

تجزیه ارتباط برای مقاومت به بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی یقه ساقه در آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی REMAP

رقیه نجف‌زاده^۱، رضا درویش‌زاده^{۲*}، خدیجه موسی‌خلیفانی^۳، مسعود ابرین‌بنا^۴
 ۱. محقق پسادکتری، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه. ۱. محقق پسادکتری، بنیاد ملی
 نخبگان، تهران. ۲. استاد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه. ۲. استاد، پژوهشکده
 زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه، ارومیه. ۳. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی
 دانشگاه ارومیه، ارومیه. ۴. استادیار، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه.
 (تاریخ دریافت: ۹۵/۰۶/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۹)

چکیده

آفتابگردان یک محصول مهم زراعی می‌باشد که روغن آن ارزش غذایی و اقتصادی بالایی دارد. اسکروتینیا از بیماری‌های قارچی مهم آفتابگردان می‌باشد که باعث کاهش رشد و عملکرد می‌شود. در پژوهش حاضر واکنش ۱۰۰ لاین خالص آفتابگردان روغنی به ۶ جدایه قارچ اسکروتینیا مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی مکان‌های ژنی پیوسته با مقاومت به بیماری از ۱۲۰ جایگاه ژنومی، تکثیر شده توسط آغازگرهای رتروترانسپوزونی REMAP استفاده شد. نتایج نشان داد که برخی ژنوتیپ‌های آفتابگردان مقاومت خوبی به بیماری اسکروتینیا دارند. ژنوتیپ 8A×/LC1064C کمترین درصد آلودگی را در پاسخ به دو جدایه قارچی A37 (*S. sclerotiorum*) و M1 (*S. minor*) از دو گونه مختلف قارچ اسکروتینیا نشان داد. در تجزیه ساختار جمعیت با نرم‌افزار Structure ۴ زیرجمعیت احتمالی شناسایی شد. در تجزیه ارتباط با نرم‌افزار TASEEL به دو روش GLM و MLM به ترتیب ۹ و ۸ مکان ژنی شناسایی شد که ارتباط معنی‌داری ($P \leq 0.01$) با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به بیماری دارند. طبق نتایج، نشانگرهای CF-UBC826، 1061LTR-UBC818 و 1061LTR-UBC857 با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به دو جدایه قارچ عامل بیماری پیوسته بودند. نشانگرهای شناسایی شده در این تحقیق، در صورت تایید و تبدیل به نشانگر SCAR می‌توانند به‌طور موثری در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر و تولید ارقام مقاوم به بیماری اسکروتینیا مورد استفاده قرار بگیرند.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان روغنی، پوسیدگی اسکروتینیایی یقه ساقه، مقاومت کمی، مکان‌یابی ارتباطی و نشانگرهای مولکولی.

Association analysis for resistance to sclerotinia stem rot disease in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using retrotransposon-based REMAP markers

Roghayeh Najafzadeh¹, Reza Darvishzadeh^{2*}, Khadijeh Musa-Khalifani³, Masoud Abrinbana⁴

1. Postdoctoral Fellow, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. 1. Postdoctoral Fellow, National Elites Foundation, Tehran, Iran. 2. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. 2. Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran. 3. M.Sc Graduate, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. 4. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

(Received: September 15, 2016 - Accepted: March 10, 2019)

ABSTRACT

Sunflower is an important crop that its oil has nutritional and high economic value. Sclerotinia is important fungal disease of sunflower that reduces its growth and yield. In this study, the reaction of 100 oily sunflower lines was studied to 6 fungal isolate of sclerotinia disease. Identification of gene loci related to resistance for disease was done with 120 retrotransposon-based REMAP markers. The results showed that some sunflower genotypes had the good resistant to sclerotinia disease. 8A×/LC1064C genotype showed low necrosis percentage against two A37 (*S. sclerotiorum*) and M1 (*S. minor*) isolates. In population structure analysis, 4 subpopulations were identified (K=4) using STRUCTURE software. Furthermore, in association analysis based on general and mixed linear models (GLM and MLM) using TASEEL software, nine and eight loci were identified, respectively, that were significantly associated ($P \leq 0.01$) with resistance genes controlling Sclerotinia disease. According to the results, CF-UBC826, 1061LTR-UBC818 and 1061LTR-UBC857 markers were commonly related to the resistant genes to some fungal isolate. Identified markers after validation and transferring to SCAR markers can be used effectively in sunflower breeding programs for marker-assisted selection (MAS) and developing resistant cultivars to Sclerotinia disease.

Keywords: Association mapping (AM), Molecular markers, Oily sunflower, Quantitative resistance, Sclerotinia basal stem rot.

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

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) یکی از چهار محصول مهم زراعی می‌باشد که به‌خاطر روغن خوراکی کشت می‌شود. روغن آفتابگردان علاوه بر مصرف خوراکی، در مصارف صنعتی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Paniego *et al.*, 2007). میزان سطح زیرکشت جهانی آفتابگردان در سال ۲۰۱۶ حدود ۲۶/۳۴ میلیون هکتار و تولید آن ۴۷/۵۲ میلیون تن بوده است (FAO, 2016). *Sclerotinia* یکی از مهم‌ترین جنس‌های بیمارگر گیاهی شناخته شده است (Bolton *et al.*, 2006) و سه گونه *S. sclerotiorum*، *S. minor* و *S. trifoliorum* به‌علت انتشار گسترده، دامنه میزبانی وسیع و خسارت سنگین، مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین گونه‌های این جنس به‌شمار می‌روند (Saharan & Mehta, 2008). این بیمارگر در تمامی مراحل رشد آفتابگردان باعث پوسیدگی ریشه، ساقه، یقه و طبق می‌گردد و در شرایط آب و هوایی مساعد برای آن، خسارت زیادی به محصول وارد می‌کند (Amoozadeh *et al.*, 2015; Emamgholi *et al.*, 2015). اسکروتینیا از بیماری‌های قارچی مهم آفتابگردان در ایران می‌باشد که رشد و عملکرد محصول را کاهش می‌دهد (Ershad, 1995). شیوع و توسعه این بیماری در منطقه شمال‌غرب کشور باعث کاهش سطح زیرکشت این محصول شده است. وسعت خسارت در بعضی مواقع به حدی می‌رسد که از مزارع تحت کشت، عملاً محصولی برداشت نمی‌شود (Emamgholi *et al.*, 2015). استفاده از ارقام مقاوم، بهترین روش مقابله با بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی می‌باشد (Emamgholi *et al.*, 2015). مقاومت نسبی به اسکروتینیا در برخی ژنوتیپ‌های آفتابگردان (Godoy *et al.*, 2005)، لوبیا (Porter *et al.*, 2009)، نخود (Gilmore *et al.*, 2002)، بادام‌زمینی (Cruickshank *et al.*, 2002) و سویا (Hartman *et al.*, 2000) مشاهده شده است. تاکنون ژنوتیپی با مقاومت کامل به بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی در آفتابگردان گزارش نشده است و ژنوتیپ‌های مختلف این محصول، سطوح متفاوتی از مقاومت را در برابر بیماری نشان می‌دهند (Hahn, 2002). مقاومت به بیماری اسکروتینیا یک صفت کمی پیچیده (Mestries *et al.*, 1998) و چندژنی می‌باشد (Castaño *et al.*, 1993).

Gentzbittel *et al.*, 1998; Bert *et al.*, 2002, 2004; Fusari *et al.*, 2012). به‌دلیل پیچیدگی صفات کمی، به‌نژادگران گیاهی اطلاعات کمی از تعداد ژن‌ها و جایگاه کروموزومی آن‌ها در تظاهر و توزیع فنوتیپی یک صفت کمی دارند. نقشه‌یابی مکان‌های ژنی کمی (Quantitative trait loci) یکی از روش‌هایی است که در دهه اخیر برای مطالعه ژنتیکی صفات کمی توسعه یافته است (Lander & Botstein, 1989). به‌طور کلی برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی از دو روش نقشه‌یابی پیوستگی (Linkage mapping) و تجزیه ارتباطی (Association analysis) یا نقشه‌یابی عدم تعادل پیوستگی (Linkage disequilibrium mapping) استفاده می‌شود (Bressegello & Sorrells, 2006). شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی جهت استفاده در انتخاب به کمک نشانگر (Marker assisted selection) یکی از روش‌های نوین برای به‌نژادی گیاهان و تولید ارقام جدید می‌باشد (Collard *et al.*, 2005). در دهه گذشته تحقیقات بسیاری برای شناسایی ژن‌های مسئول تغییرات ژنتیکی صفات مهم زراعی با استفاده از نقشه‌یابی پیوستگی و نشانگرهای مولکولی در نسل‌های در حال تفرق صورت گرفته است؛ اما با توجه به وجود تنوع ژنتیکی طبیعی وسیع برای صفات کمی در ژرم‌پلاسماهای گیاهی، تجزیه ارتباطی جایگاه ویژه‌ای برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با عوامل ژنتیکی کنترل‌کننده صفات کمی پیدا کرده است؛ به‌گونه‌ای که هم‌اکنون مطالعات تجزیه ارتباط در سیستم‌های گیاهی در حال افزایش می‌باشد (Sahranavard Azartamar *et al.*, 2015; Jannatdoust *et al.*, 2015; Darvishzadeh *et al.*, 2008; Darvishzadeh, 2013; Saeed *et al.*, 2012). در این روش مجموعه بزرگی از افراد یک جمعیت به‌طور تصادفی جمع‌آوری شده و نقشه‌یابی بر اساس عدم تعادل لینکاژی انجام می‌شود (Roy *et al.*, 2006; Neale Savolainen., 2004; Darvishzadeh *et al.*, 2008; Poormohammad Kiani *et al.*, 2008; Saeed *et al.*, 2013). در این روش ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ افراد مستقیماً برای شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در کنترل صفت بررسی می‌شود؛ بنابراین، نیازی به تهیه جمعیت در حال تفرق نمی‌باشد و برای شناسایی مکان‌های ژنومی پیوسته با صفات، از

