



شناسایی جایگاه‌های رتروترانسپوزونی (IRAP) مرتبط با مقاومت به بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه (*Sclerotinia spp.*) در آفتابگردان

رقیه نجف‌زاده^۱، رضا درویش‌زاده^{۲*}، خدیجه موسی‌خلیفانی^۳، مسعود ابرین‌بنا^۴

^۱پسادکتری، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه ارومیه، ارومیه و بنیاد ملی نخبگان، تهران و استادیار، گروه گیاهان دارویی، مرکز آموزش عالی شهید باکری، دانشگاه ارومیه، میاندوآب.

^۲استاد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه ارومیه، ارومیه و استاد، پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه، ارومیه.

^۳دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.

^۴استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۲۲

چکیده

بیماری اسکروتینیا از بیماری‌های قارچی مهم آفتابگردان در ایران می‌باشد که باعث کاهش رشد و عملکرد محصول می‌شود. در پژوهش حاضر واکنش ۱۰۰ لاین آفتابگردان روغنی به ۶ جدایه قارچ اسکروتینیا مورد بررسی قرار گرفت و سپس به منظور شناسایی مکان‌های ژنی دخیل در مقاومت به بیماری از ۱۲۸ جایگاه ژنومی تکثیر شده توسط آغازگرهای رتروترانسپوزونی IRAP استفاده شد. نتایج نشان داد که تنوع بالایی در ژرم‌پلاسم مورد مطالعه برای مقاومت به بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه وجود دارد. بررسی ساختار جمعیت، لاین‌های مورد مطالعه را به ۳ زیرجمعیت احتمالی ($K=3$) تقسیم نمود. در تجزیه ارتباط با دو مدل GLM و MLM به ترتیب ۱۴ و ۱۱ مکان ژنومی پیوسته با مقاومت به بیماری ($P \leq 0.01$) شناسایی شد. نشانگرهای LTR 1063-65، LTR 1064-65 و LTR 1062 با ژن‌های کنترل کننده مقاومت به چندین جدایه قارچ عامل بیماری پیوسته بودند. نشانگرهای مشترک به دلیل تسهیل گزینش همزمان برای ایجاد مقاومت به چندین جدایه قارچی، می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان نظیر انتخاب به کمک نشانگر (MAS) بخوبی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، بیماری قارچی، نشانگر IRAP، تجزیه ارتباط.

مقدمه

Sclerotinia sclerotiorum (Lib) de Bary بیش از ۴۰۰ گونه گیاهی در جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Rojas, 2014; Sharma et al., 2015).

اسکلروتینیا 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 شمال غرب 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 روش مؤثر برای کنترل بیماری اسکلروتینیا می‌باشد (Emamgholi et al., 2015). تاکنون ارقامی با مقاومت کامل به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی در آفتابگردان گزارش نشده است. اما ژنوتیپ‌های مختلف این محصول، سطوح متفاوتی از مقاومت در برابر این بیماری را نشان می‌دهند (Hahn, 2002). از این رو، شناسایی ارقام مقاوم و مکان‌های ژنی کنترل کننده مقاومت به بیماری به به‌نژادگران گیاهی در پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی برای تولید ارقام هیبرید مقاوم به بیماری کمک شایانی می‌نماید.

مقاومت به بیماری اسکلروتینیا 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). به دلیل پیچیدگی صفات کمی،

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) متعلق به تیره Compositae می‌باشد که زراعت آن در سراسر جهان به دلیل زیبایی گل، مصرف آجیلی و تولید روغن انجام می‌گیرد (Vollmann & Rajcan, 2010; Hatami Maleki et al., 2014). ارقام روغنی آفتابگردان به دلیل درصد روغن بالا برای استحصال روغن مورد استفاده قرار می‌گیرند و چهارمین منبع تأمین روغن خوراکی در دنیا محسوب می‌شوند (Anonymous, 2010). جنس *Sclerotinia* متعلق به خانواده Sclerotiniaceae می‌باشد و سه گونه *S. sclerotiorum*، *S. minor* و *S. trifoliorum* به علت انتشار گسترده، دامنه میزبانی وسیع و خسارت سنگین، مهم‌ترین و شناخته شده‌ترین گونه‌های این جنس به شمار می‌روند (Saharan & Mehta, 2008). دامنه میزبانی وسیع (Boland & Hall, 1994)، توان تولید اندام مقاوم و بقاء طولانی مدت قارچ در خاک (Bardin & Huang, 2006; Bolton et al., 2006) و نیز تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف عامل بیماری (Davar et al., 2011)، این قارچ را در زمره یکی از مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی قرار داده است. 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). قارچ

جمعیت‌های در حال تفرق بزرگ غیرممکن است، استفاده می‌شود (Dewan *et al.*, 2006). همچنین در این روش کل ژنوم توسط تعداد زیادی نشانگر برای شناسایی QTL‌های مرتبط با صفات فنوتیپی خاص مورد بررسی قرار می‌گیرد (Rafalski, 2002 a,b; Zhu *et al.*, 2008). نکته حائز اهمیت 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 دهد و باعث ایجاد ارتباطات دروغین نشانگر-صفت^۶ و نتایج مثبت دروغین شود (Zhang *et al.*, 2012). از این رو به منظور به حداقل رساندن ارتباطات دروغین، ابتدا ساختار جمعیت^۷ و روابط خویشاوندی در جمعیت مورد استفاده ارزیابی می‌شود و در تجزیه ارتباط لحاظ می‌گردد (Yu & Buckler, 2006; Pritchard *et al.*, 2000). در این تکنیک، ساختار جمعیت با روش بیزین^۸ ارزیابی شده و اعضای جمعیت به زیرجمعیت-هایی 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 RFLP^۹ (Bert *et al.*, 2002; Mestries *et al.*, 1998) AFLP^{۱۰} (Bert *et al.*, 2002; Davar *et al.*, 2010; Rönicke *et*

به‌نژادگران گیاهی اطلاعات کمی از تعداد ژن‌ها و جایگاه کروموزومی آن‌ها در تظاهر و توزیع فنوتیپی یک صفت کمی دارند. نقشه‌یابی مکان‌های ژنی کمی (QTL^۱) یکی از روش‌هایی است که در دهه اخیر برای مطالعه ژنتیکی صفات کمی توسعه یافته است (Lander & Botstein, 1989). در این روش تفرق همزمان صفت کمی و نشانگرهای مولکولی بررسی شده و عوامل مؤثر در کنترل صفت روی ژنوم شناسایی می‌شود (Mohan *et al.*, 1997). بنابراین، می‌توان از نتایج آن در گزینش به کمک نشانگر (MAS^۲) استفاده نمود (Collard *et al.*, 2005).

