

شناسایی نشانگرهای میکروساتلایت پیوسته با نواحی ژنومی دخیل در مقاومت به جدایه های عامل بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی یقه ساقه در آفتابگردان روغنی (*Helianthus annuus* L.) در شرایط کنترل شده

خدیدجه موسی خلیفانی^۱، رضا درویش زاده^{۲*}، مسعود ابرین بنا^۳ و آرام نوری^۱

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۲- استاد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۳- استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۳)

چکیده

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) یک محصول مهم زراعی می باشد که روغن آن ارزش غذایی و اقتصادی بالایی دارد. پوسیدگی پایه ی ساقه که توسط قارچ های *Sclerotinia sclerotiorum* و *S. minor* ایجاد می شود، یکی از بیماری های مهم و مخرب آفتابگردان است. استفاده از ارقام مقاوم به عنوان مهمترین و موثرترین روش برای کنترل بیماری در نظر گرفته می شود. در پژوهش حاضر، ارتباط و پیوستگی بین ۳۰ جفت نشانگر ریزماهواره با مقاومت به سه جدایه *S. sclerotiorum* و سه جدایه *S. minor* در ۱۰۰ لاین آفتابگردان با استفاده از نرم افزارهای Structure و Tassel مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس ۳۰ جفت نشانگر ریزماهواره مورد استفاده در این مطالعه، ساختار ژنتیکی جمعیت به دو زیر جمعیت ($K=2$) تقسیم گردید که نتایج حاصل از رسم بارپلات نیز مؤید آن بود. در تجزیه ارتباط با استفاده از نرم افزار TASSEL از طریق دو روش GLM و MLM، به ترتیب ۱۴ و ۱۲ نشانگر SSR شناسایی شد که ارتباط معنی داری با نواحی ژنومی کنترل کننده مقاومت به بیماری داشتند و تغییرات قابل توجهی از صفت را توجیه نمودند. شناسایی نشانگرهای مشترک مانند نشانگر ORS617 برای جدایه های M1 از گونه *S. minor* و J1 از گونه *S. sclerotiorum* می تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل مقاومت به این جدایه ها باشد. به دلیل اینکه این نشانگرها گزینش همزمان مقاومت به چندین جدایه قارچی را امکان پذیر می سازد، در برنامه های به نژادی آفتابگردان جهت انتخاب به کمک نشانگر (MAS) و تولید ارقام مقاوم به بیماری اهمیت اساسی دارد.

واژگان کلیدی: آفتابگردان، پوسیدگی اسکروتینیایی، عدم تعادل پیوستگی، مقاومت افقی، مکان یابی ژن

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

مقدمه

آفتابگردان به عنوان گیاهی یکساله، دارای گونه‌های دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید است که آفتابگردان زراعی (*Helianthus annuus* L.) جزو گونه‌های دیپلوئید با تعداد کروموزوم پایه $n=17$ می‌باشد (Anonymous, 2010). سطح زیر کشت جهانی آفتابگردان در سال ۲۰۱۶ حدود ۲۶۲۰۵۳۳۷ هکتار با میزان تولید ۴۷۳۴۵۰۳۶ تن تخمین زده شده است (FAO, 2016). در این سال سطح زیر کشت آفتابگردان در ایران ۴۱۱۱۹ هکتار و میزان تولید ۳۹۸۵۵ تن برآورد شده است. ارقام زراعی آفتابگردان شامل دو نوع آجیلی و روغنی است (Abdulah and Al-Mosawi, 2010) که ارقام روغنی آفتابگردان به دلیل درصد روغن بالا برای استحصال روغن مورد استفاده قرار می‌گیرند. ارقام روغنی آفتابگردان حدود ۸ درصد از کل تولید دانه‌های روغنی دنیا را به خود اختصاص داده‌اند و پس از سویا (۵۵ درصد)، کلزا (۱۴ درصد) و پنبه دانه (۱۰ درصد)، چهارمین منبع تامین روغن خوراکی در دنیا محسوب می‌گردند (Anonymous, 2010). روغن آفتابگردان حاوی ویتامین‌های محلول در چربی شامل D, E, A و K (Bhutta, 1998)، غنی از اسیدهای چرب غیراشباع لینولئیک و فامد کلسترول است و به همین دلیل جزو روغن‌هایی با مرغوبیت بالا محسوب می‌شود (Sharfun-Nahar and Hashmi, 2005).