نشانگر SSR مطالعه شد. بر اساس تجزیه ارتباط ۵ نشانگر اختصاصی برای مقاومت جزئی در برابر جدایه‌ها شناسایی شد. در این مطالعه دو تا از نشانگرها، بین بعضی از جدایه‌ها مشترک بودند. نشانگر ORS1256 برای دو جدایه SSU35 و SSU87 و نشانگر ORS49 برای دو جدایه SSU53 و SSU55 به‌طور مشترک شناسایی شدند (Darvishzadeh, 2012). اخیراً نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها توسعه پیدا کرده‌اند که ویژگی‌هایی از قبیل ثبات، پراکندگی، ساختار حفاظت‌شده، موتیف‌های پشت سر هم و تعداد نسخه بالا، آنها را به‌عنوان سیستم‌های نشانگری مناسب و کارا، به‌خصوص برای بررسی تنوع ژنتیکی و تکاملی درون و بین گونه‌ای مطرح نموده است (Basirmia *et al.*, 2016). تاکنون پژوهشی در رابطه با شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با بیماری اسکروتینیا در آفتابگردان با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون انجام نگرفته است. در پژوهش حاضر با استفاده از داده‌های ژنتیکی حاصل از نشانگرهای رتروترانسپوزونی (REMAP Retrotransposon-) (microsatellite amplified polymorphism) و داده‌های فنوتیپی حاصل از واکنش ژنوتیپ‌های مختلف آفتابگردان به جدایه‌های مختلف قارچ اسکروتینیا، مکان‌های ژنی مرتبط با مقاومت به بیماری اسکروتینیا، شناسایی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در پژوهش حاضر واکنش ۱۰۰ لاین خالص آفتابگردان روغنی به ۶ جدایه قارچ اسکروتینیا مورد بررسی قرار گرفت. منشاء لاین‌های مورد مطالعه از کشورهای آمریکا، فرانسه، صربستان، مجارستان و ایران می‌باشند (جدول ۱). بذور لاین‌ها در گلدان‌های مستطیلی شکل ۶۰×۲۰ سانتی-متری در محیط پیت‌ماس در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (گلدان) و هر تکرار شامل ۶ گیاهچه کشت شدند. گیاهان کشت‌شده تا مرحله ۸ برگی در شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۵٪ و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی پرورش یافتند.

ارزیابی فنوتیپی

واکنش حساسیت لاین‌ها در مقابل جدایه‌های مختلف قارچ عامل بیماری اسکروتینیا مطالعه شد. آلودگی با شش

جمعیت‌های متنوع استفاده می‌شود. از این رو، امکان شناسایی تمامی آلل‌های پیوسته با صفت مورد مطالعه وجود دارد (Roy *et al.*, 2006). نکته قابل توجه این است که ساختار جمعیت، اندازه نمونه و فراوانی آللی خاص ممکن است توانایی این روش را در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات تحت تأثیر قرار داده و باعث ایجاد ارتباطات دروغین نشانگر- صفت (False marker-trait associations) یا به عبارتی نتایج مثبت دروغین شود (Zhang *et al.*, 2012). بنابراین به‌منظور به حداقل رساندن ارتباطات دروغین، ابتدا ساختار جمعیت (Structure) و روابط خویشاوندی (Kinship) در جمعیت مورد استفاده ارزیابی می‌شود و در تجزیه ارتباط لحاظ می‌گردد (Yu & Buckler, 2006; Pritchard *et al.*, 2000). ساختار جمعیت با روش بیزین (Bayesian) ارزیابی شده و اعضای جمعیت به زیرجمعیت‌هایی تقسیم می‌شود (Falush *et al.*, 2003; Pritchard *et al.*, 2000).

تاکنون چندین مطالعه برای شناسایی مکان‌های ژنی مقاومت به بیماری در آفتابگردان توسط نشانگرهای مولکولی (Restriction fragment length polymorphism) RFLP (Bert *et al.*, 2002; Mestries *et al.*, 1998)، (Amplified fragment length polymorphism) AFLP (Davar *et al.*, 2010; Rönicke *et al.*, 2005; Bert *et al.*, 2002) (polymorphism Simple sequence) SSR (Amoozadeh *et al.*, 2015; Darvishzadeh, 2012; Davar *et al.*, 2010; Micic *et al.*, 2004; Micic *et al.*, 2005ab; Rönicke *et al.*, 2005; Yue *et al.*, 2008) (Single nucleotide polymorphism) SNP (Amoozadeh *et al.*, 2015; Fusari *et al.*, 2012; Talukder *et al.*, 2014) انجام گرفته است. در آزمایشی، واکنش لاین‌های خالص آفتابگردان در شرایط مزرعه‌ای در برابر قارچ *S. sclerotiorum* بررسی گردید. پروفیل مولکولی لاین‌ها با ۴۳ ژن کاندید که بر اساس مطالعات پروفایل رونوشت در کلزا و آفتابگردان آلوده‌شده با قارچ *S. sclerotiorum* انتخاب شده بودند تهیه شد. بررسی ارتباط بین داده‌های شدت بیماری و چند شکلی هاپلوتایپ در ژن‌های کاندید با استفاده از مدل خطی مخلوط (MLM) نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین ژن کاندید *HaRIC-B* و وقوع پوسیدگی طبق، توسط بیمارگر قارچی در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد (Fusari *et al.*, 2012). در مطالعه-ای واکنش ۱۵ ژنوتیپ آفتابگردان تهیه‌شده از کشورهای مختلف دنیا در برابر ۷ جدایه بیمارگر قارچی *S. sclerotiorum* ارزیابی شد. در این بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از ۳۸

انجام واکنش PCR از ۱۴ آغازگر REMAP استفاده شد (جدول ۲). واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، حاوی ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰x PCR (500 mM KCl, 500 mM Tris-HCl pH 8.4)، ۰/۷ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار (شرکت سیناژن، تهران، ایران)، ۰/۲۵ میلی‌مول از هر dNTP (Biofluxbiotech)، ۱/۱ واحد آنزیم تک پلی‌مراز (شرکت سیناژن، تهران، ایران) و ۱۰ میکرومول از هر آغازگر به همراه آب دی‌یونیزه در دستگاه ترمال‌سایکلر انجام گرفت. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به صورت: ۴ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۶ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (جهت واسرشت‌سازی)، ۴۰ ثانیه در دمای اتصال اختصاصی مربوط به هر آغازگر (جهت اتصال) و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (جهت بسط) و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. تفکیک محصولات تکثیر با استفاده از ژل آگارز ۱/۸ درصد و بافر ۰/۵x TBE با ولتاژ ۶۵ ولت به مدت ۳ ساعت انجام و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. برای تعیین اندازه باندها از نشانگر *O'GeneRuler* (شرکت فرمنتاز) استفاده شد. باندهای حاصل از نشانگرها به صورت یک (وجود باند) و صفر (عدم وجود باند) امتیازدهی و ماتریس حاصل برای بررسی ساختار جمعیت و تجزیه ارتباط استفاده شد.

جدایه قارچ عامل بیماری اسکروتینیا (سه جدایه قارچی J1 J2 و A37 از گونه *S. sclerotiorum* و سه جدایه قارچی A1، G2، M1 از گونه *S. minor*) از منطقه آذربایجان غربی انجام شد. برای تهیه مایع تلقیح، جدایه‌های قارچی پس از ضدعفونی، در محیط آگار دکستروز سیب‌زمینی (Potato dextrose agar; PDA, 39 gL⁻¹, pH=6) کشت شده و به مدت پنج روز در انکوباتور با دمای ۲۵±۱ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند. برای حفظ رطوبت، اطراف ساقه و دیسک میسلیومی بر اساس روش Colhoun & Price (1975) با پارافیلیم بسته شد. پس از سه روز از مایه‌زنی با قارچ، واکنش لاین‌ها به جدایه‌های قارچی بررسی شد. بدین منظور درصد قسمت نکروزه در ۱ سانتی‌متری پایه ساقه به صورت مشاهده‌ای اندازه‌گیری شد (Davar et al., 2010; Amoozadeh et al., 2015).