برای مکان‌یابی جایگاه‌های کنترل‌کننده صفات کمی از دو روش نقشه‌یابی پیوستگی^۳ و نقشه‌یابی ارتباطی^۴ (نقشه‌یابی عدم تعادل پیوستگی^۵) استفاده می‌شود (Breseghello & Sorrells, 2006). در مقایسه با نقشه‌یابی پیوستگی، تجزیه ارتباطی دارای مزایای زیادی از جمله وضوح بالای QTL، استفاده از ژرم‌پلاسماهای طبیعی و افزایش پوشش آللی می‌باشد (Hall *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2006) و به طور همزمان اجازه نقشه‌یابی چندین صفت را می‌دهد. بنابراین، در این روش نیاز به ایجاد جمعیت‌های دو والدی که خود باعث هزینه اضافی ارزیابی ژنوتیپی و فنوتیپی می‌شود، نیست. از این رو به طور گسترده برای گونه‌های گیاهی که در آن‌ها ایجاد

⁶ - False marker- trait associations

⁷ - Structure

⁸ - Bayesian

⁹ - Restriction fragment length polymorphism

¹⁰ - Amplified fragment length polymorphism

¹ - Quantitative trait loci (QTL)

² - Marker assisted selection (MAS)

³ - Linkage mapping

⁴ - Association mapping (AM)

⁵ - Linkage disequilibrium (LD) mapping

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰۰ لاین خالص آفتابگردان روغنی از نقاط مختلف جهان (ایران، فرانسه، امریکا، مجارستان و صربستان) در گلدان‌های مستطیلی شکل ۶۰×۲۰ سانتی‌متری در محیط پیت ماس در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۶ گیاهچه کشت شدند. گیاهان تا مرحله ۸ برگی در شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۵٪ و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی پرورش یافتند.

مشخصات لاین‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است. واکنش حساسیت لاین‌ها در مقابل شش جدایه قارچ عامل بیماری اسکروتینیا مطالعه شد.

جدایه‌های مورد مطالعه از مناطق آلوده استان آذربایجان غربی که کشت آفتابگردان در آنجا مرسوم است، جمع‌آوری شدند. شش جدایه قارچی مورد مطالعه از نتایج بررسی قدرت بیماری‌زایی ۳۰ جدایه اسکروتینیا (۱۵ جدایه *S. minor* و ۱۵ جدایه *S. sclerotiorum*) روی رقم "فرخ" انتخاب شدند.

Amoozadeh *et al.*, 2015;)¹ SSR، (al., 2005 Darvishzadeh, 2012; Davar *et al.*, 2010; Micic *et al.*, 2004; Micic *et al.*, 2005a,b; و (Rönicke *et al.*, 2005; Yue *et al.*, 2008 Amoozadeh *et al.*, 2015; Fusari *et al.*)² SNP (al., 2012; Talukder *et al.*, 2014 انجام گرفته است.

اخیراً نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها توسعه پیدا کرده‌اند که ویژگی‌هایی از قبیل ثبات، پراکندگی، ساختار حفاظت شده، موتیف‌های پشت سر هم و تعداد نسخه بالا، آن‌ها را به عنوان سیستم‌های نشانگری مناسب و کارا، بخصوص برای بررسی تنوع ژنتیکی و تکاملی درون و بین گونه‌ای معرفی کرده است (Basirnia *et al.*, 2014, 2016). تاکنون پژوهشی در رابطه با شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با بیماری اسکروتینیا در آفتابگردان با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزون انجام نگرفته است.

در پژوهش حاضر با استفاده از داده‌های ژنتیکی حاصل از نشانگرهای رتروترانسپوزونی IRAP³ و داده‌های فنوتیپی حاصل از واکنش ژنوتیپ‌های مختلف آفتابگردان به جدایه‌های مختلف قارچ اسکروتینیا، مکان‌های ژنی مرتبط با مقاومت به بیماری اسکروتینیا شناسایی می‌شوند.

¹ - Simple sequence repeats

² - Single nucleotide polymorphism

³ - Inter-retrotransposon amplified polymorphism

جدول ۱- اسامی لاین‌های آفتابگردان روغنی مورد مطالعه و منشاء آن‌ها.

Table 1- Names of the studied oily sunflower lines and their origin.

لاین Line	کشور Country	مرکز تحقیقاتی Research center	درصد عضویت در زیرجمعیت Q value		
			Q1	Q2	Q3
LC1064C	France	ASGROW	0.01	0.02	0.96
DM2	USA	USDA	0.00	0.00	0.99
H156A/RHA274	France	ASGROW	0.01	0.01	0.97
NS-R5	France	NOVARTIS	0.94	0.01	0.04
8A*/LC1064C	France	ASGROW	0.51	0.01	0.47
HAR4	USA	USDA	0.92	0.02	0.05
SDB1	USA	USDA	0.87	0.01	0.11
AS5305	France	ASGROW	0.91	0.07	0.00
RHA274	USA	USDA	0.11	0.06	0.82
SDR18	USA	USDA	0.01	0.02	0.96
RT931	France	RUSTICA	0.98	0.00	0.01
NS-B5	France	NOVARTIS	0.60	0.28	0.10
SDB3	USA	USDA	0.93	0.00	0.06
803-1	Serbia	IFVC	0.03	0.00	0.95
F1250/03	Hungary	-	0.99	0.00	0.00
HA335B	USA	USDA	0.99	0.00	0.00
TMB 51	France	INRAMONT	0.96	0.00	0.03
LP-CSYB	France	ENSAT	0.00	0.47	0.51
PM1-3	USA	USDA	0.03	0.01	0.96
SDR19	USA	USDA	0.85	0.01	0.14
RHA265	France	ASGROW	0.96	0.02	0.02
QHP1	-	-	0.19	0.04	0.76
RT948	France	RUSTICA	0.97	0.01	0.02
ENSAT-283	France	ENSAT	0.97	0.01	0.02
HA337B	USA	USDA	0.99	0.01	0.00
B454/03	Hungary	-	0.87	0.04	0.09
H100B	France	ASGROW	0.97	0.01	0.01
HA304	USA	USDA	0.98	0.01	0.01
AS5304	France	ASGROW	0.13	0.15	0.71
RHA858	USA	USDA	0.01	0.43	0.56
AS5306	France	-	0.06	0.03	0.90
AS3211	France	ENSAT	0.87	0.01	0.11
ENSAT-254	France	ENSAT	0.14	0.03	0.82
ENSAT-270	France	ENSAT	0.03	0.00	0.96
1009329 2(100K)	France	ENSAT	0.97	0.00	0.02
1009337 (100K)	France	ENSAT	0.98	0.01	0.00
100935 0(100K)	France	ENSAT	0.97	0.02	0.01
5DES20QR	France	BRN	0.95	0.03	0.01
7CR13=PRH6	France	C.F	0.98	0.01	0.01
SSD580	France	ASGROW	0.41	0.56	0.03
SSD581	France	ASGROW	0.01	0.95	0.04
ENSAT-699	France	ENSAT	0.03	0.92	0.04
9CSA3	France	Caussade semences	0.50	0.09	0.40
H049+FSB	France	-	0.55	0.08	0.35
5AS-F1/A2×R2	France	ASGROW	0.88	0.09	0.02
8ASB2	France	ASGROW	0.87	0.10	0.03
12ASB3	France	ASGROW	0.95	0.03	0.01
AS3232	France	ENSAT	0.08	0.83	0.08
15038	Hungary	-	0.01	0.93	0.06

