفتابگردان است (Hawkesford *et al.*, 2012). این عنصر یکی از اجزای تشکیل دهنده پروتئین‌ها، DNA و RNA است. غلظت فسفر در گیاه بین ۰/۱ تا ۰/۵ درصد متغیر بوده و وظایف مهمی نظیر ذخیره و انتقال انرژی بر عهده دارد (Marschner, 1986). کمبود فسفر خاک یکی از مهمترین عوامل محدود کننده در تولید محصولات کشاورزی است (Tiessen, 2008; Cordell *et al.*, 2009). اگرچه مقدار فسفر کل خاک به طور کلی بالا است، اما فسفر قابل دسترس برای گیاهان اغلب محدود است، که عمدتاً بدین دلیل است که مقدار زیادی فسفر موجود در خاک توسط اکسیدهای فلزی (خاک اسیدی) یا ترکیبات کربناتی (خاک قلیایی) تثبیت می‌شود و یا از خاک به فرم فسفر آلی خارج می‌شود (Kochian, 2012; Zeng *et al.*, 2012).

(2016). تخمین زده می‌شود که بیش از ۵۰ درصد از زمین‌های قابل کشت جهان کمبود فسفر داشته باشند (Lynch, 2011). بنابراین، مقادیر زیادی کودهای فسفات اغلب برای حفظ عملکرد گیاه به خاک اضافه می‌شوند (Withers *et al.*, 2014). با این حال سنگ فسفات، به عنوان منبع اصلی کود فسفات، محدود و تجدید ناپذیر است (Tiessen, 2008; Cordell *et al.*, 2009; Stutter *et al.*, 2012). با نرخ فعلی معادن و مصرف، تخمین زده می‌شود که ذخایر فسفات تجاری جهان تا ۳۰۰-۴۰۰ سال آینده تخلیه می‌شود (Van Kauwenbergh, 2010). از این رو، به‌نژادی ارقام زراعی که فسفات و یا فسفر را با کارایی بیشتری جذب نمایند، یکی از راهکارهای کاهش استفاده از کودهای فسفره است (White *et al.*, 2012; Veneklaas *et al.*, 2012).

گیاهان سازوکارهای تطبیقی برای افزایش دسترسی به فسفات در خاک، جذب و انتقال فسفات و استفاده از فسفر گیاه تحت شرایط کمبود فسفر ایجاد کرده‌اند. ترشحات ریشه نقش مهمی در افزایش دسترسی به فسفات در خاک دارند. در مقایسه با گیاهان غنی از بابت فسفر، گیاهان فقیر از نظر فسفر تعداد زیادی پروتون و اسیدهای آلی برای حل فسفات از نمک‌های Al، Fe و Ca یا آنزیم‌هایی از جمله APase، RNase و Phytase برای آزاد کردن فسفات از ترکیبات آلی ترشح می‌کنند (Lambers *et al.*, 2014; López-Arredondo *et al.*, 2013). به عنوان مکانیسمی دیگر، فراوانی انتقال‌دهنده‌های با تمایل بالا برای اتصال به فسفات^۳ در گیاهان فقیر از نظر فسفر^۴ افزایش می‌یابد که در نتیجه آن جذب فسفات به وسیله ریشه و توزیع مجدد فسفات درون

1. Phosphorous-replete plants
2. Plants lacking sufficient phosphorous
3. High-affinity phosphate transporters
4. Phosphorous-deficient plants

تجزیه ارتباطی یا نقشه‌یابی عدم تعادل پیوستگی از روش‌های مهم ژنتیک کمی هستند که اکثراً جهت فهم ارتباط بین یک ژنوتیپ و یک فنوتیپ خاص و شناسایی QTL مورد استفاده قرار می‌گیرند (Azizi *et al.*, 2017). موفقیت نقشه‌یابی پیوستگی در شناسایی QTLها برای صفات متعدد و در بسیاری از گونه‌ها به اثبات رسیده است (Mauricio, 2001; Doerge, 2002; Maccaferri *et al.*, 2011; Pasam *et al.*, 2012). ولی با توجه به اینکه منطقه QTL شناسایی شده بیشتر از چند سانتی‌مورگان و شامل صدها ژن می‌باشد، شناسایی QTLهای کاندیدی مناسب را با مشکل مواجه می‌سازد. همچنین ساخت جمعیت‌های نقشه‌یابی مانند لاین‌های اینبرد نوترکیب^۴ از طریق تلاقی‌های کنترل شده و سپس چندین نسل خود گشنی زمان‌بر بوده و این نیز خود یکی از محدودیت‌های استفاده از نقشه-یابی پیوستگی می‌باشد. نقشه‌یابی ارتباطی به عنوان یک روش جایگزین یا مکمل جهت شناسایی ارتباطات بین نشانگر و صفت، دارای مزایای زیادی نسبت به نقشه‌یابی QTL از جمله: افزایش وضوح QTL، استفاده از ژرم پلاسما طبیعی و افزایش پوشش آلی می‌باشد (Yu *et al.*, 2006)، همچنین این روش علاوه بر نقشه‌یابی دقیق‌تر با ژرم‌پلاسماهای دارای تنوع ژنتیکی بیشتر سازگار بوده و اجازه نقشه‌یابی چندین صفت به طور همزمان را می‌دهد، بنابراین برای هر صفت مورد نظر نیازی به ایجاد جمعیت‌های دو والدی که خود باعث ایجاد هزینه اضافی ارزیابی ژنوتیپی و فنوتیپی می‌شود، نیست. روش نقشه‌یابی ارتباطی به طور گسترده‌ای در ژنتیک انسانی و جانوری که در آن‌ها ایجاد جمعیت‌های در حال تفرق بزرگ غیر ممکن می‌باشد، استفاده می‌شود (De Wan *et al.*, 2006).

گیاه^۱ افزایش می‌یابد (Hammond and White, 2008; Lapis-Gaza *et al.*, 2014; López-Arredondo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Walder *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016). علاوه بر این، برخی از گیاهان برای تقویت جذب فسفات ارتباط همزیستی با قارچ‌های میکوریزی ایجاد می‌کنند (Cheng *et al.*, 2011; Bulgarelli *et al.*, 2013; White *et al.*, 2013a, 2013b). گیاهان همچنین زمانی که با کمبود فسفر مواجه می‌شوند با کاهش خزانه‌های فسفر آلی^۲ از طریق مسیرهای متابولیک جایگزین، بازسازی لیپیدها^۳ و افزایش توزیع مجدد فسفر از بافت‌های پیر به بافت‌های در حال توسعه، کارایی استفاده از فسفر خود را بهبود می‌بخشند که منجر به تولید زیست توده حداکثر و تخصیص بالای زیست توده به عملکرد دانه می‌شود (Wasaki *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2011; Plaxton and Tran, 2011; Veneklaas *et al.*, 2012).

چندین رقم فسفر-کارا در گیاهان زراعی مثل سویا (Wang *et al.*, 2010a) و لوبیا (Lynch, 2007) با روش‌های به‌نژادی کلاسیک توسعه یافته‌اند. شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی (QTL) برای صفات هدف (مورد نظر)، می‌تواند روند دسترسی به ارقام با کارایی فسفر بالا در محصولات زراعی را افزایش دهد. مکان‌یابی ژن باعث تجزیه صفات پیچیده به QTLها می‌شود. QTLها را می‌توان برای بهبود کارایی جذب و استفاده فسفر در محصولات زراعی از طریق انتخاب به کمک نشانگر یا تکنیک‌های مهندسی ژنتیک، که کارآمدتر و دقیق‌تر از به‌نژادی کلاسیک هستند، به ارقام امید بخش وارد نمود. نقشه‌یابی پیوستگی و

1. Phosphate redistribution within the plant
2. Reducing organic phosphorous pools
3. Lipid remodeling

ژنی صفات مهم مرتبط با دانه در شرایط تنش کمبود فسفر در این گیاه تحقیقاتی صورت نگرفته است. هر چند در زمینه مکان‌یابی ژنتیکی برخی صفات مهم زراعی در شرایط تنش خشکی (Soleimani *et al.*, 2018)، شوری (Ahmadpour *et al.*, 2018) و مقاومت به بیماری‌ها (Najafzadeh *et al.*, 2018) تحقیقاتی انجام شده است. بنابراین و با توجه به توضیحات مذکور، هدف از مطالعه حاضر شناسایی مکان‌های ژنومی مرتبط با صفات زراعی در آفتابگردان روغنی با استفاده از نشانگرهای میکروستلایت (SSR) در شرایط فراهمی و تنش کمبود فسفر است که نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند برای به‌زادگران در انتخاب ژنوتیپ‌های امیدبخش در راستای تولید و توسعه ارقام فسفر-کارا سودمند باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تنش کمبود فسفر