ارزیابی ژنتیکی

برای ارزیابی ساختار ژنتیکی لاین‌های مورد مطالعه و تجزیه ارتباط، از ۱۲۰ جایگاه ژنومی تکثیرشده توسط آغازگرهای رتروترانسپوزونی REMAP (Basirmia et al., 2016) استفاده شد. به‌طور خلاصه، استخراج DNA به روش CTAB از بافت تازه برگ گیاهچه‌های ۱۵ روزه انجام گرفت و کیفیت و کمیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و با استفاده از اسپکتوفتومتری تعیین شد. برای

جدول ۱- اسامی و محل تهیه لاین‌های آفتابگردان روغنی مورد مطالعه

Table 1- Name and origin of the studied oily sunflower lines

Code	Line	Country	Q value			
			Q1	Q2	Q3	Q4
1	LC1064C	France	0.043	0.495	0.234	0.228
2	DM2	USA	0.477	0.01	0.506	0.006
3	H156A/RHA274	France	0.109	0.706	0.083	0.101
4	NS-R5	France	0.981	0.008	0.004	0.007
5	8A*/LC1064C	France	0.899	0.06	0.019	0.023
6	HAR4	USA	0.967	0.015	0.008	0.01
7	SDB1	USA	0.126	0.835	0.004	0.035
8	AS5305	France	0.071	0.021	0.01	0.898
9	RHA274	USA	0.05	0.806	0.006	0.138
10	SDR18	USA	0.029	0.09	0.009	0.872
11	RT931	France	0.566	0.038	0.093	0.303
12	NS-B5	France	0.975	0.006	0.008	0.01
13	SDB3	USA	0.037	0.932	0.011	0.02
14	803-1	Serbia	0.019	0.945	0.013	0.023
15	F125/03	Hungary	0.008	0.013	0.011	0.968
16	HA335B	USA	0.011	0.011	0.011	0.968
17	TMB 51	France	0.788	0.144	0.004	0.064
18	LP-CSYB	France	0.009	0.015	0.968	0.009
19	PM1-3	USA	0.063	0.383	0.013	0.54
20	SDR19	USA	0.11	0.64	0.029	0.221
21	RHA265	France	0.839	0.036	0.021	0.104
22	QHP1	-	0.733	0.059	0.093	0.115

23	RT948	France	0.973	0.01	0.003	0.014
24	ENSAT-283	France	0.556	0.063	0.104	0.277
25	HA337B	USA	0.016	0.013	0.009	0.961
26	B454/03	Hungary	0.05	0.023	0.521	0.406
27	H100B	France	0.144	0.016	0.024	0.817
28	HA304	USA	0.076	0.015	0.01	0.899
29	AS5304	France	0.03	0.226	0.032	0.713
30	RHA858	USA	0.039	0.454	0.484	0.024
31	AS5306	France	0.012	0.959	0.011	0.018
32	as3211	France	0.041	0.765	0.016	0.177
33	ENSAT-254	France	0.807	0.072	0.014	0.108
34	ENSAT-270	France	0.889	0.027	0.05	0.034
35	1009329 2(100K)	France	0.032	0.078	0.009	0.881
36	1009337 (100K)	France	0.008	0.007	0.191	0.795
37	100935 0(100K)	France	0.043	0.034	0.014	0.908
38	5DES20QR	France	0.008	0.006	0.014	0.972
39	7CR13=PRH6	France	0.037	0.037	0.121	0.804
40	SSD580	France	0.112	0.125	0.008	0.755
41	SSD581	France	0.018	0.012	0.937	0.032
42	ENSAT-699	France	0.023	0.552	0.022	0.402
43	9CSAS	France	0.015	0.949	0.006	0.03
44	H049+FSB	France	0.051	0.637	0.006	0.306
45	5AS-F1/A2×R2	France	0.017	0.734	0.098	0.152
46	8ASB2	France	0.026	0.349	0.01	0.614
47	12ASB3	France	0.033	0.022	0.005	0.941
48	AS3232	France	0.117	0.613	0.008	0.262
49	15038	Hungary	0.033	0.024	0.537	0.406
50	15031	France	0.012	0.025	0.005	0.958
51	H156A×LC1064C	France	0.051	0.071	0.009	0.87
52	H543R/H543R	France	0.004	0.006	0.985	0.005
53	H156A/H543R	France	0.139	0.28	0.006	0.575
54	H543R	France	0.654	0.214	0.014	0.118
55	H100A/RHA274	France	0.031	0.026	0.072	0.871
56	H205A/83HR4	France	0.184	0.083	0.009	0.724
57	H158A/H543R	France	0.084	0.039	0.596	0.281
58	H209A/83HR4	France	0.019	0.068	0.109	0.805
59	H157A/LC1064	France	0.027	0.071	0.012	0.89
60	H100A/LC1064	France	0.019	0.824	0.085	0.072
61	H100A/90R78	France	0.634	0.088	0.254	0.024
62	AF1POPA	France	0.592	0.361	0.006	0.041
63	OES	France	0.048	0.926	0.012	0.014
64	RHA266	USA	0.052	0.906	0.009	0.032
65	PAC2	France	0.268	0.181	0.126	0.424
66	AS613	France	0.044	0.081	0.011	0.865
67	11×12	Iran	0.036	0.021	0.02	0.923
68	H603R	France	0.028	0.02	0.028	0.924
69	NSF1 A4×R5	France	0.039	0.024	0.01	0.927
70	4	Iran	0.979	0.008	0.004	0.009
71	110	Iran	0.027	0.014	0.933	0.027
72	28	Iran	0.01	0.064	0.035	0.891
73	703-CHLORINA	France	0.014	0.074	0.019	0.893
74	30	Iran	0.022	0.949	0.005	0.024
75	36	Iran	0.041	0.92	0.005	0.033
76	NSF1 A5×R5	France	0.013	0.951	0.01	0.026
77	1059	Iran	0.007	0.934	0.046	0.013
78	38	Iran	0.011	0.971	0.006	0.012
79	346	Iran	0.007	0.524	0.398	0.071
80	CAY	France	0.015	0.067	0.054	0.865
81	A CONTROL PLASTIPIC	France	0.046	0.102	0.761	0.091
82	SDB2	France	0.016	0.135	0.339	0.511
83	1009370 1(100K)	France	0.024	0.819	0.006	0.151
84	1009370 3(100K)	France	0.014	0.104	0.014	0.868
85	H158A/H543R	France	0.124	0.362	0.038	0.477
86	H100A	France	0.007	0.923	0.032	0.037
87	CSWW2X	France	0.025	0.941	0.022	0.013
88	H209A/H566R	France	0.024	0.542	0.42	0.015
89	BF1POPB	France	0.033	0.606	0.303	0.058
90	AS0-1-POP-A	France	0.012	0.955	0.01	0.023
91	AS6305	France	0.025	0.235	0.032	0.708
92	H205A/H543R	France	0.021	0.862	0.014	0.103
93	H209A/LC1064	France	0.017	0.019	0.038	0.926
94	H100A/83HR4	France	0.917	0.016	0.006	0.062
95	D34	France	-	-	-	-

96	sf 076	-	-	-	-
97	sf 022	-	-	-	-
98	sf-109	-	-	-	-
99	sf-105	-	-	-	-
100	sf-023	-	-	-	-

جدول ۲- اسامی و ساختار توالی آغازگرهای رتروترانسپوزونی مورد استفاده در پژوهش

Table 2. Names and sequence structure of retrotransposon primers used in the study

Retrotransposon primers	Sequence (5'→3')	ISSR primers	Sequence (5'→3')
1061LTR	AGAGGGGAATGTGGGGGTTTCC	UBC-818	CACACACACACACACAG
1062LTR	TCTCTATTTATAGCCGGAGAGGTG	UBC-826	ACACACACACACACACAC
1063LTR	GATCCGGTTTACGGGACTTAC	UBC-840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT
1064LTR	CGAAGAACAACCGAATCACC	UBC-857	ACACACACACACACACYG
1065LTR	AGCCTCTGAAAGACTCGTTCG	A13	GTGTGTGTGTGTCC
CF	GGTTTAGGTTCGTAACTCCTCCGCG	UBC-812	GAGAGAGAGAGAGAGAA
CR	ACAGACACCAGTGGCACCAAC	UBC-864	ATGATGATGATGATGATG
UF(U81)	T AACGGTGTCTGT TTTGCAGG	UBC-880	GGAGAGGAGAGGAGA
UR1(U82)	AGAGGGGAATGTGGGGGTTTCC		

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های درصد نکرور ابتدا با روش Arcsine-Square root تبدیل شدند و نرمال بودن توزیع خطاهای آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه واریانس برای داده‌های حاصل از ارزیابی واکنش لاین‌ها در برابر جدایه‌های قارچی بر اساس مدل طرح پایه کاملاً تصادفی در نرم‌افزار GenStat12 انجام گرفت. برای تفکیک لاین‌های حساس و مقاوم و نیز شناسایی برهمکنش‌های اختصاصی بین لاین‌ها و جدایه‌ها، مقایسه میانگین با روش حداقل اختلاف معنی‌دار برهمکنش‌ها یا LSD-interaction¹ انجام گرفت (Abrinbana *et al.*, 2012). بدین منظور، مقادیر LSD برهمکنش‌ها در سطح احتمال ۰/۱ درصد برای همه برهمکنش‌ها محاسبه گردید. سپس معنی‌داری میانگین آلودگی ژنوتیپ‌های آفتابگردان نسبت به جدایه‌های *S. sclerotiorum* با برهمکنش حساس (۱۰۰ درصد) مقایسه شدند. ژنوتیپ‌هایی که در سطح LSD ۰/۱٪ با شاهد (برهمکنش حساس؛ ۱۰۰ درصد) اختلاف داشتند به‌عنوان جزئی مقاوم در نظر گرفته شدند. به‌منظور تجزیه ارتباطی، ابتدا تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیرجمعیت‌های مناسب با روش Bayesian در نرم‌افزار Structure 2.3.3 انجام گرفت (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. جهت حصول منحنی حداکثر درست‌نمایی از مدل Admixture و

استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰۰ تکرار آزمایش (Burn-in) و ۱۰۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده گردید (Evanno *et al.*, 2005). لازم به ذکر است که نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیرجمعیت‌ها) یک ماتریس به نام Qst را محاسبه می‌کند که این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. پس از شبیه‌سازی برای تعیین تعداد بهینه K یا همان تعداد گروه‌ها، از روش اوانو و همکاران (Evanno *et al.*, 2005) استفاده شد. شناسایی نشانگرهای مرتبط و دارای ارتباط معنی‌دار با صفت مورد ارزیابی با مدل خطی عمومی (General linear model; GLM) وابسته به ماتریس Q (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت) و مدل خطی مخلوط (Mixed linear model; MLM) وابسته به ماتریس K+Q (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت + ماتریس روابط خویشاوندی) جهت جلوگیری از ارتباط کاذب بین نشانگر- صفت در نرم‌افزار TASEEL 2.1 انجام گرفت.

نتایج و بحث

ارزیابی فنوتیپی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که ژنوتیپ و جدایه اثر معنی‌داری بر درصد نکرور گیاهان آلوده‌شده با جدایه‌های قارچی مورد مطالعه دارند (جدول ۳). مقایسه میانگین درصد آلودگی ژنوتیپ‌ها نشان داد که میزان حساسیت به بیماری در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه متفاوت می‌باشد. هیچکدام از ژنوتیپ‌ها به جدایه قارچی J1 مقاومت نشان

1. Least significant difference

A1 از گونه *S. minor* مقاومت نشان دادند. ژنوتیپ‌های (8A×LC1064C, 110, H543R/H543R) حداقل به دو جدایه قارچی از دو گونه مختلف مقاوم بودند. سایر ژنوتیپ‌ها حساسیت شدیدی به جدایه‌های قارچی مورد مطالعه نشان دادند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد ژرم-پلاسما آفتابگردان روغنی مورد مطالعه از نظر درصد آلودگی به جدایه‌های قارچی مورد استفاده، تنوع بالایی دارد. ژنوتیپ‌هایی با درصد آلودگی پایین همچون ژنوتیپ 8A×LC1064C که کمترین درصد آلودگی را در پاسخ به دو جدایه قارچی A37 (*S. sclerotiorum*) و M1 (*S. minor*) از دو گونه مختلف قارچ اسکروتینیا نشان داد، می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی این محصول جهت تولید ارقام مقاوم مورد استفاده قرار گیرد.

ندادند. این در حالی است که تعداد بیشتری به جدایه قارچی A37 مقاوم بودند (جدول ۳). ژنوتیپ‌های (8A×LC1064C, HAR4, RHA274, RT931, F125/03, LP-CSYB, HA337B, 5DES20QR, H049+FSB, ASB28, H543R/H543R, H156A/H543R, H100A/RHA274, H100A/LC1064, AF1POPA, OES, PAC2, AS613, 110, 1059, 1009370, H100A/83HR4) به جدایه قارچی A37 و ژنوتیپ‌های (H543R/H543R, 110, NSF1 A4×R5, 1059) به جدایه قارچی J2 از گونه *S. sclerotiorum* مقاوم بودند. سه ژنوتیپ (H543R/H543R, 110, 1059) به هر دو جدایه A37 و J2 از گونه *S. sclerotiorum* مقاوم نشان دادند. ژنوتیپ‌های (8A×LC1064C, ENSAT-699, 1009370) به جدایه M1 (100K)، ژنوتیپ (H156A/H543R) به جدایه G2 و ژنوتیپ‌های (H205A/83HR4, 110) به جدایه

جدول ۳- تجزیه واریانس برای شدت بیماری در لاین‌های آفتابگردان آلوده‌شده با جدایه‌های قارچ *Sclerotinia*
Table 3. Analysis of variance for disease severity in sunflower lines infected by *Sclerotinia* isolates in controlled conditions

<i>S. minor</i>						
Source of variations	df	Sum of squares	Mean of squares	Variance ratio ^a		
Line	99	10.09	0.10	2.12**		
Isolate	2	2.51	1.26	26.16**		
Line × isolate	198	9.27	0.05	0.97		
Residual	600	28.84	0.05	-		
<i>S. sclerotiorum</i>						
Source of variations	df	Sum of squares	Mean of squares	Variance ratio ^a		
Line	99	15.84	0.16	2.93**		
Isolate	2	2.11	1.06	19.31**		
Line × isolate	198	16.06	0.08	1.48**		
Residual	600	32.79	0.05	-		
Partial resistant lines						
<i>S. minor</i> isolates	M1	8A×LC1064C (France, 58.33)	ENSAT-699 (France, 68.67)	1009370 I(100K) (France, 63.33)	-	-
	G2	H156A/H543R (France, 64.00)				
	A1	H205A/83HR4 (France, 69.67)	110 (Iran, 69.33)			
<i>S. sclerotiorum</i> isolates	A37	8A×LC1064C (France, 59.33)	HAR4 (USA, 52.33)	RHA274 (USA, 63.33)	RT931 (France, 60.33)	F125/03 (Hungary, 48)
		LP-CSYB (France, 68.33)	HA337B (USA, 70.33)	5DES20QR (France, 72.67)	H049+FSB (France, 67.33)	ASB28 (France, 67)
		H543R/H543R (France, 58.33)	H156A/H543R (France, 69.33)	H100A/RHA274 (France, 64)	H100A/LC1064 (France, 39.33)	AF1POPA (France, 42)
		OES (France, 49.33)	PAC2 (France, 70.67)	AS613 (France, 71.00)	110 (Iran, 70.33)	1059 (Iran, 60)
		1009370 3(100K) (France, 58.67)	H100A/83HR4 (France, 47)			
	J2	H543R/H543R (France, 66.33)	110 (Iran, 60.67)	NSF1 A4×R5 (France, 60.00)	1059 (Iran, 30.67)	
	J1	-				

Variance ratio: میانگین مربعات یک منبع تغییر تقسیم بر میانگین مربعات اشتباه.

Variance ratio: Mean square for a source of variation divided by the residual mean square. **: P < 0.001.

Partial resistant lines: با بررسی اختلاف معنی‌دار با شاهد در سطح LSD ۰/۱٪ برای جدایه‌های گونه *S. minor* و برای جدایه‌های گونه *S.*

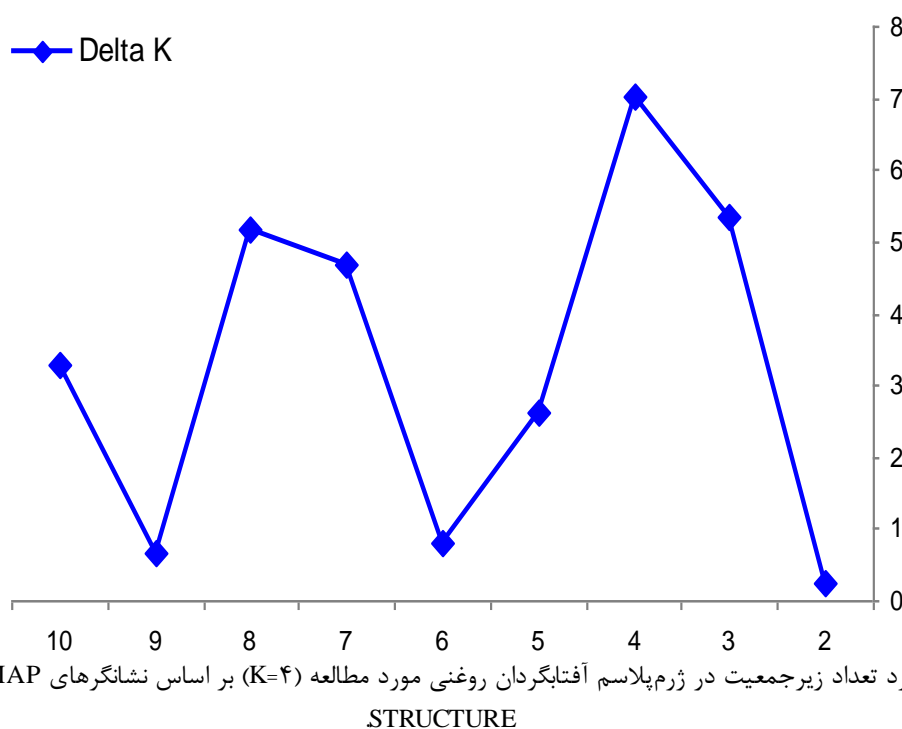
sclerotiorum شناسایی شدند. داخل پرانتز به ترتیب منشأ و درصد نکروز لاین را نشان می‌دهد.