15031	France	ASGROW	0.82	0.17	0.00
H158A×LC1064C	France	ASGROW	0.70	0.04	0.24
H543R/H543R	France	ASGROW	0.00	0.48	0.51
H156/H543R	France	ASGROW	0.75	0.11	0.13
H543R	France	-	0.49	0.28	0.22
H100A/RHA274	France	ASGROW	0.10	0.88	0.01
H205A/83HR4	France	ASGROW	0.71	0.25	0.02
H156A/H543R	France	ASGROW	0.00	0.92	0.07
H209A/83HR4	France	ASGROW	0.08	0.91	0.00
H157A/LC1064	France	ASGROW	0.54	0.15	0.30
H100A/LC1064	France	ASGROW	0.01	0.97	0.01
H100A/90R78	France	ASGROW	0.22	0.02	0.74
AF1POPA	France	NOVARTIS	0.94	0.02	0.03
OES	France	INRAMONT	0.99	0.00	0.00
RHA266	USA	USDA	0.98	0.01	0.00
PAC2	France	ENSAT	0.36	0.57	0.06
AS613	France	ASGROW	0.98	0.01	0.00
11×12	Iran	SPII	0.80	0.17	0.02
H603R	France	INRAMONT	0.63	0.34	0.01
NSF1 A4×R5	France	NOVARTIS	0.52	0.45	0.01
4	Iran	SPII	0.03	0.95	0.00
110	Iran	SPII	0.01	0.39	0.59
28	Iran	SPII	0.73	0.23	0.03
703-CHLORINA	France	ENSAT	0.96	0.00	0.03
30	Iran	SPII	0.96	0.02	0.02
36	Iran	SPII	0.88	0.10	0.01
NSF1 A5×R5	France	NOVARTIS	0.02	0.84	0.13
1059	Iran	SPII	0.13	0.36	0.49
38	Iran	SPII	0.92	0.05	0.02
346	Iran	SPII	0.02	0.96	0.02
CAY	France	ENSAT	0.94	0.05	0.01
A CONTROL PLASTIPIC	France	ENSAT	0.02	0.97	0.00
SDB2	France	INRAMONT	0.79	0.20	0.01
1009370 1(100K)	France	ENSAT	0.89	0.06	0.03
1009370 3(100K)	France	ENSAT	0.97	0.02	0.01
H158A/H543R	France	ASGROW	0.12	0.86	0.02
H100A	France	ASGROW	0.02	0.95	0.02
CSWW2X	France	Caussade semences	0.12	0.83	0.03
H209A/H566R	France	ASGROW	0.08	0.89	0.01
BF1POPB	France	NOVARTIS	0.01	0.98	0.00
AS0-1-POP-A	France	ENSAT	0.02	0.97	0.01
AS6305	France	ENSAT	0.12	0.87	0.00
H205A/H543R	France	ASGROW	0.018	0.972	0.011
H209A/LC1064	France	ASGROW	0.95	0.03	0.01
H100A/83HR4	France	ASGROW	0.22	0.76	0.01
D34	France	INRAMONT	-	-	-
sf 076	-	-	-	-	-
sf 022	-	-	-	-	-
sf-109	-	-	-	-	-
sf-105	-	-	-	-	-
sf-023	-	-	-	-	-

آماره‌های توصیفی برای داده‌های حاصل از ارزیابی واکنش لاین‌ها به هر یک از جدایه‌های قارچی در نرم‌افزار GenStat 12 محاسبه شد. به منظور مکان‌یابی ارتباطی، ابتدا تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق لاین‌ها 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. شبیه‌سازی یا طول دوره Burn in ۱۰۰۰۰۰ و تعداد تکرار MCMC^۳ ۱۰۰۰۰۰ در نظر گرفته شد تا نمودار حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. 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 لاین در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. پس از شبیه‌سازی برای تعیین تعداد بهینه K یا همان تعداد زیرجمعیت‌ها، 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 (GLM)^۴ وابسته به ماتریس Q (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت) و مدل خطی مخلوط (MLM)^۵ وابسته به ماتریس K+Q (ماتریس ضرایب ساختار

سه جدایه A1، M1 و G2 مربوط به گونه S. *minor* و سه جدایه J1، J2 و A37 مربوط به گونه S. *sclerotiorum* بودند. به منظور تهیه مایه^۱ قارچ، جدایه‌ها در محیط آگار دکستروز سیب‌زمینی (PDA, 39 gL⁻¹, pH=6) کشت شده و به مدت ۵ روز در انکوباتور با دمای ۲۵±۱ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند. سپس دیسک‌های میسیلیومی با قطر سه میلی‌متر از حواشی کلنی در حال رشد (با عمر سه روز) بریده شد و در مرحله ۸ برگی (مطابق با الگوی طبیعی آلودگی در مزرعه) در ناحیه یقه ساقه گیاهچه‌ها قرار گرفتند. جهت حفظ رطوبت، بر اساس روش Price and Colhoun (1975) اطراف ساقه و دیسک میسیلیومی با پارافیلیم بسته شد. سه روز پس از مایه‌زنی با هر یک از جدایه‌های قارچ، درصد قسمت نکروزه در ۱ سانتی‌متری پایه ساقه به صورت مشاهده‌ای یادداشت-برداری شد. بازه زمانی ۳ روز، بر اساس مطالعات قبلی (Davar *et al.*, 2010; Amoozadeh *et al.*, 2015) و همچنین بررسی درصد آلودگی رقم شاهد "فرخ" انتخاب شد. برای ارزیابی ساختار ژنتیکی لاین‌های مورد مطالعه و تجزیه ارتباط، از ۱۲۸ جایگاه ژنومی تکثیر شده توسط آغازگرهای رتروترانسپوزونی IRAP (Basirnia *et al.*, 2016) استفاده شد. توالی نشانگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آمده است.

³ - Markov Chain Monte Carlo

⁴ - General linear model

⁵ - Mixed linear model

¹ - Inoculum

² - Potato dextrose agar

A37 و M1 از دو گونه مختلف قارچ اسکروتینیا نشان داد، می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی این محصول جهت تولید ارقام مقاوم مورد استفاده قرار گیرند.