گونه‌های جنس *Sclerotinia* قارچ‌هایی نکروتروف^۱ هستند که طیف میزبانی وسیعی دارند. گونه *S. trifoliorum* گیاهان تیره بقولات را آلوده می‌کند در حالی که دو گونه *S. sclerotiorum* و *S. minor* طیف میزبانی وسیع‌تری دارند، به طوری که *S. sclerotiorum* بیش از ۴۰۰ گونه گیاهی متعلق به ۷۵ تیره و *S. minor* بیش از ۹۰ گونه متعلق به ۲۱ تیره گیاهی از جمله بسیاری از گیاهان زراعی ارزشمند را آلوده می‌کنند. مهم‌ترین محصولات مورد حمله این قارچ‌ها شامل سویا، آفتابگردان، کلزا، بادام زمینی، توتون و سبزیجاتی همچون

کاهو، لوبیا، هویج، سیب‌زمینی، کلم، کرفس، کدو، هندوانه، بقولات مانند یونجه و شبدر و تعدادی گیاهان زینتی می‌باشند (Boland and Hall, 1994; Bolton et al., 2006; Duan et al., 2014; Gomes et al., 2011; Saharan and Mehta, 2008). دو گونه *S. sclerotiorum* و *S. minor* چرخه زندگی، نحوه آلوده‌سازی و علائم مشابهی در گیاهان از جمله آفتابگردان ایجاد می‌کنند. علائم در محل‌های آلوده ابتدا به صورت لکه‌های کشیده و آب سوخته ظاهر می‌شود که به تدریج میسلیوم سفید رنگ و پنبه مانند قارچ روی آنها را می‌پوشاند و بافت قسمت آلوده نکروزه می‌شود. در مراحل پیشرفته بیماری، علائمی چون زردی و پژمردگی در برگ‌ها و حتی در مواردی در کل گیاه بروز می‌کند و معمولاً در نهایت گیاه خشک شده و از بین می‌رود (Gaetan and Madina, 2005). در ایران، پوسیدگی ساقه آفتابگردان یک تهدید بالقوه برای محصول آفتابگردان محسوب می‌شود (Davar et al., 2010). کنترل شیمیایی معمولاً مؤثر نبوده و یا دشوار است (Hahn, 2002). بنابراین توسعه ارقام با مقاومت بالا در برابر تمام اشکال بیماری اسکروتینیا از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. از آنجایی که مقاومت به این بیماری بصورت چندژنی کنترل شده و تا حدود زیادی نیز تحت تأثیر محیط می‌باشد، لذا اصلاح برای مقاومت در برابر آن دشوار است (Kearsey and Pooni, 1996). مکان‌یابی QTL یک ابزار مؤثر برای تجزیه ژنتیک مقاومت در برابر بیماریهای قارچی همچون اسکروتینیا است (Davar et al., 2010; Amoozadeh et al., 2013; Young, 1996; Talukder et al., 2014). اگرچه اطلاعات کمی در رابطه با معماری ژنتیکی صفات مهم و به ویژه صفاتی که بصورت کمی به ارث می‌رسند، وجود دارد، ولی در حال حاضر به منظور پی بردن به ماهیت ژنتیکی صفات کمی، روش‌های مختلف ژنومیکس امکان کالبد شکافی دقیق آن‌ها را فراهم ساخته است. نقشه‌یابی پیوستگی (Linkage mapping) و تجزیه ارتباطی (Association analysis) یا نقشه‌یابی عدم تعادل پیوستگی از روش‌های مهم ژنتیک کمی هستند که اکثراً

1- Necrotrophic

جهت فهم ارتباط بین یک ژنوتیپ و یک فنوتیپ خاص مورد استفاده قرار می‌گیرند (Azizi et al., 2017). تجزیه ارتباط پس از استفاده موفقیت‌آمیز در ژنتیک انسانی اکنون به طور گسترده در ژنتیک گیاهی استفاده می‌شود. اولین گزارش تجزیه ارتباط در گیاهان در سال ۲۰۰۱ در گیاه ذرت منتشر شده است (Thornsberry et al., 2001). پس از آن تعیین نشانگرهای مرتبط با صفات مهم از طریق تجزیه ارتباط در چندین گونه گیاهی از جمله پنبه (Abdurakhmonov and Abdulkarimov, 2008)، سورگوم (Mannai et al., 2011; Shehzad et al., 2009)، آفتابگردان (Fusari et al., 2012; Soleimani Gezeljeh et al., 2018)، ذرت (Thornsberry et al., 2001)، جو (Kraakman et al., 2006; Ataii et al., 2013; Shaaf et al., 2012)، گندم هگزاپلوئید (Bresghehlo and Sorrells, 2006)، برنج (Alizadeh et al., 2016; Azizi et al., 2017)، نخود (Saeed et al., 2013; Saeed and Darvishzadeh, 2017)، توتون (Basirnia et al., 2014; Darvishzadeh, 2016)، کاج تدا (Chang and Janzen, 1996)، و سیب (Çevik et al., 2015). در این روش ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ افراد مستقیماً برای شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در کنترل صفت بررسی می‌شود (Roy et al., 2006). مزایای استفاده از تجزیه ارتباط نسبت به تجزیه پیوستگی استفاده از ژرم‌پلاسم یا جمعیت‌های طبیعی با تنوع ژنتیکی گسترده (Ersoz and Bukler, 2007; Myles et al., 2009; Weiss et al., 2003)، بررسی همزمان چندین صفت (Kraakman et al., 2004)، نقشه یابی با وضوح بالا به دلیل وقوع تعداد زیاد میوز در طول تاریخ توسعه ژرم‌پلاسم (Yu et al., 2006; Moose and Mumm, 2008)، و عدم نیاز به جمعیت‌های دو والدی که منجر به صرفه جویی در زمان و هزینه‌های اضافی می‌شود (Kraakman et al., 2004; Hansen et al., 2001).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی واکنش به بیماری: تعداد ۱۰۰ لاین خالص آفتابگردان روغنی از مراکز مختلف تحقیقاتی تهیه (جدول ۱) و در گلدان‌های مستطیلی شکل ۶۰×۲۰ سانتی‌متری در محیط پیت‌ماس در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۶ گیاهچه کشت شدند. گیاهچه‌ها تا مرحله ۸ برگی در شرایط دمایی ۲۵±۱ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۵ درصد و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی پرورش یافتند.