Partial resistant lines for isolates of *S. minor* and *S. sclerotiorum* species were identified by investigation significant difference with control (100) at LSD=0.001. The items within parenthesis show the origin and percentage of necrosis of line, respectively.

ارزیابی ساختار ژنتیکی

تجزیه ساختار جمعیت با نرم افزار Structure امکان شکستن کل جمعیت به زیرجمعیت‌هایی با ساختارهای متفاوت را فراهم می‌سازد و چنانچه ژنوتیپ‌ها به صورت اختلاط یافته باشند، پس از انجام این تجزیه، قابل تشخیص خواهند بود (Dadras, 2012). در پژوهش حاضر برای ارزیابی ساختار ژنتیکی از ۱۲۰ جایگاه ژنومی تکثیرشده توسط آغازگرهای رتروترانسپوزونی REMAP (Basimia et al., 2016) استفاده شد. بدین منظور ساختار ژنتیکی جمعیت و دسته بندی دقیق افراد به زیرجمعیت‌های مناسب به روش بیزین و با استفاده از نرم افزار Structure انجام گرفت. این روش هر یک از ژنوتیپ‌ها را با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت های فرضی منتسب می‌کند که در هر زیرجمعیت میزان

عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد (Sahranavard Azartamar et al., 2015; Jannatdoust et al., 2015). بدین منظور ابتدا تعداد K یا زیرجمعیت احتمالی محاسبه و نمودار دو بعدی آن رسم گردید. تعداد زیرجمعیتی که در آن حداکثر درست‌نمایی مشاهده شود، به عنوان تعداد مطلوب زیرجمعیت انتخاب می‌شود. شکل ۱ نمودار دو طرفه تعیین بهینه K را نشان می‌دهد. با توجه به این نمودار، بهترین K در جمعیت مورد مطالعه K=4 یا در واقع اوج منحنی است که به عنوان K بهینه در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس عضویت افراد در هر کلاستر (ماتریس Q) در نظر گرفته شد.



شکل ۱- برآورد تعداد زیرجمعیت در ژرم پلاسم آفتابگردان روغنی مورد مطالعه (K=4) بر اساس نشانگرهای REMAP در نرم افزار STRUCTURE

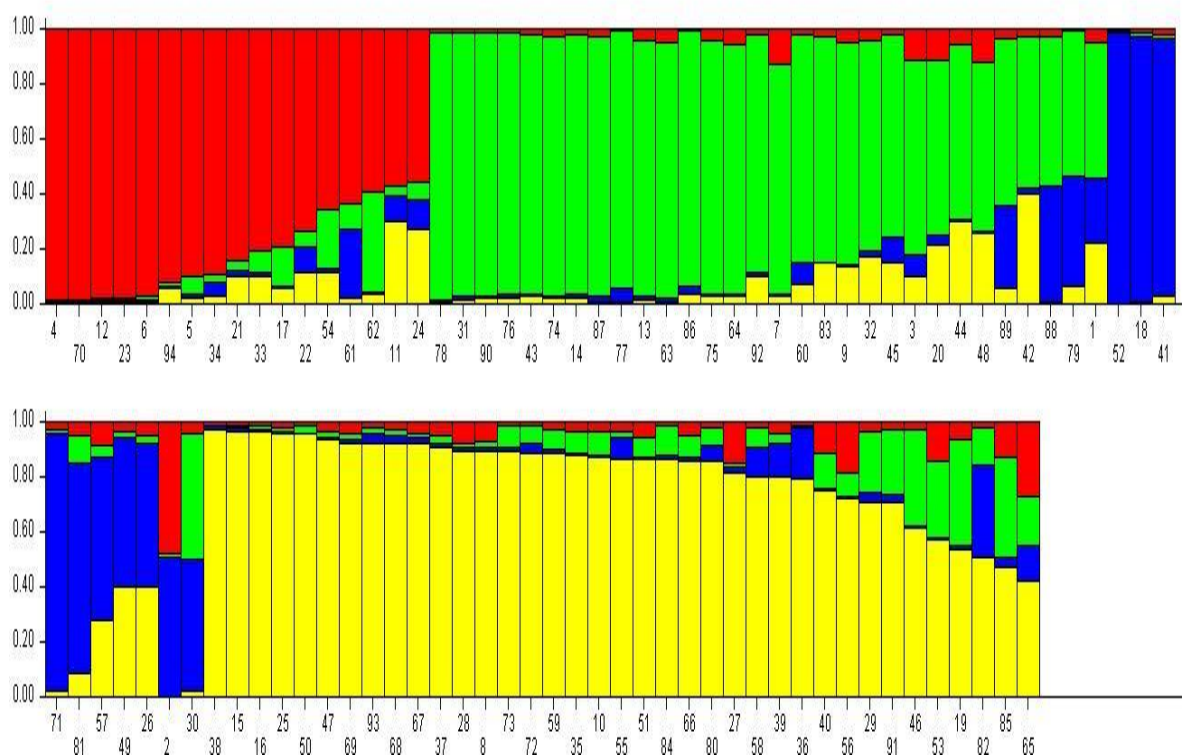
Figure 1. Estimation of subpopulation number (K=4) in the studied oily sunflower germplasm according to REMAP markers using STRUCTURE software.

نباید خود به لحاظ ساختاری به زیرگروه‌ها تقسیم شود. زیرا وجود ساختار در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند عامل بازدارنده‌ای در جهت دستیابی به نتایج قابل اعتماد باشد. در صورتی که اثر عوامل ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در تجزیه ارتباط در نظر گرفته نشود، نتایج

در مطالعات ژنتیکی، ساختار جمعیت برای توضیح روابط افراد در درون و بین جمعیت‌ها استفاده می‌شود و چشم‌اندازی از روابط تکاملی در یک جمعیت را ارائه می‌نماید. در تجزیه ارتباط، در حالت ایده‌آل، نباید ساختاری در جمعیت مورد استفاده وجود داشته باشد؛ یعنی جمعیت

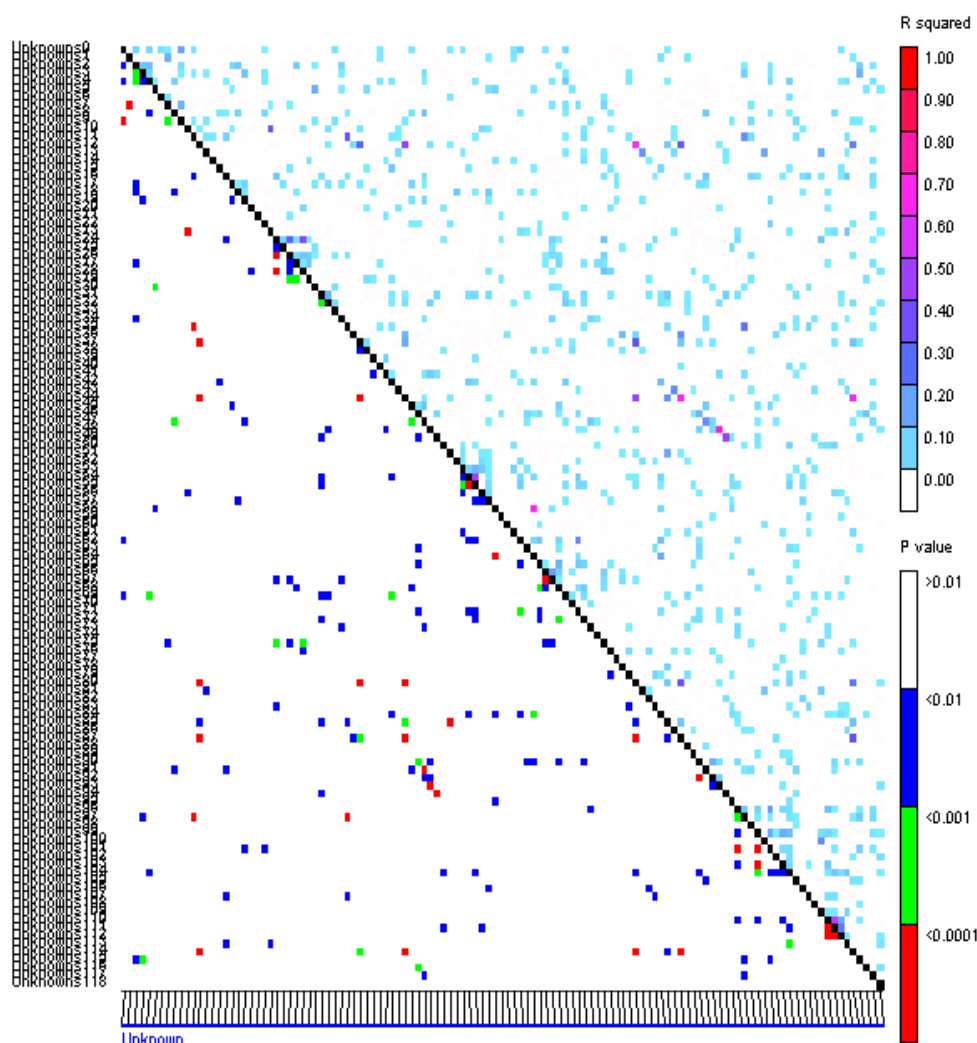
جدول (۱). ۳۲ درصد افراد با احتمال کمتر از ۷۰٪ به ساختار خاصی تعلق نداشتند و مختلط در نظر گرفته شدند (شکل ۲). به طور کلی ۶۸ درصد افراد مورد مطالعه دارای درصد عضویت بیشتر و مساوی ۰/۷ و ۳۲ درصد افراد دارای سهم عضویت کمتر از ۰/۷ بود. ساختار یک جمعیت، در نتیجه انتخاب و در سطوح بالاتر حاصل اختلاط در آن جمعیت می‌باشد و منجر به افزایش عدم تعادل لینکاژی بین نشانگرهای غیرپیوسته می‌شود (Cardon & Palmer, 2006; Rostok *et al.*, 2003). در تجزیه ارتباطی، میزان دقت تجزیه، علاوه بر ترکیب ساختار جمعیت، به گستره عدم تعادل پیوستگی (LD) در ژنوم نیز بستگی دارد. در این تحقیق از ۷۰۲۱ جفت نشانگر REMAP، ۷/۳۸ درصد r^2 ها در عدم تعادل بودند (شکل ۳). گستره r^2 بین ۰ تا ۰/۷۴ با میانگین برابر با ۰/۱۸ بود.