تعداد ۱۰۰ ژنوتیپ آفتابگردان روغنی از مناطق مختلف جهان شامل آمریکا، فرانسه، صربستان، مجارستان و ایران (فایل تکمیلی ۱) در دو شرایط نرمال و خاک با فسفر پایین در شرایط گلدانی در محوطه باز در سال زراعی ۱۳۹۶ در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار از لحاظ صفات مختلف ارزیابی شدند (شکل ۱). برای این منظور، تعداد ۶۰۰ گلدان ۱۵ کیلویی تهیه و به دو دسته ۳۰۰ تایی تقسیم شدند. دسته اول با نسبت دو به یک از خاک "نرمال" از نظر فسفر" و ماسه پر شدند در حالی که ۳۰۰ تای دوم با خاک "فقیر از نظر فسفر" و ماسه با همان نسبت دو به یک پر شدند.

به منظور شناسایی خاک فقیر از نظر فسفر، از مناطق مختلف در ارومیه نمونه خاک تهیه و به آزمایشگاه تجزیه خاک گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه ارسال گردید.

استفاده از نشانگرهایی برای شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با فنوتیپ اختصاصی اسکن می‌شود (Rafalski, 2002; Zhu *et al.*, 2008).

از آنجا که افزایش عملکرد هدف نهایی به‌زادی گیاهان زراعی است، بیشتر صفات منفرد مؤثر بر زیست توده شاخساره یا عملکرد تحت شرایط کمبود فسفر (تنش کمبود فسفر) برای بهبود محصول هدف قرار گرفته است. در این بین، وزن خشک کل رایج‌ترین صفت مورد مطالعه در بیشتر محصولات زراعی است.

نشانگرهای میکروستلایت (SSR) از جمله نشانگرهای ژنتیکی هستند که به‌علت ویژگی‌های منحصر به فرد مورد استقبال فراوان پژوهشگران قرار گرفته‌اند (Andaya *et al.*, 1996). مهم‌ترین کاربرد این نشانگرها، مطالعه تنوع ژنتیکی، مطالعه فیلوژنی و تکاملی، تهیه نقشه ژنتیکی، همسانه‌سازی ژن‌ها، پژوهش‌های اکولوژیک و تکامل جمعیت‌ها، انتخاب به کمک نشانگرها، خالص‌سازی مواد ژنتیکی و انجام مطالعات سیتوژنتیکی است. استفاده از نشانگرهای میکروستلایت (SSR) در مطالعات روابط خویشاوندی، تمایز ژنوتیپ‌ها و نقشه‌یابی ژنتیکی توسط محققان مختلف گزارش شده است (Foolad *et al.*, 1995; Zeinalabedini *et al.*, 2010; Zeinalabedini *et al.*, 2007). Vanitha *et al.* (۲۰۱۴) در آفتابگردان ۲۹ نشانگر میکروستلایت (SSR) شناسایی کردند که ارتباط معنی‌داری با صفات زراعی- مورفولوژیک نشان می‌دادند. (Sahranavard-Azartamar *et al.* (۲۰۱۵) در تجزیه ارتباط برای ۱۲ صفت زراعی- مورفولوژیک در آفتابگردان روغنی با مدل‌های GLM و MLM به ترتیب ۹ و ۱۶ مکان میکروستلایت (SSR) با ارتباط معنی‌دار شناسایی کردند که تغییرات قابل توجهی از صفات را توجیه می‌نمودند.

علی‌رغم اهمیت آفتابگردان روغنی در ایران، در زمینه شناسایی نشانگرهای مولکولی و مکان‌های



شکل ۱. نمایی از آزمایش ارزیابی صفات زراعی - مورفولوژیک در ۱۰۰ ژنوتیپ آفتابگردان روغنی تحت شرایط نرمال و تنش کمبود فسفر

متر به عنوان خاک با میزان فسفر پایین (mg/kg) ۷/۲ انتخاب شد (فایل تکمیلی ۲). خاک با میزان فسفر کم قبل از استفاده با عناصر مختلف کودی (mg/kg) ۱۰۰ نیروژن به صورت اوره در دو تقسیط، (mg/kg) ۱۰۰ پتاسیم به صورت سولفات پتاسیم،

بر اساس نتایج آزمایش‌های تجزیه خاک، خاک تهیه شده از منطقه خان ارخی (Khan Arkhi) دانشگاه ارومیه واقع در طول جغرافیایی ۴۵/۵ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۷/۳۲ دقیقه شمالی و با ارتفاع ۱۳۲۰ متر از سطح دریا، از عمق ۳۰-۰ سانتی

2018)، روز تا رسیدگی (روز)، زاویه‌ی برگ با ساقه (درجه) (Ghanbari *et al.*, 2015)، قطر طبق (سانتی‌متر)، وزن بوته (گرم)، وزن هزار دانه (گرم)، وزن طبق (گرم)، درصد روغن (درصد)، درصد فسفر بوته (درصد) و عملکرد تک بوته (گرم) اندازه‌گیری شدند.

ارزیابی ژنوتیپی و تجزیه‌های آماری

در این بخش از آزمایش از داده‌های ژنوتیپی که با ۳۰ جفت آغازگر میکروستلایت (SSR) (فایل تکمیلی ۳) تهیه شده است استفاده گردید (Sahranavard *et al.*, 2016). نشانگرهای میکروستلایت (SSR)، به دلیل چند آللی بودن، پلی‌مورفیسم بالا، توزیع تصادفی در ژنوم، توارث هم‌بارز و مکان اختصاصی بودن یکی از قابل اعتمادترین نشانگرها برای مطالعات ژنتیکی می‌باشند و در مقایسه با سایر نشانگرها به طور گسترده در مطالعات تنوع ژنتیکی و مطالعات نقشه‌یابی گیاهان از جمله آفتابگردان استفاده می‌شوند (Soleimani *et al.*, 2018). تجزیه ساختار جمعیت، دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها به زیر جمعیت‌های مناسب و شناسایی ژنوتیپ‌های مختلط با روش Bayesian در نرم‌افزار Structure 2.3.4 انجام گرفت (Pritchard *et al.*, 2000). در این روش هر یک از ژنوتیپ‌ها با یک احتمال و طوری به زیر جمعیت‌های فرضی منتسب می‌شود که در هر زیرجمعیت میزان همگنی (یکنواختی) بیشتر شود (Pritchard *et al.*, 2000). مقادیر اولیه K (زیرجمعیت‌های فرضی اولیه) بین ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها ۵ تکرار منظور گردید. در تجزیه‌ها از مدل ترکیبی Admixture با استقلال فراوانی آللی، ۱۰۰/۰۰۰ تکرار Burn-in و ۱۰۰/۰۰۰ تکرار

۵ mg/kg آهن به صورت سکوسترین آهن ۱۳۸، ۱۵ mg/kg روی به صورت سولفات روی، ۲/۵ mg/kg منگنز به صورت سولفات منگنز، ۲/۵ mg/kg مس به صورت سولفات مس و ۲/۵ mg/kg بور به صورت اسید بوریک تقویت شد (Sepehr *et al.*, 2009). سپس تل خاک به دو بخش تقسیم گردید. یک بخش دوباره با ۸۰ mg/kg از منبع سوپرفسفات تریپل تقویت شد (نرمال از نظر فسفر) اما بخش دوم کود فسفوری دریافت نکرد (فقیر از نظر فسفر).