در پژوهش حاضر برای ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه، از ۱۲۸ جایگاه ژنومی تکثیر شده توسط آغازگرهای رتروترانسپوزونی IRAP (Basirnia et al., 2016) استفاده شد. ساختار ژنتیکی جمعیت و دسته‌بندی دقیق افراد به زیرجمعیت‌های مناسب به روش بیزین و با استفاده از نرم‌افزار Structure انجام گرفت. این روش هر یک از ژنوتیپ‌ها را با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی متناسب می‌کند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد (Pritchard et al., 2000). 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 اوج منحنی است (K=3) که به عنوان K بهینه در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس عضویت افراد در هر کلاستر (ماتریس Q) در نظر گرفته شد.

جمعیت + ماتریس روابط خویشاوندی جهت جلوگیری از ارتباط کاذب بین نشانگر- صفت) با نرم‌افزار TASSEL 2.1 انجام گرفت.

نتایج و بحث

مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین و انحراف معیار ارزش فنوتیپی درصد آلودگی لاین‌های آفتابگردان به جدایه‌های قارچ اسکروتینیا در جدول ۳ نشان داده شده است. طبق این نتایج، حداقل درصد آلودگی لاین‌ها در پاسخ به جدایه‌های قارچی مورد استفاده ۳۰/۶۷ و حداکثر آلودگی ۱۰۰ درصد بود. کمترین و بیشترین میانگین درصد آلودگی به ترتیب در پاسخ به جدایه قارچی A37 و J1 از گونه *S. sclerotiorum* مشاهده شد. هیچ کدام از لاین‌ها به جدایه‌های قارچی J1، G2 و A1 مقاومتی نشان ندادند. این در حالی است که لاین‌های بیشتری به جدایه قارچی A37 از گونه *S. Sclerotiorum*، H543R/H543R، 1059 و 8A*/LC1064C حداقل به دو جدایه قارچی مقاوم بودند. طبق نتایج حاصل از این پژوهش، ژرم‌پلاسم آفتابگردان روغنی مورد مطالعه از نظر درصد آلودگی به جدایه‌های قارچی مورد استفاده تنوع بالایی نشان داد. لاین‌هایی با درصد آلودگی پایین همچون لاین 8A*/LC1064C که کمترین درصد آلودگی را در پاسخ به دو جدایه قارچی

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.

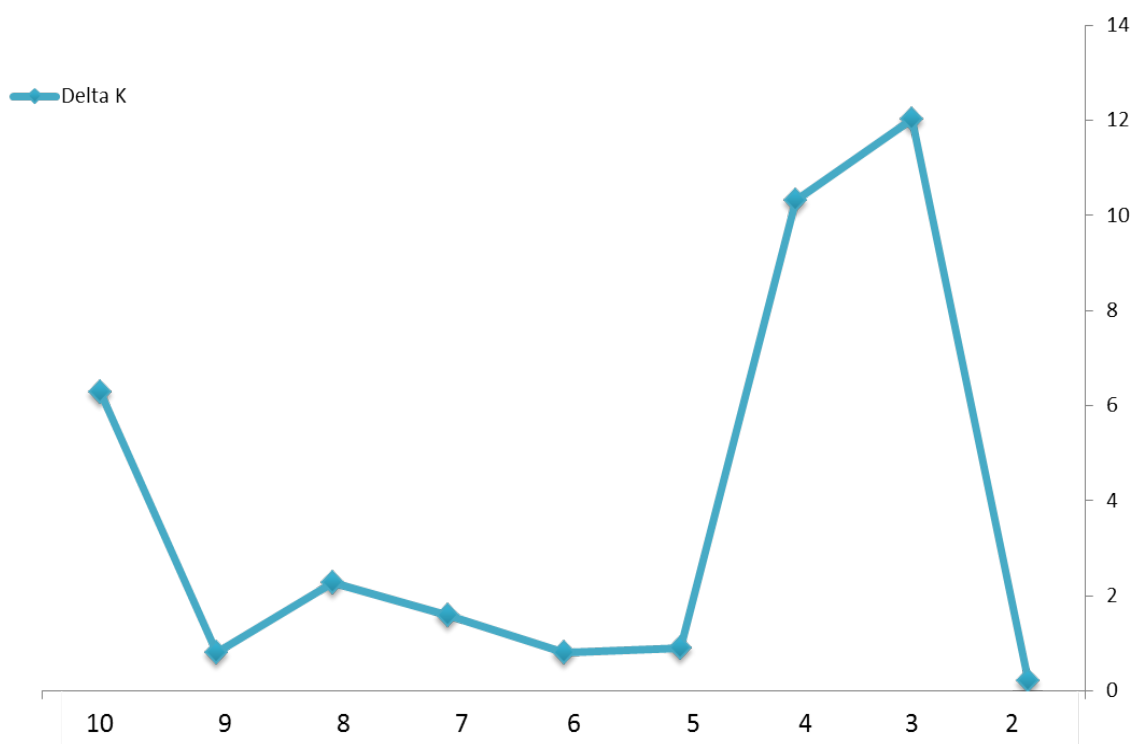
IRAP آغازگرهای	توالی (5'→3')	دمای اتصال	اندازه باند
IRAP primers	Sequence (5'→3')	(درجه سانتی‌گراد)	(جفت‌باز)
		Annealing temperature (°C)	Band length (bp)
LTR 1061	AGAGGGGAATGTGGGGGTTTCC	-	-
LTR 1062	TCTCTATTTATAGCCGGAGAGGTG	57	750-2500
LTR 1063	GATCCGGTTTCACGGGACTTAC	-	-
LTR 1064	CGAAGAACAACCGAATCACC	-	-
LTR 1065	AGCCTCTGAAAGACTCGTTCG	56	500-3000
CF	GGTTTAGGTTTCGTAATCCTCCGCG	60	500-3000
CR	ACAGACACCAGTGGCACCAAC	58	250-1500
UF(U81)	TAACGGTGTCTGTTTTGCAGG	58	300-2500
UR1(U82)	AGAGGGGAATGTGGGGGTTTCC	56	1000-3000

جدول ۳- آماره‌های توصیفی درصد آلودگی در ژرم‌پلاسم آفتابگردان روغنی مورد مطالعه در پاسخ به جدایه‌های قارچ اسکروتینیا.

Table 3- Descriptive statistics of fungal infection percentage of the studied oily sunflower germplasm in responses to Sclerotinia fungal isolates.