مثبت کاذب به وجود خواهد آمد (Brescghello & Sorrells, 2006). از این رو، آگاهی از ساختار جمعیت به عنوان یک پیش‌نیاز در نقشه‌یابی ارتباطی، می‌تواند برای جلوگیری از ارتباطات مثبت دروغین بین نشانگرها و صفات استفاده شود (Pritchard & Donnelly, 2001). در بارپلات حاصل، وقتی درصد عضویت یک ژنوتیپ به یک کلاستر بیشتر یا مساوی ۰/۷ باشد، ژنوتیپ به آن کلاستر نسبت داده می‌شود. اما در صورتی که درصد عضویت آن کمتر از این مقدار باشد، به عنوان ژنوتیپ ترکیبی (مخلوط) در نظر گرفته می‌شود (Spataro *et al.*, 2011). بر اساس نتایج ارائه شده در بارپلات، از کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با احتمال بیشتر از ۷۰٪ عضویت ژنوتیپ‌ها، ۱۲ درصد ژنوتیپ‌ها به ساختار اول (قرمز)، ۲۱ درصد به ساختار دوم (سبز)، ۵ درصد به ساختار سوم (آبی) و ۳۰ درصد به ساختار چهارم (زرد) تعلق داشتند (شکل ۲).



شکل ۲- بارپلات تجزیه ساختار در ژرمپلاسم آفتابگردان روغنی مورد مطالعه بر اساس ۱۲۰ مکان ژنی حاصل از نشانگرهای REMAP با استفاده از مدل Bayesian. هر رنگ یک زیرجمعیت یا کلاستر را نشان می‌دهد. اعداد روی محور افقی و عمودی به ترتیب شماره افراد و ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر را نشان می‌دهد.

Figure 2. Bar plot of structure analysis of the studied oily sunflower germplasm according to 120 loci of REMAP markers using Bayesian model. Each color shows one subpopulation or cluster. The numbers of horizontal and vertical axis show the numbers of individual and their membership% in the groups, respectively.



شکل ۳- پلات عدم تعادل پیوستگی براساس نشانگرهای رتروترنسپوزون REMAP در لاین‌های آفتابگردان روغنی. قسمت بالا قطری نشان‌دهنده میزان عدم تعادل پیوستگی با استفاده از آماره r^2 و قسمت پایین قطری P-value برای جفت نشانگرها را نشان می‌دهد.

Figure 3. LD plot generated by REMAP marker pairs in oily sunflower genotypes. The upper diagonal shows r^2 among each pair of markers. The lower diagonal shows the levels of significance between each pair of markers.

کنترل‌کننده مقاومت جزئی به جدایه J2، ۱ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت جزئی به جدایه A1 و ۲ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت جزئی به جدایه A37 شناسایی شد. نشانگرهای مولکولی شناسایی شده ۰/۰۷ تا ۷ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توجیه می‌نمایند. در مجموع، نشانگرهای مولکولی شناسایی شده ۳۷ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه می‌نمایند. در مکان‌یابی ارتباطی با استفاده از مدل MLM، ۸ مکان‌ژنی ارتباط معنی‌داری ($P \leq 0.01$) با مقاومت به جدایه‌های قارچ اسکروتینیا نشان دادند. تعداد ۱ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت جزئی به جدایه J1، ۱ نشانگر پیوسته

مکان‌یابی ارتباطی

برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با مقاومت به جدایه‌های قارچ اسکروتینیا، مکان‌یابی ارتباطی بر اساس مدل خطی عمومی (GLM) و مدل خطی مخلوط (MLM) انجام گرفت (جدول ۴). بر اساس مدل ارتباطی GLM، ۹ نشانگر (مکان ژنی) ارتباط معنی‌داری ($P \leq 0.01$) با مقاومت به جدایه‌های قارچ اسکروتینیا نشان دادند. تعداد ۱ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت جزئی به جدایه J1، ۱ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت جزئی به جدایه M1، ۳ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت جزئی به جدایه G2، ۱ نشانگر پیوسته با ژن‌های

مقاومت جزئی به جدایه A1 و ۲ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت جزئی به جدایه A37 شناسایی شد.

با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت جزئی به جدایه M1، ۳ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت جزئی به جدایه G2، ۱ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده

جدول ۴- نشانگرهای REMAP پیوسته با مقاومت به بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه در ژرم‌پلاسما آفتابگردان روغنی مورد مطالعه بر اساس مدل خطی عمومی (GLM) و مدل خطی مخلوط (MLM)

Table 4. REMAP markers associated with resistance to sclerotinia stem rot disease in the studied oily sunflower germplasm according to general linear model (GLM) and mixed linear model (MLM)

Species	Trait	Marker	General linear model (GLM)		Mixed linear model (MLM)	
			P-value	R ²	F	P-value
<i>S. sclerotiorum</i>	J1 isolate	CF-UBC8264	0.0069	0.0729	7.6686	0.0069
	J2 isolate	1061LTR-UBC8575	0.0042	0.025	-	-
	A37 isolate	1061LTR-UBC8185	0.0025	0.007	9.7138	0.0025
		1061LTR-UBC8572	0.0066	0.0549	9.2765	0.0031
<i>S. minor</i>	M1 isolate	1061LTR-UBC8185	0.0063	0.043	7.8244	0.0063
		CF-UBC8263	0.0026	0.011	9.1645	0.0032
	G2 isolate	CF-UBC8264	0.005	0.021	7.914	0.0061
		UR1-UBC8405	0.006	0.0669	7.1296	0.0091
		A1 isolate	CF-UBC8181	0.0094	0.0729	7.0962

نشانگرهای مشترک می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در مقاومت باشد (Jun et al., 2008). شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد، زیرا گزینش همزمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازد (Tuberosa et al., 2002; Hittalmamni et al., 2003). تاکنون چندین مطالعه برای شناسایی مکان‌های ژنی مقاومت به بیماری در آفتابگردان توسط نشانگرهای مولکولی مختلف انجام شده است. Mestries et al. (1998) سه جایگاه ژنی مقاومت به پوسیدگی طبق در آفتابگردان را با استفاده از نشانگرهای RFLP شناسایی کردند که ۱۲/۳ تا ۱۷/۵ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توجیه می‌نمودند. Bert et al. (2002) سه جایگاه ژنی روی گروه‌های پیوستگی ۶، ۸ و ۱۳ برای مقاومت به گسترش میسلیمی قارچ اسکروتینیا روی برگ آفتابگردان با استفاده از نشانگرهای RFLP شناسایی کردند که ۵۶ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توجیه می‌نمودند. این جایگاه‌های ژنی با گروه‌های پیوستگی ۱۳، ۹ و ۱ در نقشه ژنتیکی Tang et al. (2002) مطابقت دارند. Micic et al. (2004) با استفاده از نشانگرهای SSR هفت جایگاه ژنی برای مقاومت جزئی به پوسیدگی ساقه روی گروه‌های پیوستگی ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۵ و ۱۶ از نقشه مرجع