گلدان‌های مربوط به هر یک از شرایط (نرمال از نظر فسفر و فقیر از نظر فسفر) مطابق با نقشه تصادفی طرح آزمایشی در محوطه باز با فاصله‌ی دو ردیف گلدان از هم ۵۰ سانتی‌متر و فاصله گلدان‌ها از هم در روی ردیف ۳۰ سانتی‌متر چیده شدند. چهار عدد بذر آفتابگردان در هر گلدان کشت گردید. آبیاری گلدان‌ها بعد از کشت در روزهای اول آزمایش با آب پاش هر سه روز یک بار انجام گرفت اما بعد از جوانه‌زدن بذرها و رویت گیاهچه‌ها و مصادف شدن با فصل گرما آبیاری به صورت روزانه از طریق سیستم آبیاری قطره‌ای (تیپ) انجام شد. پس از سبز شدن گیاهچه‌ها و در مرحله چهار برگی تعداد گیاهان هر گلدان به دو گیاه تقلیل یافت. مبارزه با علف‌های هرز به صورت مکانیکی و با توجه به نیاز انجام گرفت. بعد از گلدهی صفات مختلف از قبیل تعداد روز تا گلدهی (روز)، تعداد برگ، طول دم‌برگ (سانتی‌متر)، میزان کلروفیل با استفاده از SPAD قبل از ظهر قبل از گرم شدن هوا، دمای کانوپی توسط دماسنج مادون قرمز (°C)، ارتفاع بوته (سانتی‌متر)، قطر ساقه (سانتی‌متر)، طول برگ (سانتی‌متر)، عرض برگ (سانتی‌متر)، سطح برگ (سانتی‌متر مربع)، محتوای نسبی آب برگ (درصد) (Soleimani *et al.*,)

صفات دمای کانوپی و زاویه برگ و بیشترین آسیب ناشی از کمبود فسفر به ترتیب در صفات درصد فسفر بوته (۴۶/۴۶)، عملکرد دانه در بوته (۴۳/۲۰)، وزن طبق خالی (۳۸/۷۶) و وزن خشک بوته (۲۷/۰۸) دیده شد (جدول ۱). کمبود فسفر باعث افزایش در صفات تعداد روز تا ۵۰ درصد گل‌دهی و تعداد روز تا رسیدگی شد. بنابراین صفات اخیر می‌توانند در گزینش ژنوتیپ‌های فسفر-کارا مؤثر باشند. ژنوتیپ‌هایی که ضمن داشتن مقدار بالای میانگین صفات، کمترین کاهش را در مقایسه دو شرایط تنش کمبود فسفر و نرمال نشان دهند به‌طور بالقوه ژنوتیپ‌های فسفر-کارا خواهند بود. Mehrvarz *et al.* (۲۰۰۸) در مطالعات خود افزایش معنی‌دار وزن خوشه جو با کاربرد ۳۰ و ۶۰ کیلوگرم در هکتار سوپر فسفات تریپل را گزارش کردند. Zaki *et al.* (۲۰۱۲) نیز افزایش ارتفاع فلفل دلمه‌ای را در نتیجه کاربرد کود فسفر گزارش نمودند.

تجزیه ساختار جمعیت

میزان دامنه میزان اطلاعات چند شکل (PIC) در لاین‌های مورد مطالعه بین ۰/۰۵۵ برای آغازگر ORS718 تا ۰/۶۸۷ برای آغازگر HA3040 متغیر بود. میانگین PIC در لاین‌های مورد مطالعه ۰/۳۴۴ بود. میزان اطلاعات چند شکل برای تک تک آغازگرهای مورد مطالعه در Sahranavard- *et al.* Azartamar (۲۰۱۶) ارایه شده است. در تجزیه ساختار جمعیت بر اساس داده‌های نشانگرهای SSR، دو زیر جمعیت احتمالی ($K=2$) در پانال ارتباطی مورد مطالعه شناسایی شد (شکل ۲). بر اساس نتایج ارائه شده در باریلات (شکل ۳)، در مجموع ۷۵ درصد از افراد مورد مطالعه دارای درصد عضویت بیشتر و مساوی ۰/۷ و ۲۵ درصد افراد دارای سهم عضویت کمتر از ۰/۷ می‌باشند. با احتمال بیشتر از ۷۰ درصد، عضویت ۳۶ فرد متعلق به زیر ساختار قرمز و ۳۰ فرد متعلق به زیر

MCMC^۱ استفاده گردید تا نمودار حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیرجمعیت‌ها) یک ماتریس به نام Qst محاسبه می‌کند که شامل ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ به هر یک از زیرجمعیت‌ها است. برای تعیین تعداد بهینه K یا همان تعداد زیرجمعیت‌ها، از روش Evanno *et al.* (۲۰۰۵) استفاده شد. این روش بر پایه آماره ΔK است که شیب تابع احتمال را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی در آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد. ماتریس روابط خویشاوندی بر اساس داده‌های ریزماهواره و میزان عدم تعادل پیوستگی بین جفت نشانگرهای ریزماهواره با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 3.0 محاسبه شد. شناسایی ارتباط نشانگر-صفت با مدل خطی مخلوط (MLM) و با در نظر گرفتن ماتریس Q+K (ماتریس ضرایب ساختارجمعیت + ماتریس روابط خویشاوندی؛ جهت جلوگیری از ارتباط کاذب بین نشانگر-صفت) به عنوان کواریت در مدل، با نرم‌افزار TASSEL 3.0 انجام گرفت.

نتایج و بحث

میانگین و درصد تغییرات صفات در شرایط فراهمی و کمبود فسفر خاک

نتایج نشان داد میانگین همه‌ی صفات از جمله قطر ساقه، عرض برگ، سطح برگ، قطر طبق، میزان کلروفیل و وزن هزاردانه در شرایط کمبود فسفر در مقایسه با شرایط بهینه کاهش یافته است که نشان می‌دهد کمبود فسفر روی همه صفات مورد بررسی تأثیر منفی گذاشته است. کمترین تأثیر کمبود فسفر (درصد تغییرات صفات نسبت به شرایط بهینه) در

1. Markov Chain Monte Carlo; MCMC
2. Mixed linear model; MLM

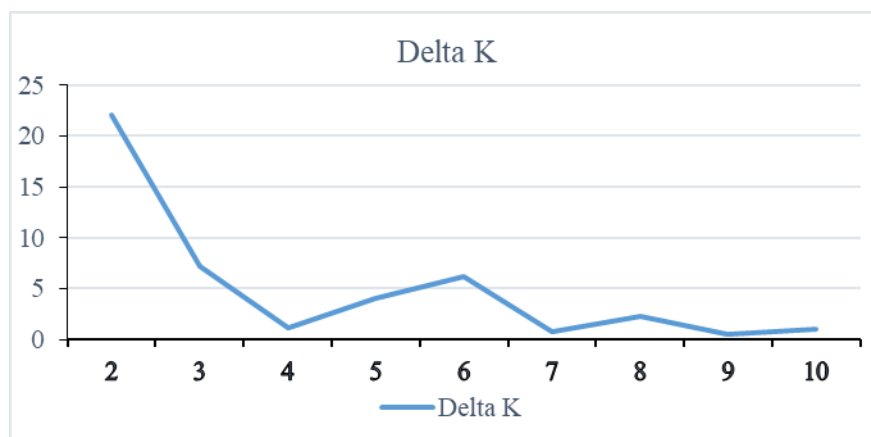
می‌باشد و در صورتی که اثر عوامل ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی به عنوان کوواریت در تجزیه ارتباط لحاظ نشوند، نتایج مثبت کاذب بوجود خواهد آمد و اشتباه نوع اول افزایش خواهد یافت (Breseghello and Sorrells, 2006).