جدایه	گونه	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف معیار
قارچی	Species	درصد نکروز	درصد نکروز	درصد نکروز	STDEV
Fungal isolate		Min of necrosis%	Max of necrosis%	Mean of necrosis%	
J1	<i>S. sclerotiorum</i>	90	100	96.83	2.06
M1	<i>S. minor</i>	58.33	100	90.79	8.81
G2	<i>S. minor</i>	64	100	94.23	6.71
J2	<i>S. sclerotiorum</i>	30.67	100	90.25	10.83
A1	<i>S. minor</i>	69.33	100	88.51	8.27
A37	<i>S. sclerotiorum</i>	39.33	100	82.67	14.71
Fungal isolate	جدایه قارچی	لاین‌های مقاوم Resistant lines			
J1	-				
M1	8A*/LC1064C, ENSAT-699, 1009370 1(100K), H209A/LC1064				
G2	-				
J2	H543R/H543R, 110, 1059, NSF1 A4×R5				
A1	-				
A37	8A*/LC1064C, HAR4, RHA274, RT931, F125/03, H049+FSB, ASB28, H543R/H543R, H100A/RHA274, H100A/LC1064, AF1POPA, OES, 1059, H100A/83HR4				

STDEV: Standard deviation

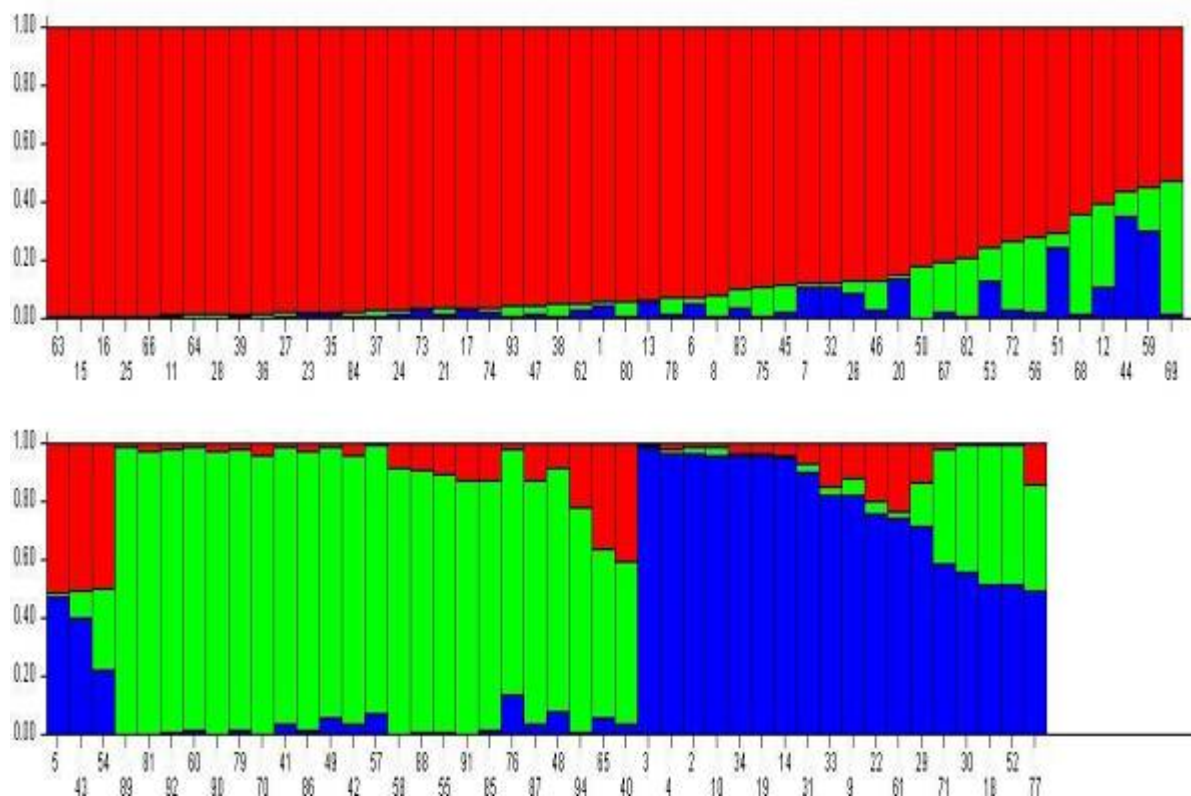


شکل ۱- برآورد تعداد زیرجمعیت در ژرم پلاسم آفتابگردان روغنی مورد مطالعه ($K=3$) بر اساس نشانگرهای IRAP در نرم افزار Structure.

Figure 1- Estimation of subpopulation number ($K=3$) in the studied oily sunflower germplasm according to IRAP markers using Structure software.

(شکل ۲). به طور کلی ۷۴ درصد افراد مورد مطالعه دارای درصد عضویت بیشتر و مساوی ۰/۷ و ۲۶ درصد افراد دارای سهم عضویت کمتر از ۰/۷ می باشند. درصد عضویت لاین های مورد مطالعه در زیرجمعیت های شناسایی شده (ماتریس Q) در جدول ۱ آمده است.

بر اساس نتایج ارائه شده در بارپلات از کل ژنوتیپ های مورد مطالعه با احتمال بیشتر از ۷۰ درصد عضویت لاین ها، ۴۴ درصد ژنوتیپ ها به ساختار اول (قرمز)، ۱۸ درصد به ساختار دوم (سبز) و ۱۲ درصد به ساختار سوم (آبی) و ۲۶ درصد افراد به ساختار مختلط تعلق داشتند



شکل ۲- بارپلات تجزیه ساختار ژرم پلاسما آفتابگردان روغنی مورد مطالعه بر اساس ۱۲۸ مکان ژنی حاصل از نشانگرهای IRAP با استفاده از مدل Bayesian. هر رنگ یک زیرجمعیت یا کلاستر را نشان می‌دهد. اعداد محور افقی و عمودی به ترتیب بیانگر شماره و ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر می‌باشد.

Figure 2- Bar plot of structure analysis of the studied oily sunflower germplasm according to 128 loci of IRAP using Bayesian model. Each color shows one subpopulation or cluster. The numbers on horizontal and vertical axes correspond to the number and the membership coefficient of each individual, respectively.

استفاده می‌شود (Pritchard & Donnelly, 2001). در مطالعات تجزیه ارتباط، در حالت ایده‌آل نباید ساختاری در جمعیت مورد مطالعه وجود داشته باشد. یعنی جمعیت نباید خود به لحاظ ساختاری به زیرجمعیت‌ها تقسیم شود. زیرا وجود ساختار در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند عامل بازدارنده‌ای در جهت دستیابی به نتایج قابل اعتماد باشد. در صورتی که اثر

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, 2003; Rostok et al., 2006). آگاهی از ساختار جمعیت به عنوان یک پیش‌نیاز در نقشه‌یابی ارتباطی می‌تواند برای جلوگیری از ارتباطات مثبت دروغین بین نشانگرها و صفات

کنترل کننده مقاومت جزئی به جدایه A1 و ۱ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت جزئی به جدایه A37 شناسایی شدند.