به‌طور کلی دو روش GLM و MLM برای مکان‌یابی ارتباطی پیشنهاد شده است. امروزه روش آماری MLM به‌طور گسترده‌ای برای تجزیه ارتباط در گیاهان استفاده می‌شود (Ghavami et al., 2011). Saeed & همکاران (2014) در مکان‌یابی ارتباطی تحمل به شوری در ژرم‌پلاسما پنبه گزارش کردند که استفاده از مدل MLM باعث کاهش ارتباطات کاذب نشانگر-صفت می‌شود. Buckler & Yu (2006) در شناسایی نشانگرهای پیوسته با تغییرات فنوتیپی صفات آگرومورفولوژیک در ذرت از مدل MLM به‌منظور بهبود نتایج و کاهش نتایج مثبت دروغین استفاده نمودند و بر اساس اظهار محققین نتایج دقیق‌تری در مقایسه با مدل GLM به‌دست آمد. به‌نظر می‌رسد مدل MLM، برای مکان‌یابی ارتباطی، مدل قابل اطمینانی باشد. طبق این نتایج، نشانگرهای CF-UBC826، 1061LTR-UBC818، UR1-UBC840، 1061LTR-UBC857، CF-UBC818 در هر دو مدل ارتباطیایی GLM و MLM ارتباط معنی‌داری با مقاومت به جدایه‌های قارچ اسکروتینیا نشان دادند. از نشانگرهای ذکر شده ۳ نشانگر CF-UBC826، 1061LTR-UBC818 و 1061LTR-UBC857 با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به دو جدایه قارچی عامل بیماری اسکروتینیا پیوسته بودند. وجود

های GLM و MLM به ترتیب ۹ و ۱۶ مکان شناسایی نمودند که تغییرات قابل توجهی از صفات فنوتیپی را توجیه می نمودند. تکنیک نقشه یابی ارتباطی در سایر گیاهان زراعی مانند گندم (Liu, 2011)، جو (Wang *et al.*, 2012) و ذرت (Anderson *et al.*, 2007) نیز استفاده شده است.

نتیجه گیری کلی

نتایج نشان داد که ژنوتیپ های (8A×LC1064C, 110, H543R/H543R) حداقل به دو جدایه قارچ بیماری اسکروتینیا از شش جدایه مورد مطالعه مقاوم هستند. ژنوتیپ 8A×LC1064C به دلیل داشتن کمترین درصد آلودگی در پاسخ به دو جدایه قارچی از دو گونه مختلف اسکروتینیا، از پتانسیل بالایی برای استفاده در پروژه های به نژادی برخوردار می باشد. بررسی ساختار جمعیت با ۱۲۰ مکان رتروترانسپوزونی REMAP، ژنوتیپ های مورد مطالعه را به ۴ زیرجمعیت احتمالی (K=۴) تقسیم نمود. در تجزیه ارتباطی بر اساس نشانگرهای مورد استفاده و با استفاده از مدل GLM و MLM به ترتیب ۹ و ۸ نشانگر در ارتباط معنی دار با مناطق ژنومی درگیر در مقاومت جزئی به جدایه های اسکروتینیا شناسایی شد. نتایج حاصل از این پژوهش، کارایی استفاده از روش مکان یابی ارتباطی و مدل MLM در شناسایی نشانگرهای مرتبط با مقاومت به بیماری در لاین های آفتابگردان روغنی را نشان می دهد. طبق نتایج حاصل از این پژوهش، نشانگرهای CF-UBC826، 1061LTR-UBC818 و 1061LTR-UBC857 با ژن های کنترل کننده مقاومت به دو جدایه قارچی اسکروتینیا از شش جدایه پیوسته بودند. شناسایی نشانگرهای مشترک به دلیل اینکه گزینش همزمان مقاومت به چند جدایه قارچی را امکان پذیر می سازد، در پیشبرد برنامه های به نژادی این محصول حائز اهمیت می باشد. نشانگرهای پیوسته با عوامل کنترل کننده مقاومت به بیماری بعد از اعتبارسنجی (Validation) و تبدیل به نشانگر SCAR می توانند در برنامه های به نژادی آفتابگردان برای انتخاب به کمک نشانگر و تولید ارقام مقاوم به این بیماری مفید واقع گردند.

سپاسگزاری

از دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه

Tang *et al.* (2002) شناسایی کردند. این جایگاه های ژنی ۳/۳ تا ۳۶/۷ درصد از تنوع فنوتیپی صفت را توجیه می نمودند. Rönicke *et al.* (2005) با استفاده از نشانگرهای SSR پنج جایگاه ژنی برای مقاومت به پوسیدگی طبق مکان یابی کردند که ۱۰/۶ تا ۱۷/۱ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توجیه می نمودند. همچنین Micic *et al.* (2005a,b) با استفاده از نشانگرهای SSR دو جایگاه ژنی روی گروه های پیوستگی ۸ و ۱۶ و سه جایگاه ژنی روی گروه های پیوستگی ۴، ۱۰ و ۱۷ برای مقاومت جزئی به پوسیدگی ساقه شناسایی کردند.

در پژوهشی دیگر Yue *et al.* (2008) با استفاده از نشانگرهای SSR هفت QTL برای مقاومت جزئی به بیماری اسکروتینیایی آفتابگردان شناسایی کردند که ۸/۴ تا ۳۴/۵ درصد از تغییرات داده های مربوط به شدت بیماری را توجیه می نمودند. Davar *et al.* (2010) با استفاده از نشانگرهای SSR هفت QTL برای مقاومت جزئی به پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه روی گروه های پیوسته ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۴ و ۱۷ شناسایی کردند. Fusari *et al.* (2012) در بررسی ارتباط بین داده های حاصل از واکنش لاین های خالص آفتابگردان در برابر قارچ اسکروتینیا و پروفیل مولکولی افراد با نشانگرهای SNP و ژن های کاندید با مدل MLM، ژن کاندیدی (HaRIC-B) شناسایی کردند که ۲۰ درصد از تغییرات داده های فنوتیپی را توجیه می نمود. Talukder *et al.* (2014) در بررسی ارتباط بین داده های حاصل از ارزیابی واکنش لاین های آفتابگردان در مقابل قارچ عامل بیماری اسکروتینیا و پروفیل مولکولی افراد با نشانگرهای SNP و ژن های کاندید حاصل از آرابیدوپسیس، با دو مدل MLM و GLM ۲۷ نشانگر SNP با ارتباط معنی دار با مقاومت به بیماری شناسایی کردند. در پژوهش آنها ژن های HaCOI1-1 و HaCOI1-2 که ۷/۴ درصد تغییرات فنوتیپی را توجیه می نمودند، برای اصلاح مقاومت به پوسیدگی اسکروتینیایی انتخاب شدند. در پژوهشی مکان یابی ارتباطی صفات آگرومورفولوژیک ژنوتیپ های آفتابگردان مورد استفاده در این تحقیق نیز انجام شده است (Sahranavard Azartamar *et al.*, 2015). Sahranavard Azartamar *et al.* (2015) در تجزیه ارتباط برای ۱۲ صفت آگرومورفولوژیک در لاین های آفتابگردان روغنی مورد استفاده در این تحقیق بر اساس نشانگرهای SSR و مدل -

آگرونومی تولوز فرانسه به خاطر در اختیار قراردادن بذور ژنوتیپ‌های آفتابگردان روغنی تشکر می‌گردد.

ارومیه و بنیاد ملی نخبگان ریاست جمهوری به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام این پژوهش، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از انستیتو تحقیقات

REFERENCES

1. Abrinbana, M., Mozafari, J., Shams-bakhsh, M. & Mehrabi, R. (2012). Resistance spectra of wheat genotypes and virulence patterns of *Mycosphaerella graminicola* isolates in Iran. *Euphytica*, 186, 75-90.
2. Amoozadeh, M., Darvishzadeh, R., Davar, R., Abdollahi Mandoulakani, B., Haddadi, P. & Basirnia, A. (2015). Quantitative trait loci associated with isolate specific and isolate non-specific partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17, 213-226.
3. 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.
4. Bert, P., Jouan, F., Tourvieille de Labrouhe, D., Seere, F., Nicolas, P. & Vear, F. (2002). Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*. *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 985-993.
5. Bert, P. F., Dechamp Guillaume, G., Serre, F., Jouan, I., Tourvieille de Labrouhe, D., Nicolas, P. & Vear, F. (2004). Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldi*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 865-874.
6. Bolton, M. D., Thomma, B. P. & Nelson, B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 7, 1-16.
7. Bresseghele, F. & Sorrells, M. E. (2006). Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics*, 172, 1165-1177.
8. Cardon, L. R. & Palmer, L. J. (2003). Population stratification and spurious allelic association. *Lancet*, 361, 598-604.
9. Castaño, F., Vear, F. & Tourvieille de Labrouhe, D. (1993). Resistance of sunflower inbred lines to various forms of attack by *Sclerotinia sclerotiorum* and relations with some morphological characters. *Euphytica*, 68, 85-98.
10. Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B. & Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142, 169-196.
11. Cruickshank, A. W., Cooper, M. & Ryley, M. J. (2002). Peanut resistance to *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 53, 1105-1110.
12. Dadras, A. R. (2012). *Evaluation of genetic diversity of tobacco (Nicotiana tabacum L.) cultivars using AFLP molecular markers*. M. Sc. Thesis. Faculty of Agriculture Shahib Bahonar University of Kerman, Iran (In Farsi).
13. Darvishzadeh, R., Poormohammad Kiani, S., Huguet, T. & Sarrafi, A. (2008). Genetic variation and identification of molecular marker associated with partial resistance to *Phoma macdonaldii* in gamma-irradiation-induced mutants of sunflower. *Canadian Journal Plant Pathology*, 30, 106-114.
14. Darvishzadeh, R. (2012). Association of SSR markers with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Australian journal of Crop Science*, 6, 276-282.
15. Davar, R., Darvishzadeh, R., Majd, A., Ghosta, Y. & Sarrafi, A. (2010). QTL mapping of partial resistance to basal stem rot in sunflower using recombinant inbred lines. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, 330-341.
16. Emamgholi, A., Zaefizadeh, M. & Imani, A. (2015). The proteomic analysis of resistance to *Sclerotinia Sclerotiorum* fungus in sunflower seedling stage. *Trend in Life Science*, 4, 2319-5037.
17. Ershad, J. (1995). *Fungi of Iran*. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) Publisher, Tehran, Iran (In Farsi).
18. Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611- 2620.
19. Food and Agriculture Organization. (2016). FAOSTAT, Crop production. Retrieved September 15, 2016, from <http://www.fao.org/biodiversity>.
20. Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587.