ساختار سبز می‌باشد. در مطالعات تجزیه ارتباط الزاماً از جمعیت‌های طبیعی استفاده می‌شود و در حالت ایده‌آل نباید ساختاری در جمعیت مورد مطالعه وجود داشته باشد زیرا وجود ساختار در جمعیت مورد مطالعه عامل بازدارنده در جهت دستیابی به نتایج قابل اعتماد

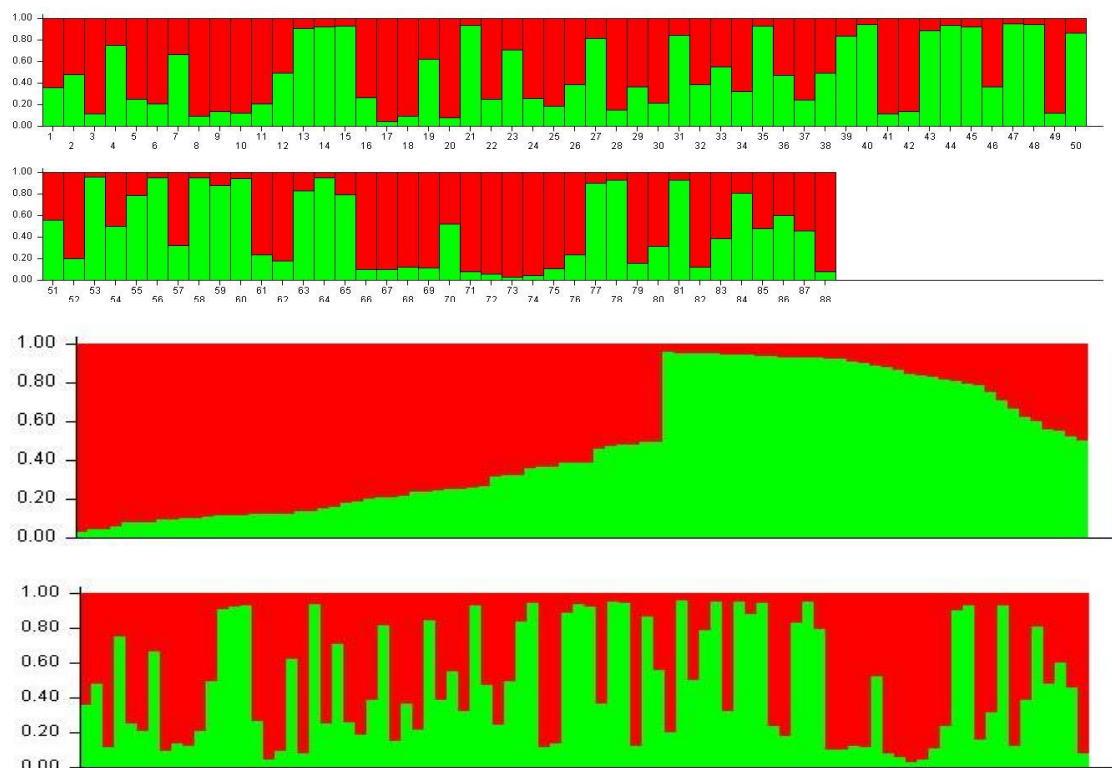
جدول ۱. میانگین و درصد تغییرات صفات گیاهی در ژنوتیپ‌های آفتابگردان روغنی تحت شرایط بهینه و کمبود فسفر

درصد تغییرات ^۱	شرایط کمبود فسفر	شرایط بهینه	مخفف	صفات
-7.76	70.33	65.27	Day to flowering (DF)	تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی
11.70	17.38	19.68	Number of leaf (N_leaf)	تعداد برگ
16.96	36.18	43.57	Chlorophyll rate (Chlo)	میزان کلروفیل
7.43	8.62	9.31	Petiol length (PL)	طول دمبرگ (cm)
1.37	25.39	25.74	Canopy temperature (Canopy_Temp)	دمای کانوپی (°C)
13.89	101.60	117.99	Plant height (PH)	ارتفاع بوته (cm)
19.57	14.18	17.63	Stem diameter (Stem_D)	قطر ساقه (mm)
10.61	13.92	15.57	Leaf length (L_lenght)	طول برگ (mm)
18.52	10.78	13.23	Leaf wide (L_wide)	عرض برگ (mm)
18.60	11917.54	14641.25	Leaf area (LA)	سطح برگ (cm ²)
5.73	72.59	77.01	Relative water content (RWC)	محتوای رطوبت نسبی آب برگ
-4.56	127.54	121.97	Day to maturity (DM)	تعداد روز روز تا رسیدگی
3.81	120.26	125.03	Leaf angle (L_angle)	زاویه‌ی برگ (درجه)
17.41	10.17	12.32	Head diameter (HD)	قطر طبق (cm)
27.08	0.08	0.11	Plant weight (P_weight)	وزن خشک بوته (g)
16.24	50.11	59.82	1000 grain weight (GW1000)	وزن هزار دانه (g)
43.20	15.35	27.03	Yield	عملکرد دانه (g)
38.76	14.05	22.94	Head wieght (H_weight)	وزن طبق خالی (g)
46.47	0.05	0.09	Phosphorous (%P)	درصد فسفر
11.72	34.79	39.40	%Oil	درصد روغن

$$D = \frac{\bar{X}_{Normal} - \bar{X}_{Biotic}}{\bar{X}_{Normal}} \times 100 \quad .1$$



شکل ۲. نمودار تعیین ساختار جمعیت با نرم‌افزار Structure 2.3.4، محور عمودی شاخص Delta K و محور افقی تعداد زیر جمعیت فرضی بر اساس داده‌های نشانگرهای میکروستلایت (SSR) را نشان می‌دهد.



شکل ۳. گروپندی افراد جمعیت بر اساس داده‌های میکروستلایت (SSR) با استفاده از مدل Bayesian در نرم‌افزار Structure 2.3.4 (K=۲). هر رنگ یک زیر جمعیت را نشان می‌دهد. اعداد روی محور افقی و عمودی به ترتیب شماره افراد و ضریب تعلق هر فرد به کلاستر یا زیرجمعیت را نشان می‌دهد.

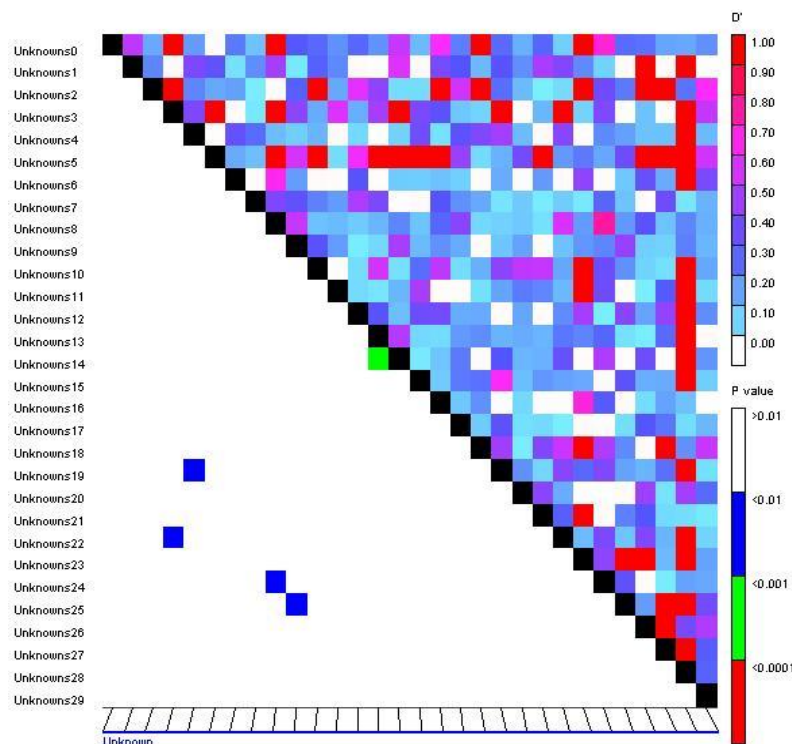
گیاهان، بسته به گونه و نوع جمعیت مورد بررسی، از صدها جفت باز تا صدها جفت کیلو باز مشاهده شده است. در جمعیت‌های مصنوعی اصلاحی، تنها عامل ایجادکننده عدم تعادل، پیوستگی ژنی به علت نزدیکی فیزیکی ژن‌ها بر روی کروموزوم‌ها است، ولی در جمعیت‌های طبیعی، عدم تعادل پیوستگی می‌تواند توسط عوامل دیگری غیر از پیوستگی ژنی مانند ساختار و خویشاوندی افراد در جمعیت، جهش، مهاجرت، گزینش و رانده شدگی ژنتیکی طی دوره‌ی تکامل یک جمعیت به وجود آید (Oraguzie *et al.*, 2007). پیوستگی زیاد بین دو ژن (آلل) باعث ایجاد سطح بالایی از عدم تعادل پیوستگی می‌شود. عواملی مانند جهش جدید، خودگشنی، ساختار جمعیت، روابط خویشاوندی افراد، رانش ژنتیکی و انتخاب (طبیعی،

عدم تعادل پیوستگی

از ۴۳۵ مقایسه ممکن بین مکان‌های میکروستلایت (SSR)، ۱/۱۵ درصد در سطح احتمال یک درصد در عدم تعادل پیوستگی بودند (شکل ۴). در نقشه‌یابی که مکان‌یابی QTL‌ها بر اساس عدم تعادل پیوستگی صورت می‌گیرد، علاوه بر ترکیب ساختار جمعیت، گستره عدم تعادل پیوستگی (LD) در ژنوم نیز از اهمیت بالایی برخوردار است (Al-Maskri *et al.*, 2012). عدم تعادل پیوستگی نشان‌دهنده همبستگی غیرتصادفی آلل‌ها در مکان‌های ژنی مختلف روی یک کروموزوم (گروه پیوستگی) یا کروموزوم‌های مختلف است. درجه و قدرت وضوح نقشه‌یابی به دامنه LD بستگی دارد (Remington *et al.*, 2001). گستره عدم تعادل پیوستگی در

و دگرگشتی باعث کاهش میزان عدم تعادل پیوستگی می‌شوند (Oraguzie *et al.*, 2007).