نشانگرهای مولکولی شناسایی شده ۰/۴ تا ۱۰ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توجیه می‌نمایند. در مکان‌یابی ارتباطی با استفاده از مدل MLM، ۱۱ نشانگر ارتباط معنی‌داری ($P \leq 0.01$) با مقاومت به جدایه‌های قارچ اسکروتینیا نشان دادند.

تعداد ۱ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت جزئی به جدایه J1، ۲ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت جزئی به جدایه M1، ۳ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت جزئی به جدایه G2، ۲ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت جزئی به جدایه J2، ۲ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت جزئی به جدایه A1 و ۱ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت جزئی به جدایه A37 شناسایی شدند. طبق این نتایج، تمامی نشانگرهای موجود در جدول ۴ به جزء نشانگرهای 5 LTR 1063-65 و UF 1 در هر دو مدل ارتباطی GLM و MLM ارتباط معنی‌داری با مقاومت به جدایه‌های قارچ اسکروتینیا نشان دادند.

عوامل ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در تجزیه ارتباط در نظر گرفته نشود، نتایج مثبت کاذب به وجود خواهد آمد (Breseghello & Sorrells, 2006). تجزیه ساختار جمعیت با نرم‌افزار Structure امکان شکستن کل جمعیت به زیرجمعیت‌هایی با ساختارهای متفاوت را فراهم می‌سازد و چنانچه لاین‌ها به صورت اختلاط یافته باشند، پس از انجام این تجزیه قابل تشخیص خواهند بود (Dadras, 2012).

به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با مقاومت به جدایه‌های قارچ اسکروتینیا، تجزیه ارتباطی بر اساس مدل خطی عمومی (GLM) و مدل خطی مخلوط (MLM) انجام گرفت (جدول ۴). بر اساس مدل ارتباطی GLM، ۱۴ نشانگر (مکان ژنی) ارتباط معنی‌داری ($P \leq 0.01$) با مقاومت به جدایه‌های قارچ اسکروتینیا داشتند.

تعداد ۲ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت جزئی به جدایه J1، ۲ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت جزئی به جدایه M1، ۴ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت جزئی به جدایه G2، ۲ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت جزئی به جدایه J2، ۳ نشانگر پیوسته با ژن‌های

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

Table 4- IRAP 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).

صفت Trait	نشانگر Marker	مدل خطی عمومی		مدل خطی مخلوط	
		General linear model (GLM) P-value	R ²	Mixed linear model (MLM) F	P-value
جدایه J1	LTR 1063-65 2	0.006	0.04	7.0735	0.0095
J1 isolate	LTR 1063-65 5	0.0073	0.07	-	-
جدایه M1	CF-CR 10	0.0011	0.003	11.4684	0.0011
M1 isolate	LTR 1062 6	0.0024	0.01	10.0328	0.0024
جدایه G2	LTR 1063-65 5	0.0011	0.004	-	-
	LTR 1061-65 7	0.0016	0.005	10.6745	0.0016
G2 isolate	CR-UR1 5	0.0053	0.05	8.1602	0.0053
	LTR 1062 5	0.0082	0.09	7.5125	0.008
جدایه J2	LTR 1063-65 4	0.0042	0.02	8.7418	0.0041
J2 isolate	LTR 1064-65 4	0.006	0.07	7.9608	0.006
جدایه A1	CR 3	0.0028	0.01	8.2473	0.0051
	UF 1	0.0049	0.03	-	-
A1 isolate	CR 9	0.0066	0.07	7.0362	0.0095
جدایه A37					
A37 isolate	LTR 1064-65 10	0.0087	0.10	7.1946	0.0088

شناسایی نشانگرهای پیوسته با تغییرات فنوتیپی در صفات آگروموفولوژیک ذرت از مدل MLM به منظور بهبود نتایج و کاهش نتایج مثبت دروغین استفاده نمودند و بر اساس اظهار محققین نتایج دقیق‌تری در مقایسه با مدل GLM بدست آمد. به نظر می‌رسد مدل MLM برای مکان‌یابی ارتباطی مدل قابل اطمینانی باشد. طبق نتایج حاصل از پژوهش حاضر، نشانگرهای LTR 1063-65، LTR 1064-65 و LTR 1062 با ژن‌های کنترل کننده مقاومت

به طور کلی برای مکان‌یابی ارتباطی دو روش GLM و MLM پیشنهاد شده است. امروزه روش آماری MLM به طور گسترده‌ای برای تجزیه ارتباط در گیاهان استفاده می‌شود (Ghavami et al., 2011).

در مطالعه‌ای Saeed et al. (2014) در مکان-یابی ارتباطی تحمل به شوری در ژرم‌پلاسما پنبه گزارش کردند که استفاده از مدل MLM باعث کاهش ارتباطات کاذب نشانگر-صفت می‌شود. همچنین Yu and Buckler (2006) در

al. (2002) شناسایی کردند. این جایگاه‌های ژنی ۳/۳ تا ۳۶/۷ درصد از تنوع فنوتیپی صفت را توجیه می‌نمودند.

در پژوهشی *Rönicke et al.* (2005) با استفاده از نشانگرهای SSR پنج جایگاه ژنی برای مقاومت به پوسیدگی طبق مکان‌یابی کردند که ۱۰/۶ تا ۱۷/۱ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توجیه می‌نمودند. همچنین *Micic et al.* (2005) با استفاده از نشانگرهای SSR دو جایگاه ژنی روی گروه‌های پیوستگی ۸ و ۱۶ و سه QTL برای مقاومت جزئی به پوسیدگی ساقه روی گروه‌های پیوستگی ۴، ۱۰ و ۱۷ شناسایی کردند. در پژوهشی دیگر *Yue et al.* (2008) با استفاده از نشانگرهای SSR هفت QTL برای مقاومت جزئی به بیماری اسکروتینیا آفتابگردان شناسایی کردند که ۸/۴ تا ۳۴/۵ درصد از تغییرات داده‌های مربوط به شدت بیماری را توجیه می‌نمودند.

همچنین *Davar et al.* (2010) با استفاده از نشانگرهای SSR هفت QTL برای مقاومت جزئی به پوسیدگی اسکروتینیا ساقه روی گروه‌های پیوسته ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۴ و ۱۷ شناسایی کردند. در پژوهشی دیگر *Fusari et al.* (2012) در بررسی ارتباط بین داده‌های حاصل از واکنش لاین‌های خالص آفتابگردان در برابر قارچ اسکروتینیا و پروفیل مولکولی افراد بر اساس نشانگرهای SNP و ژن‌های کاندید با مدل MLM ژن کانیدی (HaRIC-B) شناسایی کردند که ۲۰ درصد از تغییرات داده‌های فنوتیپی را توجیه

به چندین جدایه قارچی عامل بیماری اسکروتینیا پیوسته بودند. وجود نشانگرهای مشترک می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل 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 را در آفتابگردان با استفاده از نشانگرهای RFLP شناسایی کردند که ۱۲/۳ تا ۱۷/۵ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توجیه می‌نمودند. در پژوهشی *Bert et al.* (2002) سه جایگاه ژنی روی گروه‌های پیوستگی ۶، ۸ و ۱۳ برای مقاومت به گسترش میسلومی 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.