21. Fusari, C. M., Di-Rienzo, J. A., Troglia, C., Nishinakamasu, V., Moreno, M. V., Maringolo, C., Quiroz, F., Álvarez, D., Escande, A., Hopp, E., Heinz, R., Lia, V. V. & Paniego, N. B. (2012). Association mapping in sunflower for sclerotinia head rot resistance. *BMC Plant Biology*, 12, 93, Doi: 10.1186/1471-2229-12-93.
22. Gentzbittel, L., Mouzeyar, S., Badaoui, S., Mestries, E., Vear, F., Tourvieille de Labrouhe, D. & Nicolas, P. (1998). Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 519-525.
23. Ghavami, F., Elias, E. E., Mamidi, O., Ansari, M., Sargolzaei, T., Adhikari M., Mergoum & Kianian, S. F. (2011). Mixed model association mapping for *Fusarium* head blight resistance in Tunisian-derived durum wheat population. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 1, 209-218.
24. Gilmore, B., Myers, J. R. & Kean, D. (2002). Completion of testing of *Phaseolus coccineus* plant introductions for white mold *Sclerotinia sclerotiorum* resistance. *Ann. Rept. Bean Improv. Coop*, pp. 45.
25. Godoy, M., Castano, F., Re, J. & Rodriguez, R. (2005). Sclerotinia resistance in sunflower genotypic variations of hybrids in three environments of Argentina. *Euphytica*, 145, 147-154.
26. Hahn, V. (2002). Genetic variation for resistance to *Sclerotinia* head rot in sunflower inbred lines. *Field Crop Research*, 77, 153-159.
27. Hartman, G. L., Gardner, M. E., Hymowitz, T. & Naidoo, G. C. (2000). Evaluation of perennial *Glycine* species for resistance to soybean fungal pathogens that cause Sclerotinia stem rot and sudden death syndrome. *Crop Science*, 40, 545-549.
28. Hittalmani, S., Huang, N., Courtois, B., Venuprasad, R., Shashidhar, H. E., Zhuang, J.Y., Zheng, K. L., Liu, G. F., Wang, G. C., Sidhu, J. S., Srivantaneeyakul, S., Singh, V. P., Bagali, P. G., Prasanna, H. C., McLaren, G. & Khush, G.S. (2003). Identification of QTL for growth and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 679-90.
29. Jannatdoust, M., Darvishzadeh, R., Ziaiefard, R., Azizi, H. & Gholinezhad, E. (2015). Association mapping for grain quality related traits in confectionery sunflower (*Helianthus annuus* L.) using retrotransposon markers under normal and drought stress conditions. *Crop Biotechnology*, 9, 15-28 (In Farsi).
30. Jun, T. H., Van, K., Kim, M. Y., Lee, S. H. & Walker, D. R. (2008). Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica*, 62, 179-191.
31. Lander, E. S. & Botstein, D. (1989). Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121, 185-199.
32. Liu, L., Wang, L., Yao, J., Zheng, Y. & Zhao, C. (2010). Association mapping of six agronomic traits on chromosome 4A of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Plant Breeding*, 1, 1-10.
33. Mestries, E., Gentzbittel, L., Tourvieille de Labrouhe, D., Nicolas, P. & Vear, F. (1998). Analysis of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Molecular Breeding*, 4, 215-226.
34. Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Schön, C.C., Knapp, J., Tang, S. & Melchinger, A. E. (2004). QTL mapping of *Sclerotinia* midstalk-rot resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1474-1484.
35. Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Schon, C. C. & Melchinger, A. E. (2005a). QTL mapping of resistance to *Sclerotinia* mid-stalk rot in RIL of sunflower population NDBLOSsel×CM625. *Theoretical and Applied Genetics*, 110, 1490-1498.
36. Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Melchinger, A. E., Knapp, S. J., Tang, S. & Schön, C. C. (2005b). Identification and validation of QTL for *Sclerotinia* mid-stalk rot resistance in sunflower by selective genotyping. *Theoretical and Applied Genetics*, 111, 233-242.
37. Neale, D. B. & Savolainen, O. (2004). Association genetic of complex traits in conifers. *Trends in Plant Science*, 9, 325-330.
38. Paniego, N., Heinz, R., Fernandez, P., Talia, P., Nishinakamasu, V. & Hopp, H. E. (2007). Oil seeds. In: K. Kole (Ed), *Genome Mapping and Molecular Breeding in plants*. (pp. 1-21) Heidelberg, Germany. Springer, Verlag.
39. Poormohammad-Kiani, S., Nouri, L., Maury, P., Darvishzadeh, R., Grieu P. & Sarrafi, A. (2008). Genetic variation and identification of molecular markers associated with osmotic adjustment-related traits in gamma irradiation-induced mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Genetics & Breeding*, 62, 67-74.
40. Porter, L. D., Hoheisel, G. & Coffman, V. A. (2009). Resistance of peas to *Sclerotinia sclerotiorum* in the *Pisum* core collection. *Plant Pathology*, 58, 52-60.
41. Price, K. & Colhoun, J. (1975). A study of variability of isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary from different hosts. *Journal of Phytopathology* 83, 159-166.
42. Pritchard, J. K., Stephens, M. N., Rosenberg, N. & Donnelly, P. (2000). Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*, 67, 170-181.
43. Pritchard, J. K. & Donnelly, P. (2001). Casecontrol studies of association in structured or admixed populations. *Theoretical Population Biology*, 60, 227-237.

44. Röncke, S., Hahn, V., Vogler, A. & Friedt W. (2005). Quantitative trait loci analysis of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Phytopathology*, 95, 834-839.
45. Rostok, N., Ramsay, L., MacKenzie, K., Cardle, L. & Bhat, P. R. (2006). Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *PNAS*, 103, 18656-18661.
46. Roy, J. K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, H. S. & Gupta, P. K. (2006). Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science-Bangalore*, 90, 683.
47. Saeed, A., Darvishzadeh, R. & Basirnia, B. (2013). Simple sequence repeat markers associated with agromorphological traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Zemdirbyste-Agriculture*, 100, 433-440.
48. Saeed, M., Wangzhen, G. & Tianzhen, Z. (2014). Association mapping for salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) germplasm from US and diverse regions of China. *Australian Journal of Crop Science*, 8(3), 338- 346.
49. Saharan, G. S. & Mehta, N. (2008). *Economic importance, sclerotinia diseases of crop plants: biology, ecology and disease management*. Springer.
50. Sahranavard Azartamar, F., Darvishzadeh, R., Ghadimzadeh, M., Azizi, H. & 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 (In Farsi).
51. Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Spagnoletti, Z. P. & Negri, V. (2011). Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 122, 1281-1291.
52. Talukder, Z. I., Hulke, B. S., Qi, L., Scheffler, B. E., Pegadaraju, V., McPhee, K. & Gulya, T. J. (2014). Candidate gene association mapping of *Sclerotinia* stalk rot resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.) uncovers the importance of COI1 homologs. *Theoretical and Applied Genetics*, 127, 193-209.
53. Tang, S., Yu, J. K., Slabaugh, M. B., Shintani, D. K. & Knapp S. J. (2002). Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 1124-1136.
54. Tuberosa, R., Salvi, S., Sanguineti, M. C., Landi, P., Maccaferri, M. & Conti, S. (2002). Mapping QTLs regulating morphophysiological traits and yield in droughtstressed maize: case studies, shortcomings and perspectives. *Annals of Botany*, 89, 941-963
55. Yu, J. M. & Buckler, E. S. (2006). Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 155-160.
56. Yue, B., Radi, S. A., Vick, B. A., Cai, X., Tang, S., Knapp, S. J., Gulya, T. J., Miller J. F. & Hu, J. (2008). Identifying quantitative trait loci for resistance to *Sclerotinia* head rot in two USDA sunflower germplasms. *Phytopathology*, 98, 926-931.
57. Wang, M., Jiang, N., Jia, T., Leach, L., Cockram, J., Comadran, J., Shaw, P., Waugh, R. & Luo, Z. (2012). Genome-wide association mapping of agronomic and morphologic traits in highly structured populations of barley cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 124, 233-46.
58. Zhang, Q., Wu, C., Ren, F. Y. & Zhang, C. (2012). Association analysis of important agronomical traits of maize inbred lines with SSRs. *Australian Journals of Crop Science*, 6, 1131-1138.