مصنوعی و متعادل کننده) باعث افزایش و عواملی مانند نوترکیبی بالا، نرخ جهش، جهش‌های تکراری



شکل ۴. پلات عدم تعادل پیوستگی (LD plot) بین جفت مکان‌های میکروستلایت (SSR)، در ژنوتیپ‌های آفتابگردان با استفاده از نرم افزار TASSEL 3.0. بالای قطر نشان‌دهنده میزان عدم تعادل پیوستگی با استفاده از آماره D' و پایین قطر P-value عدم تعادل پیوستگی برای جفت مکان‌ها را نشان می‌دهد.

تجزیه ارتباطی صفات

تجزیه ارتباط بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM) با لحاظ کردن دو ماتریس Q (ماتریس ساختار جمعیت) و K (ماتریس روابط خویشاوندی) به عنوان کوواریت در نرم‌افزار TASSEL3.0 انجام گرفت (Xu *et al.*, 2000; Zhao and Zhao, 2007). اساس نتایج حاصل از تجزیه ارتباطی تحت شرایط بهینه فسفر (نرمال)، ۱۷ ارتباط نشانگر-صفت شناسایی شد (جدول ۲) که از این تعداد، یک نشانگر با صفت وزن هزاردانه (P996)، چهار نشانگر با صفت سطح برگ (P621، P608، P718، P807)، یک نشانگر با صفت زاویه برگ (P307)، دو نشانگر با صفت تعداد برگ (P608 و P878)، یک نشانگر با صفت درصد روغن (P608)، دو نشانگر با صفت درصد فسفر (P621 و P1179)، دو نشانگر با صفت

روز تا گلدهی (P1264 و P1265)، یک نشانگر با صفت قطر طبق (P609)، یک نشانگر با صفت وزن بوته (P608) و دو نشانگر با صفت ارتفاع بوته (P621 و P878) پیوسته بودند. نشانگر P608 به‌طور مشترک برای صفات سطح برگ، تعداد برگ، درصد روغن و وزن بوته، نشانگر P621 به‌طور مشترک برای صفات سطح برگ، درصد فسفر و ارتفاع بوته و نشانگر P878 به‌طور مشترک برای صفات تعداد برگ و ارتفاع بوته شناسایی شدند. در تجزیه ارتباطی صفات با مدل خطی مخلوط در شرایط کمبود فسفر ۱۷ ارتباط نشانگر-صفت شناسایی شد (جدول ۲). از این تعداد، یک نشانگر با صفت سطح برگ (P807)، دو نشانگر با صفت زاویه‌ی برگ (P718 و P878)، دو نشانگر با صفت تعداد برگ (P608 و P718)، یک نشانگر با صفت

با صفت دمای کانوپی (P1242 و P949) و یک نشانگر با صفت میزان کلروفیل (P822) پیوسته بودند. نشانگر P378 به‌طور مشترک برای صفات ارتفاع بوته و وزن بوته و نشانگر P608 به‌طور مشترک برای صفات عرض برگ، تعداد برگ، درصد روغن و وزن بوته شناسایی شدند (جدول ۲).

درصد روغن (P608)، یک نشانگر با صفت درصد فسفر (P307)، دو نشانگر با صفت وزن بوته (P608 و P378)، یک نشانگر با صفت ارتفاع بوته (P378)، یک نشانگر با صفت روز تا رسیدگی (P1256)، دو نشانگر با صفت طول دمبرگ (P1215 و P728)، یک نشانگر با صفت عرض برگ (P608)، دو نشانگر

جدول ۲. نشانگرهای میکروستلایت (SSR)، شناسایی شده برای صفات ارزیابی‌شده در آفتابگردان روغنی در شرایط بهینه فسفر (نرمال) و شرایط کمبود فسفر با مدل خطی مخلوط

صفات		شرایط بهینه فسفر (نرمال)				شرایط کمبود فسفر			
		نشانگر	F	P-value	R ² Marker	نشانگر	F	P-value	R ² Marker
وزن هزار دانه	GW1000	P996	4.35	0.017152	0.11				
سطح برگ	LA	P807	3.34	0.040716	0.08	P807	3.63	0.031081	0.09
		P718	4.05	0.047967	0.06				
		P608	4.55	0.036236	0.06				
		P621	4.32	0.016961	0.11				
زاویه‌ی برگ	angle_L	P307	3.23	0.016872	0.16	P878	3.36	0.040546	0.09
						P718	4.29	0.042057	0.05
تعداد برگ	leaf_N	P878	3.63	0.031744	0.10	P718	5.74	0.019264	0.08
		P608	4.68	0.033749	0.06	P608	4.57	0.035715	0.06
درصد روغن	%Oil	P608	4.76	0.032297	0.07	P608	6.01	0.016546	0.07
درصد فسفر بوته	%P	P621	3.63	0.031566	0.10	P307	2.95	0.025567	0.15
		P1179	4.05	0.047948	0.06				
روز تا گلدهی	DF	P1264	3.59	0.033782	0.12				
		P1265	3.13	0.049301	0.07				
قطر طبق	HD	P609	4.04	0.021729	0.12				
وزن بوته	P_weight	P608	4.31	0.041332	0.06	P608	5.59	0.020672	0.08
						P378	3.48	0.037054	0.10
ارتفاع بوته	PH	P621	3.31	0.042206	0.09	P378	3.64	0.032086	0.12
		P878	3.20	0.04698	0.09				
روز تا رسیدگی	DM					P1256	4.06	0.04729	0.05
طول دمبرگ	PL					P1215	4.60	0.035214	0.06
						P728	3.40	0.039384	0.09
عرض برگ	L_wide					P608	5.47	0.022069	0.07
دمای کانوپی	Canopy_Temp					P1242	6.22	0.014971	0.08
						P949	4.53	0.013859	0.11

al., 2008, 2009, 2011; Chen and Xu, 2011a, 2011b; Qin *et al.*, 2011; Qiu *et al.*, 2014) و B73×Mo17 (Kaeppler *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2005a, 2005b, 2006) در ذرت، DOR364 × G19833 در لوبیا (Liao and Yan, 2000; Yan *et al.*, 2001, 2004; Liao Bogao × *et al.*, 2004; Beebe *et al.*, 2006 Cui *et al.*, 2007; Nannong-94-156 در سویا (Zhang *et al.*, 2009, 2010b, 2014b, 2016a, 2017a) و Eyou Changjia × B104-2 (Yang *et al.*, 2010, 2011; Ding *et al.*, 2012 Shi *et al.*, 2013a,) Tapidor×Ningyou7 (Zhang *et al.*, 2013b; Zhang *et al.*, 2016b) در کلزا برای مکان‌یابی ژن‌های صفات مرتبط با فسفر-کارایی استفاده شده است. در سال‌های اخیر، جمعیت‌های نقشه‌یابی ارتباطی متشکل از تعداد زیادی توده با تنوع ژنتیکی گسترده در تجزیه و تحلیل ارتباط ژنوم گسترده صفات مرتبط با کارایی فسفر در گندم (Zhang *et al.*, 2013b)، برنج (Wissuwa *et al.*, 2015)، سویا (Ning *et al.*, 2016) و کلزا (Wang *et al.*, 2017) استفاده شده است. به طور کلی برای مکان‌یابی ارتباطی دو روش GLM و MLM پیشنهاد شده است، که امروزه روش آماری MLM به طور گسترده‌ای برای تجزیه ارتباط در گیاهان استفاده می‌شود (Ghavami *et al.*, 2011). در مدل خطی عمودی (GLM) تنها ساختار جمعیت، ولی در مدل خطی مخلوط (MLM) علاوه بر ماتریس ساختار جمعیت (Q)، ماتریس روابط خویشاوندی (K) بین افراد جمعیت نیز در تجزیه ارتباط بعنوان کواریت در نظر گرفته می‌شوند، بنابراین ارتباطات و پیوستگی‌های دروغین بین نشانگر و صفت به حداقل می‌رسد. Yu and Buckler (۲۰۰۶) در مطالعات خود با کاربرد مدل MLM