همچنین *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 *Tang et*

می‌نمود. طبق نتایج آن‌ها با مدل GLM

به ترتیب ۲، ۵ و ۱۲ مکان و با مدل MLM ۲، ۵ و ۱۱ مکان ژنی مرتبط با صفات مورد ارزیابی شناسایی شد.

تکنیک نقشه‌یابی ارتباطی در سایر گیاهان زراعی مانند گندم (Liu, 2011)، جو (Wang et al., 2012) و ذرت (Anderson et al., 2007) نیز استفاده شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد تنوع بالایی در ژرم‌پلاسما آفتابگردان مورد مطالعه در پاسخ به بیماری اسکروتینیا وجود دارد. طبق این نتایج، لاین‌های H543R/H543R، 1059 و 8A*/LC1064C به دو جدایه قارچ عامل بیماری اسکروتینیا مقاوم بودند.

لاین 8A*/LC1064C به دلیل اینکه کمترین درصد آلودگی را در پاسخ به دو جدایه قارچ دو گونه مختلف اسکروتینیا نشان داد، از پتانسیل بالایی برای استفاده در پروژه‌های به‌نژادی برخوردار است.

بررسی ساختار جمعیت با ۱۲۸ مکان رتروترانسپوزونی IRAP، لاین‌ها را به ۳ زیرجمعیت احتمالی (K=۳) تقسیم نمود. در تجزیه ارتباطی با استفاده از مدل MLM و GLM به ترتیب ۱۱ و ۱۴ نشانگر با ارتباط معنی‌دار با مناطق ژنومی درگیر در مقاومت جزئی به جدایه‌های اسکروتینیا شناسایی شدند.

نتایج حاصل، کارایی استفاده از روش تجزیه

همچنین Talukder et al. (2014) در بررسی ارتباط بین داده‌های حاصل از ارزیابی واکنش لاین‌های آفتابگردان در مقابل قارچ عامل بیماری اسکروتینیا و پروفیل مولکولی افراد با نشانگرهای SNP و ژن‌های کاندید حاصل از آرآیدوپسیس، با دو مدل MLM و GLM ۲۷ نشانگر SNP با ارتباط معنی‌دار با مقاومت به بیماری شناسایی کردند.

در پژوهش آن‌ها ژن‌های HaCOI1-1 و HaCOI1-2 که ۷/۴ درصد تغییرات فنوتیپی را توجیه می‌نمودند، برای اصلاح مقاومت به پوسیدگی اسکروتینیایی انتخاب شدند. در پژوهشی تجزیه ارتباطی صفات فنوتیپی لاین‌های آفتابگردان مورد استفاده در این تحقیق نیز انجام شده است.

در پژوهشی Sahranavard Azartamar et al. (2015) در تجزیه ارتباط برای ۱۲ صفت اگرومورفولوژیک در لاین‌های آفتابگردان روغنی مورد استفاده در این تحقیق بر اساس نشانگرهای SSR و مدل‌های GLM و MLM به ترتیب ۹ و ۱۶ مکان شناسایی نمودند که تغییرات قابل توجهی از صفات فنوتیپی را توجیه می‌نمودند.

در پژوهشی Jannatdoust et al. (2015) به منظور نقشه‌یابی ۹ صفت مورفولوژیک مهم مرتبط با دانه در ۴۸ توده مختلف آفتابگردان آجیلی تحت شرایط نرمال، تنش ملایم و شدید خشکی از ۱۲ آغازگر مبتنی بر رتروترانسپوزون استفاده نمودند.

مناطق ژنومی پیوسته با عوامل کنترل کننده مقاومت به بیماری پس از اعتبارسنجی^۱ و نقشه‌یابی دقیق^۲ می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان برای انتخاب به کمک نشانگر و تولید ارقام مقاوم به این بیماری مفید واقع گردد.

سپاسگزاری

از دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه و بنیاد ملی نخبگان ریاست جمهوری به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد. از انستیتو تحقیقات آگرونومی تولوز فرانسه نیز به خاطر در اختیار قرار دادن بذور لاین‌های آفتابگردان تشکر می‌گردد.

ارتباطی را در شناسایی نشانگرهای مرتبط با مقاومت به بیماری در لاین‌های آفتابگردان نشان می‌دهد.

طبق نتایج حاصل از این پژوهش، نشانگرهای LTR 1063-65، LTR 1064-65 و LTR 1062 با ژن‌های کنترل کننده مقاومت به چندین جدایه قارچی عامل بیماری اسکلروتینیا پیوسته بودند. شناسایی نشانگرهای مشترک به دلیل اینکه گزینش همزمان مقاومت به چند جدایه قارچی را امکان‌پذیر می‌سازد، در پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی این محصول اهمیت دارد.

¹ - Validation

² - Fine mapping

- 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.
- Andersen JR, Zein I, Wenzel G, Krützfeldt B, Eder J, Ouzunova M, Lübberstedt T (2007). High levels of linkage disequilibrium and associations with forage quality at a Phenylalanine Ammonia Lyase locus in European maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 307–319.
- Anonymous (2010). Agribusiness handbook: sunflower crude and refined oil. FAO/EBRD.
- Bardin SD, Huang HC (2001). Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 88–98.
- 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.
- Basirnia A, Darvishzadeh R, Abdollahi Mandoulakani B, Nabipur A (2014). Assessment of genetic diversity in Iranian confectionary sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations using retrotransposon based IRAP markers. *Journal of Agricultural Biotechnology* 6: 19-33 (In Persian).
- 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.
- Bert PF, 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.
- Boland GJ, Hall R (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16: 93-108.
- Bolton MD, Thomma BP, Nelson BD (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7: 1-16.
- Breseghele F, Sorrells ME (2006). Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics* 172: 1165-1177.
- Cardon LR, Palmer LJ (2003). Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 361: 598-604.
- 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.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- Dadras AR (2012). Evaluation of genetic diversity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars using AFLP molecular markers. M.Sc. Thesis. Shahib Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
- 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.