نشانگرهای مشترک بین صفات در هر یک از می‌تواند ناشی از پلیوتروپی یا پیوستگی بین ژن‌های کنترل کننده صفات باشد. این مهم انتخاب بر اساس نشانگر را تسهیل می‌کند چرا که به دلیل پاسخ‌های همبسته، انتخاب با یک نشانگر؛ همزمان نمود فنوتیپی هر دو صفت را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Ahmadpour *et al.*, 2018). با مقایسه دو شرایط بهینه و کمبود فسفر، نشانگرهای P608، P807، P307، P718 و P878 به طور مشترک برای صفات شناسایی شدند این نشانگرها دارای اثر متقابل کمتری با شرایط محیطی می‌باشند (نشانگرهای پایدار)؛ بنابراین گزینش با آنها برای صفتی در شرایط نرمال، باعث بهبود صفت در شرایط تنش نیز خواهد شد (جدول‌های ۲ و ۳).

در این مطالعه، به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با برخی صفات مهم زراعی-مورفولوژیک مورد ارزیابی در ژنوتیپ‌های آفتابگردان روغنی، تجزیه ارتباط بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM) وابسته به مدل Q+K استفاده گردید. در تجزیه ارتباطی صفات بر اساس نشانگرهای SSR با استفاده از مدل خطی مخلوط ۱۷ مکان SSR در هر یک از شرایط بهینه و کمبود فسفر با صفات مورد مطالعه پیوسته بودند. شناسایی مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات کمی برای صفات هدف، یک گام کلیدی برای افزایش کارایی فسفر در محصولات زراعی است. مکان‌های ژنی زیادی شناسایی شده‌اند که بر کارایی فسفر در محصولات مهم تأثیر می‌گذارند، اما متأسفانه تعداد کمی از ژن‌های علی‌شناسایی شده‌اند. به همین خاطر توسعه وارثه‌های فسفر-کارا از طریق انتخاب به کمک نشانگر پیشرفت زیادی نداشته است. بعضی جمعیت‌های نقشه، از قبیل Nipponbare × Kasalath در برنج (Chen *et al.*, 1998, 2002) 082×Ye107

کننده صفات مرتبط با کارایی فسفر، از اطلاعات در دسترس توالی کامل ژنوم آفتابگردان که مبنایی برای طراحی و توسعه نشانگرهای SNP است در ترکیب با نقشه‌های پیوستگی کلاسیک، تجزیه ارتباطی، QTL-seq، علم ترنسکرپتوم و فن‌آوری‌های ویرایش ژن برای کلون‌سازی و تأیید ژن‌های مرتبط با صفات کارایی فسفر استفاده نموده و فرآیند شناسایی ژن را تسریع بخشید. آگاهی از این ژن‌ها در آشکارسازی مکانیسم‌های مولکولی اساسی دخیل در کارایی فسفر مهم بوده و فرصتی را برای بهبود کارایی جذب و استفاده فسفر توسط گیاه از طریق انتخاب به کمک نشانگر یا دستکاری ژن فراهم خواهد نمود.

گیاه ذرت، بهبود معنی‌داری در کاهش نتایج مثبت دروغین در بررسی صفاتی مانند زمان گلدهی، وزن خوشه و قطر خوشه در مقایسه با مدل‌های خطی منفرد K یا Q نشان داده‌اند.

نتایج بدست آمده از این مطالعه، اطلاعات ارزشمندی در زمینه گزینش به کمک نشانگر و مبنای ژنتیکی صفات مورد مطالعه در شرایط تنش کمبود فسفر ارائه می‌دهد که می‌توان از این اطلاعات در گزینش افراد طی برنامه‌های به‌نژادی و تولید لاین‌های خالص در جهت تحقق تولید ارقام هیبرید جدید آفتابگردان با میزان عملکرد بالا و کارایی فسفر بالا بهره برد. در ادامه در نظر است به منظور فایز آمدن بر چالش اصلی شناسایی ژن‌های خاص کنترل

REFERENCES

- 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.
- Al-Maskri AY, Sajjad M, Khan SH (2012) Association Mapping: A Step Forward to Discovering New Alleles for Crop Improvement. *International Journal of Agriculture & Biology* 14(1).
- Andaya VC, Tabanao D, Maramara G, Sebastian LS (1996) Correlation of molecular diversity with heterosis in nine lowland rice. *Philippine Journal of Crop Science (Philippines)*.
- Anonymous (2010) *Agribusiness handbook: sunflower crude and refined oil*. FAO/EBRD pp. 5-14.
- Azizi H, Aalami A, Esfahani M, Ebadi AA (2017) Association and structure analysis of some of rice (*Oryza sativa* L.) genetic resources based on microsatellite markers. *Cereal Research* 7(1): 1-16.
- Bazin J, Langlade N, Vincourt P, Arribat S, Balzergue S, El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C (2011) Targeted mRNA oxidation regulates sunflower seed dormancy alleviation during dry after-ripening. *The Plant Cell* 23(6): 2196-2208.
- Beebe SE, Rojas-Pierce M, Yan X, Blair MW, Pedraza F, Muñoz F, Tohme J, Lynch JP (2006) Quantitative trait loci for root architecture traits correlated with phosphorus acquisition in common bean. *Crop Science* 46: 413-423.
- Breseghele F, Sorrells ME (2006) Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics* 172(2): 1165-1177.
- Bulgarelli D, Schlaeppli K, Spaepen S, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology* 64: 807-838.
- Bhutta AR (1998) *Biological studies on some fungi associated with sunflower in Pakistan (Doctoral dissertation, Sindh Agriculture University, Tando Jam)*.

- Chen J, Xu L (2011a) Comparative mapping of QTLs for H⁺ secretion of root in maize (*Zea mays* L.) and cross phosphorus levels on two growth stages. *Frontiers of Agriculture in China* 5: 284-290.
- Chen J, Xu L (2011b) The candidate QTLs affecting phosphorus absorption efficiency and root weight in maize (*Zea mays* L.). *Frontiers of Agriculture in China* 5: 456-462.
- Chen J, Xu L, Cai Y, Xu J (2008) QTL mapping of phosphorus efficiency and relative biologic characteristics in maize (*Zea mays* L.) at two sites. *Plant and Soil* 313:251-266.
- Chen J, Xu L, Cai Y, Xu J (2009) Identification of QTLs for phosphorus utilization efficiency in maize (*Zea mays* L.) across P levels. *Euphytica* 167: 245-252.
- Chen J, Cai Y, Xu L, Wang J, Zhang W, Wang G, Xu D, Chen T, Lu X, Sun H, Huang A, Liang Y, Dai G, Qin H, Huang Z, Zhu Z, Yang Z, Xu J, Kuang S (2011) Identification of QTLs for biomass production in maize (*Zea mays* L.) under different phosphorus levels at two sites. *Frontiers of Agriculture in China* 5:152-161.
- Cheng L, Bucciarelli B, Liu J, Zinn K, Miller S, Patton-Vogt J, Allan D, Shen J, Vance CP (2011) White lupin cluster root acclimation to phosphorus deficiency and root hair development involve unique glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Plant Physiology* 156: 1131-1148.
- Cordell D, Drangert JO, White S (2009) The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19: 292-305.
- Cui SY, Geng LY, Meng QC, Yu DY (2007) QTL mapping of phosphorus deficiency tolerance in soybean (*Glycine max* L.) during seedling stage. *Acta Agronomica Sinica* 33: 378-383.
- De Wan A, Liu M, Hartman S, Zhang SSM, Liu DT, Zhao C, ..., Barnstable C (2006) HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science*, 314(5801): 989-992.
- Ding G, Zhao Z, Liao Y, Hu Y, Shi L, Long Y, Xu F (2012) Quantitative trait loci for seed yield and yield-related traits, and their responses to reduced phosphorus supply in *Brassica napus*. *Annals of Botany* 109:747-759.
- Doerge RW (2002) Multifactorial genetics: Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Reviews Genetics* 3(1): 43.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology Notes* 14(8): 2611-2620.
- Fernandez P, Soria M, Blesa D, Di Rienzo J, Moschen S, Rivarola M, ..., Dosio G (2012) Development, characterization and experimental validation of a cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) gene expression oligonucleotide microarray. *PLoS One* 7(10): e45899.
- Foolad MR, Arulsekar S, Becerra V, Bliss FA (1995) A genetic map of Prunus based on an interspecific cross between peach and almond. *Theoretical and Applied Genetics* 91(2): 262-269.
- Ghanbari AA, Mousavi SH, Abbasian A, Keshavarz S (2015) Leaf morphophysiological characteristics of common bean under contrasting moisture regimes. *Iranian Journal of Field Crop Science* 46(2): 287-298.
- Ghavami F, Elias EM, Mamidi S, Ansari O, Sargolzaei M, Adhikari T, ..., Kianian SF (2011) Mixed model association mapping for Fusarium head blight resistance in Tunisian-derived durum wheat populations. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 1(3): 209-218.
- Hammond JP, White PJ (2008) Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany* 59: 93-109.
- Hawkesford M, Horst W, Kichey T,