- Davar R, Darvishzadeh R, Majd A (2011). Genotype-isolate interaction for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 442-449.
- 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.
- Dewan 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: 989-992.
- 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.
- Ershad J (1995). Fungi of Iran. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) Publisher, Tehran, Iran.
- 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.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- Fusari CM, Di-Rienzo JA, Troglia C, Nishinakamasu V, Moreno MV, Maringolo C, Quiroz F, Álvarez D, Escande A, Hopp E, Heinz R, Lia VV Paniego NB (2012). Association mapping in sunflower for sclerotinia head rot resistance. *BMC Plant Biology*. Doi: 10.1186/1471-2229-12-93.
- 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.
- Ghavami F, Elias EE, Mamidi O, Ansari M, Sargolzaei T, Adhikari M, Mergoum-Kianian SF (2011). Mixed model association mapping for *Fusarium* head blight resistance in Tunisian-derived durum wheat population. *G3:Genes/Genomes/Genetics*: 1: 209-218.
- Gulya TJ K, Rashid Y, Masirevic SN (1997). Sunflower diseases, In: sunflower technology and production. Madison, Wisconsin, USA, pp. 263-379.
- Hahn V (2002). Genetic variation for resistance to *Sclerotinia* head rot in sunflower inbred lines. *Field Crop Research*, 77: 153-159.
- Hall D, Tegström C, Ingvarsson PK (2010). Using association mapping to dissect the genetic basis of complex traits in plants. *Briefings in Functional Genomics* 9: 157-165.
- Hatami Maleki H, Darvishzadeh R, Mohseni Z (2014). Evaluation of genetic diversity and classification of advanced sunflower lines using ISSR Markers. *Journal of Agricultural Biotechnology* 6: 33-44 (In Persian).
- Hittalmani S, Huang N, Courtois B, Venuprasad R, Shashidhar HE, Zhuang JY, Zheng KL, Liu GF, Wang GC, Sidhu JS, Srivantaneeyakul S, Singh VP, Bagali PG, Prasanna HC, McLaren G, Khush GS (2003). Identification of QTL for growth and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 679-90.
- 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.
- Jun TH, Van K, Kim MY, Lee SH, Walker DR (2008). Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica* 62: 179-191.
- Lander ES, Botstein D (1989). Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.

- 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.
- 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.
- Micic Z, Hahn V, Bauer E, Schön CC, Knapp J, Tang S, Melchinger AE (2004). QTL mapping of *Sclerotinia* midstalk-rot resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1474-1484.
- Micic Z, Hahn V, Bauer E, Schon CC, Melchinger AE (2005a). QTL mapping of resistance to *Sclerotinia* mid-stalk rot in RIL of sunflower population NDBLOSsel×CM625. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 1490-1498.
- Micic Z, Hahn V, Bauer E, Melchinger AE, Knapp SJ, Tang S, Schön CC (2005b). Identification and validation of QTL for *Sclerotinia* mid-stalk rot resistance in sunflower by selective genotyping. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 233-242.
- Mohan M, Nair S, Bhagwat A, Krishna TG, Yano M, Bhatia CR, Sasaki T (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3: 87-103.
- 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.
- Pritchard JK, Stephens MN, Rosenberg N, Donnelly P (2000). Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics* 67: 170-181.
- Pritchard JK, Donnelly P (2001). Case control studies of association in structured or admixed populations. *Theoretical Population Biology* 60: 227-237.
- Rafalski A (2002a). Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 94.
- Rafalski JA (2002b). Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Science* 162: 329-333.
- Rojas EV (2014). Physiological, anatomical and molecular characterization of partial resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. Ph.D Thesis. University of Guelph, Canada.
- Rönicke 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.
- Rostok N, Ramsay L, MacKenzie K, Cardle L, Bhat PR (2006). Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18656-18661.
- 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.
- Saharan GS, Mehta N (2008). Economic importance. *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management*. Springer Publisher.
- 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.

- Sharma R, Meena PD, Verma PR, Saharan GS, Naresh M, Singh D, Arvind-Kumar A (2015). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causing Sclerotinia rot in oilseed Brassicas: A review. *Journal of Oilseed Brassica* 6: 1-44.
- Talukder ZI, Hulke BS, Qi L, Scheffler BE, Pegadaraju V, McPhee K, Gulya Tj (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.
- Tang S, Yu JK, Slabaugh MB, Shintani DK, Knapp SJ (2002). Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 1124-1136.
- Tuberosa R, Salvi S, Sanguineti MC, Landi P, Maccaferri M, Conti S (2002). Mapping QTLs regulating morphophysiological traits and yield in drought stressed maize: case studies, shortcomings and perspectives. *Annals of Botany* 89: 941-963.
- Yu JM, Buckler ES (2006). Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 155-160.
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Vroh Bi I, Yamasaki M, Doebley JF, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland JB, Kresovich S, Buckler ES (2006). A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics* 38: 203-208.
- Yue B, Radi SA, Vick BA, Cai X, Tang S, Knapp SJ, Gulya TJ, Miller JF, Hu J (2008). Identifying quantitative trait loci for resistance to Sclerotinia head rot in two USDA sunflower germplasms. *Phytopathology* 98: 926-931.
- Vollmann J, Rajcan I (2010). Oil Crop Breeding & Genetics, In: Vollmann J, Rajcan I (Eds.), *Oil Crops*. Springer, New York, pp. 1-30.
- 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.
- Zhang Q, Wu C, FY, Ren FY, and Zhang C (2012). Association analysis of important agronomical traits of maize inbred lines with SSRs. *Australian Journal of Crop Science* 6: 1131-1138.
- Zhu C, Gore M, Buckler ES, Yu J (2008). Status and prospects of association mapping in plants. *Plant Genome* 1: 5-20.

Identification of retrotransposon-based (IRAP) loci associated with resistance to Sclerotinia stem rot disease (*Sclerotinia* spp.) in sunflower

Najafzadeh R.¹, Darvishzadeh R.*², Musa-Khalifani Kh.³, Abrinbana M.⁴

¹Postdoctoral, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran and National Elites Foundation, Tehran, Iran and Assistant Professor, Department of Medicinal Plants, Shahid Bakeri Higher Education Center, Urmia University, Miyandoab, Iran.

²Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran and Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.

³M.Sc. Graduate, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.

⁴Assistant Professor, Department of Plant Protection, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

Sclerotinia disease is important fungal disease of sunflower in Iran that reduces its growth and yield. In this study, reactions of 100 oily sunflower lines to 6 fungal isolates of *Sclerotinia* were studied and then 128 retrotransposon-based molecular markers (IRAP) were used to identify genes controlling disease resistance. The results showed that there is high diversity in the studied germplasm for resistance to the *Sclerotinia* stem rot. Population structure analysis subdivided the studied lines into 3 subpopulations (K=3). Association analysis with general and mixed linear models (GLM and MLM) identified 14 and 11 loci, respectively that are significantly associated ($P \leq 0.01$) with *Sclerotinia* disease resistant genes. Markers LTR 1063-65, LTR 1064-65 and LTR 1062 were commonly associated with resistant to some fungal isolates. The common markers due to facilitating simultaneous selection for resistance to several fungal isolates can be well used in sunflower breeding programs like marker-assisted selection (MAS).

Keywords: *Associated analysis, Fungal disease, IRAP marker, Sunflower.*

* Corresponding Author: Darvishzadeh R. Tel: 09149734458

Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