- Lambers H, Schjoerring J, Skrumager Møller I, White P (2012) Functions of macronutrients. In: Marschner P (ed.) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, Third edn. Academic Press, London, pp 135-189.
- Kaeppeler SM, Parke JL, Mueller SM, Senior L, Stuber C, Tracy WF (2000) Variation among maize inbred lines and detection of quantitative trait loci for growth at low phosphorus and responsiveness to arbuscular mycorrhizal fungi. *Crop Science* 40: 358-364.
- Kochian LV (2012) Plant nutrition: rooting for more phosphorus. *Nature* 488: 466-467.
- Lapis-Gaza HR, Jost R, Finnegan PM (2014) Arabidopsis PHOSPHATE TRANSPORTER1 genes PHT1;8 and PHT1;9 are involved in root-to-shoot translocation of orthophosphate. *BMC Plant Biology* 14: 334.
- Li Y, Zhang J, Zhang X, Fan H, Gu M, Qu H, Xu G (2015) Phosphate transporter OsPht1;8 in rice plays an important role in phosphorus redistribution from source to sink organs and allocation between embryo and endosperm of seeds. *Plant Science* 230: 23-32.
- Liao H, Yan X (2000) Molecular mapping of QTLs conferring root architecture of common bean in response to phosphorus deficiency. *Journal of Agriculture Biotechnology* 8: 67-70.
- Liu F, Xu Y, Jiang H, Jiang C, Du Y, Gong C, Wang W, Zhu S, Han G, Cheng B (2016) Systematic identification, evolution and expression analysis of the *Zea mays* PHT1 gene family reveals several new members involved in root colonization by Arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 930.
- Liao H, Yan X, Rubio G, Beebe SE, Blair MW, Lynch JP (2004) Genetic mapping of basal root gravitropism and phosphorus acquisition efficiency in common bean. *Functional Plant Biology* 31: 959-970.
- Lambers H, Clements JC, Nelson MN (2013) How a phosphorus acquisition strategy based on carboxylate exudation powers the success and agronomic potential of lupines (*Lupinus*, Fabaceae). *American Journal of Botany* 100: 263-288.
- López-Arredondo DL, Leyva-González MA, González-Morales SI, López-Bucio J, Herrera-Estrella L (2014) Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. *Annual Review of Plant Biology* 65: 95-123.
- Lynch JP (2011) Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. *Plant Physiology* 156: 1041-1049.
- Maccaferri M, Sanguineti MC, Demontis A, El-Ahmed A, Garcia del Moral L, Maalouf F, Nachit M, Nserallah N, Ouabbou H, Rhouma S, Royo C, Villegas D, Tuberosa R (2011) Association mapping in durum wheat grown across a broad range of water regimes. *Journal of Experimental Botany* 14: 287-293.
- Mauricio R (2001) Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. *Nature Reviews Genetics* 2(5): 370.
- Marschner H (1986) Mineral nutrition of higher plants. Academic press Inc. New York, 674p.
- Mehrvarz S, Chaich MR, Alikhani HA (2008) Effects of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on yield and yield components of Barely (*Hordeum vulgare* L.). *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environment Science* 3: 822-828.
- Najafzadeh R, Darvishzadeh R, Musa-Khalifani Kh, Abrinbana M, Alipour H (2018) Retrotransposonable regions of sunflower genome having relevance with resistance to *Sclerotinia* species: *S. sclerotiorum* and *S. minor*. *Australasian Plant Pathology* 47: 511-519.
- Ning L, Kan G, DuW, Guo S, Wang Q,

- Zhang G, Cheng H, Yu D (2016) Association analysis for detecting significant single nucleotide polymorphisms for phosphorus-deficiency tolerance at the seedling stage in soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. *Breeding Science* 66: 191-203.
- Oraguzie NC, Gardiner SE, Rikkerink EH, Silva HN (2007) Association mapping in plants: New York: Springer.
- Pasam RK, Sharma R, Malosetti M, van Eeuwijk FA, Haseneyer G, Kilian B, Graner A (2012) Genome-wide association studies for agronomical traits in a worldwide spring barley collection. *BMC Plant Biology* 12(1): 16.
- Plaxton WC, Tran HT (2011) Metabolic adaptations of phosphatstarved plants. *Plant Physiology* 156: 1006-1015.
- Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P (2000) Association mapping in structured populations. *American Journal of Human Genetics* 67 (1):170-181.
- Qin H, Cai Y, Sun H, Wang J, Wang G, Liu Z (2011) QTL mapping of root exudates related to phosphorus efficiency in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Agriculture Biotechnology* 19: 93-101.
- Qiu H, Liu C, Yu T, Mei X, Wang G, Wang J, Cai Y (2014) Identification of QTL for acid phosphatase activity in root and rhizosphere soil of maize under low phosphorus stress. *Euphytica* 197: 133-143.
- Rafalski A (2002) Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology* 5(2): 94-100.
- Remington DL, Thornsberry JM, Matsuoka Y, Wilson LM, Whitt SR, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES (2001) Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(20): 11479-11484.
- Sahranavard-Azartamar F, Ghadimzadeh M, Darvishzadeh R (2016) Genetic diversity and structure analysis of oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) based on microsatellit markers. *Journal of Plant Genetic Research* 2(2): 15-32.
- Sahranavard-Azartamar, F., Darvishzadeh, R., Ghadimzadeh, M., Azizi, H. and Aboulghasemi, Z. (2015). Identification of SSR loci related to some important agromorphological traits in different oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines using association mapping. *Crop Biotechnology*, 10: 73-87.
- Sepehr E, Malakouti MJ, 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.
- Sharfun-Nahar MM, Hashmi MH (2005) Seed-borne mycoflora of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pakistan Journal of Botany* 37: 451- 457.
- Shi L, Shi T, Broadley MR, White PJ, Long Y, Meng J, Xu F, Hammond JP (2013a) High-throughput root phenotyping screens identify genetic loci associated with root architectural traits in *Brassica napus* under contrasting phosphate availabilities. *Annals of Botany* 112: 381-389.
- Shi T, Li R, Zhao Z, Ding G, Long Y, Meng J, Xu F, Shi L (2013b) QTL for yield traits and their association with functional genes in response to phosphorus deficiency in *Brassica napus*. *PLoS One* 8: e54559.
- Soleimani Gezeljeh A, Darvishzadeh R, Ebrahimi A and Bihanta MR (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* <https://doi.org/10.1007/s12041-018-0901-4>.

- Stutter MI, Shand CA, George TS, Blackwell MSA, Bol R, MacKay RL, Richardson AE, Condrón LM, Turner BL, Haygarth PM (2012) Recovering phosphorus from soil: a root solution? *Environmental Science & Technology* 46: 1977-1978.
- Thirumarimurugan M, Sivakumar VM, Xavier AM, Prabhakaran D, Kannadasan T (2012) Preparation of biodiesel from sunflower oil by transesterification. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* 2(6): 441.
- Tiessen H (2008) Phosphorus in the global environment. In: White PJ, Hammond JP (eds.) *The ecophysiology of plant phosphorus interactions*. Springer, Dordrecht, pp 1-7.
- Van Kauwenbergh SJ (2010) World phosphate rock reserves and resources. International Fertilizer Development Center, Muscle Shoals, Alabama 35662, USA. ISBN 978-0-88090-167-3.
- Veneklaas EJ, Lambers H, Bragg J, Finnegan PM, Lovelock CE, Plaxton WC, Price CA, Scheible WR, Shane MW, White PJ, Raven JA (2012) Opportunities for improving phosphorus use efficiency in crop plants. *New Phytologist* 195: 306-320.
- Vanitha, J., Manivannan, N. and Chandirakala, R. (2014). Qualitative trait loci analysis for seed yield and component traits in sunflower. *African Journal of Biotechnology*, 13: 754-761
- Walder F, Brulé D, Koegel S, Wiemken A, Boller T, Courty PE (2015) Plant phosphorus acquisition in a common mycorrhizal network: regulation of phosphate transporter genes of the Pht1 family in sorghum and flax. *New Phytologist* 205: 1632-1645.
- Wang X, Yan X, Liao H (2010a) Genetic improvement for phosphorus efficiency in soybean: a radical approach. *Annals of Botany* 106: 215-222.
- Wang X, Chen Y, Thomas CL, Ding G, Xu P, Shi D, Grandke F, Jin K, Cai H, Xu F, Yi B, Broadley MR, Shi L (2017) Genetic variants associated with the root system architecture of oilseed rape (*Brassica napus* L.) under contrasting phosphate supply. *DNA Research* 24: 407-417.
- Wasaki J, Shinano T, Onishi K, Yonetani R, Yazaki J, Fujii F, Shimbo K, Ishikawa M, Shimatani Z, Nagata Y, Hashimoto A, Ohta T, Sato Y, Miyamoto C, Honda S, Kojima K, Sasaki T, Kishimoto N, Kikuchi S, Osaki M (2006) Transcriptomic analysis indicates putative metabolic changes caused by manipulation of phosphorus availability in rice leaves. *Journal of Experimental Botany* 57: 2049-2059.
- White PJ, Broadley MR, Gregory PJ (2012) Managing the nutrition of plants and people. *Applied and Environmental Soil Science* 2012: 104826.
- White PJ, George TS, Gregory PJ, Bengough AG, Hallett PD, McKenzie BM (2013a) Matching roots to their environment. *Annals of Botany* 112:207-222.
- White PJ, George TS, Dupuy LX, Karley AJ, Valentine TA, Wiesel L, Wishart J (2013b) Root traits for infertile soils. *Frontiers in Plant Science* 4:193.
- 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.
- Wissuwa M, Wegner J, Ae N, Yano M (2002) Substitution mapping of Pup1: a major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus-deficient soil. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 890-897.
- Wissuwa M, Kondo K, Fukuda T, Mori A, Rose MT, Pariasca-Tanaka J, Kretschmar T, Haefele SM, Rose TJ (2015) Unmasking novel loci for internal phosphorus utilization efficiency in rice germplasm through

- genome-wide association analysis. *PloS One* 10: e0124215.
- Withers PJ, Sylvester-Bradley R, Jones DL, Healey JR, Talboys PJ (2014) Feed the crop not the soil: rethinking phosphorus management in the food chain. *Environmental Science & Technology* 48: 6523-6530.
- 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(3): 461-469.
- Yan X, Liao H, TrullMC, Beebe SE, Lynch JP (2001) Induction of a major leaf acid phosphatase does not confer adaptation to low phosphorus availability in common bean. *Plant Physiology* 125: 1901-1911.
- Yan X, Liao H, Beebe SE, Blair MW, Lynch JP (2004) QTL mapping of root hair and acid exudation traits and their relationship to phosphorus uptake in common bean. *Plant and Soil* 265: 17-29.
- Yang M, Ding G, Shi L, Feng J, Xu F, Meng J (2010) Quantitative trait loci for root morphology in response to low phosphorus stress in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 121: 181-193.
- Yang M, Ding G, Shi L, Xu F, Meng J (2011) Detection of QTL for phosphorus efficiency at vegetative stage in *Brassica napus*. *Plant and Soil* 339: 97-111.
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Bi IV, Yamasaki M, Doebley JF, ..., Kresovich S (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics* 38(2): 203.
- Yu J, Buckler ES (2006) Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology* 17(2): 155-160.
- Zaki MF, Fawzy ZF, Ahmed AA and Tantawy AS (2012). Application of phosphate dissolving bacteria for improving growth and productivity of two sweet peppers (*Capsicum annuum* L.) Cultivars under newly reclaimed soil. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 6: 826-839.
- Zeinalabedini M, Khayam-Nekoui M, Grigorian V, Gradziel TM, Martínez-Gómez P (2010) The origin and dissemination of the cultivated almond as determined by nuclear and chloroplast SSR marker analysis. *Scientia Horticulturae* 125(4): 593-601.
- Zeinalabedini M, Majourhat K, Khayam-Nekoui M, Grigorian V, Toorchi M, Dicenta F, Martinez-Gomez P (2007) Molecular characterization of almond cultivars and related wild species using nuclear and chloroplast DNA markers. *Journal of Food Agriculture and Environment* 5(3/4): 242.
- Zeng H, Wang G, Zhang Y, Hu X, Pi E, Zhu Y, Wang H, Du L (2016) Genome-wide identification of phosphate-deficiency responsive genes in soybean roots by high-throughput sequencing. *Plant and Soil* 398: 207-227.
- Zhang D, Cheng H, Geng L, Kan G, Cui S, Meng Q, Gai J, Yu D (2009) Detection of quantitative trait loci for phosphorus deficiency tolerance at soybean seedling stage. *Euphytica* 167: 313-322.
- Zhang D, Liu C, Cheng H, Kan G, Cui S, Meng Q, Gai J, Yu D (2010b) Quantitative trait loci associated with soybean tolerance to low phosphorus stress based on flower and pod abscission. *Plant Breeding* 129: 243-249.
- Zhang K, Wang J, Zhang L, Rong C, Zhao F, Peng T, Li H, Cheng D, Liu X, Qin H, Zhang A, Tong Y, Wang D (2013b) Association analysis of genomic loci important for grain weight control in elite common wheat varieties cultivated with variable water and fertiliser supply. *PLoS One* 8: e57853.
- Zhang J, Xiang C, Zhang J, Ren J, Liu Z, Wang C, Qu L, Shi Y (2014a) Mapping QTL controlling yield traits using low phosphorus tolerance selected backcrossing introgression lines of rice

- (*Oryza sativa* L.). Chinese Agricultural Science Bulletin 30: 56-65.
- Zhang D, Li H, Wang J, Zhang H, Hu Z, Chu S, Lv H, Yu D (2016a) High-density genetic mapping identifies new major loci for tolerance to low-phosphorus stress in soybean. *Frontiers in Plant Science* 7: 372.
- Zhang Y, Thomas CL, Xiang J, Long Y, Wang X, Zou J, Luo Z, Ding G, Cai H, Graham NS, Hammond JP, King GJ, White PJ, Xu F, Broadley MR, Shi L, Meng J (2016b) QTL meta-analysis of root traits in *Brassica napus* under contrasting phosphorus supply in two growth systems. *Scientific Reports* 6: 33113.
- Zhang D, Zhang H, Chu S, Li H, Chi Y, Triebwasser-Freese D, Lv H, Yu D (2017a) Integrating QTL mapping and transcriptomics identifies candidate genes underlying QTLs associated with soybean tolerance to low-phosphorus stress. *Plant Molecular Biology* 93: 137-150.
- Zhao JH, Zhou MF (2007) Neoproterozoic adakitic plutons and arc magmatism along the western margin of the Yangtze Block, South China. *The Journal of Geology* 115(6): 675-689.
- Zhu C, Gore M, Buckler ES, Yu J (2008) Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome* 1(1): 5-20.
- Zhu J, Kaeppeler SM, Lynch JP (2005a) Mapping of QTLs for lateral root branching and length in maize (*Zea mays* L.) under differential phosphorus supply. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 688-695.
- Zhu J, Kaeppeler SM, Lynch JP (2005b) Mapping of QTL controlling root hair length in maize (*Zea mays* L.) under phosphorus deficiency. *Plant and Soil* 270: 299-310.
- Zhu J, Mickelson SM, Kaeppeler SM, Lynch JP (2006) Detection of quantitative trait loci for seminal root traits in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under differential phosphorus levels. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1-10.