تعداد شش جدایه قارچ عامل بیماری شامل سه جدایه J1، J2 و A37 از گونه *S. sclerotiorum*، و سه جدایه A1، M1 و G2 از گونه *S. minor* بر اساس نتایج بررسی قدرت بیماری‌زایی ۳۰ جدایه قارچ اسکروتینیا (۱۵ جدایه *S. minor* و ۱۵ جدایه *S. sclerotiorum*) روی رقم "فرخ" انتخاب شدند (Musa-Khalifani, 2016). جدایه‌های مورد مطالعه از مناطق آلوده استان آذربایجان غربی شامل ارومیه، سلماس و خوی که کشت آفتابگردان در آنجا مرسوم است، جمع‌آوری شدند. فرخ یک رقم حساس و مخصوص کشت در مناطق سردسیر معتدل مانند آذربایجان غربی و شرقی است (Farrokhi et al., 2010).

به منظور تهیه مایه^۱ قارچ، جدایه‌های انتخاب شده در محیط آگار دکستروز سیب‌زمینی^۲ (PDA, 39 gr.lit⁻¹)، pH=6 کشت شده و به مدت پنج روز در انکوباتور با دمای ۲۵±۱ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند. سپس دیسک‌های میسیلیومی با قطر سه میلی‌متر از حاشیه

1- Inoculum
2- Potato dextrose agar

فعال و در حال رشد پرگنه‌های^۱ جدایه‌های قارچ با عمر سه روز برداشته شد و در پایه ساقه گیاهچه‌های هشت برگی مطابق با الگوی طبیعی آلودگی در مزرعه قرار داده شد. جهت تأمین رطوبت مورد نیاز برای رشد قارچ، یک قطعه پنبه خیس روی دیسک‌های میسیلیومی گذاشته و با پارافیلیم پوشانده شد (Price and Colhoum, 1975). سه روز پس از مایه‌زنی، درصد قسمت نکروزه و پوسیده در یک سانتی‌متری پایه‌ی ساقه یادداشت‌برداری شد (Davar et al., 2010; Amoozadeh et al., 2015). بازه زمانی سه روز، بر اساس مطالعات قبلی (Davar et al., 2010; Amoozadeh et al., 2015) و همچنین بررسی درصد آلودگی رقم شاهد "فرخ" انتخاب شد. تعداد گیاهچه‌های آلوده شده با هر جدایه قارچی با احتساب لاین، تکرار و نمونه برابر $1800 = 6 \times 3 \times 100$ گیاهچه بود.

تهیه پروفیل مولکولی افراد با نشانگرهای مولکولی: در آزمایشات مولکولی، تنوع ژنتیکی لاین‌های مورد مطالعه با ۳۰ جفت آغازگر ریزماهواره ارزیابی شد (Sahranavard-Azartamar et al., 2016). نشانگرها از گروه‌های مختلف پیوستگی^۲ انتخاب شدند (Tang et al., 2002; Poormahamad Kiani et al., 2007). توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آمده است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های درصد نکروز 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. بررسی ساختار ژنتیکی و تعیین زیرجمعیت‌های احتمالی در جمعیت مورد مطالعه و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط با روش بیزین در نرم‌افزار Structure 2.3.4 انجام گرفت (Pritchard et al., 2000). در این قسمت ۹۴ لاین از ۱۰۰ لاین مورد استفاده در ارزیابی فنوتیپی (مقاومت به بیماری) در نظر گرفته شد چون پروفیل مولکولی شش

لاین در دسترس نبود. روش بیزین هر یک از ژنوتیپ‌ها را طوری به زیرجمعیت‌های فرضی متناسب می‌کند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. مقادیر اولیه K (زیرجمعیت‌های فرضی اولیه) بین ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد (Pritchard et al., 2007) و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها ۵ تکرار منظور گردید. گرم کردن یا طول دوره Burn-in ۱۰۰۰۰۰ و تعداد تکرار $MCMC^3$ ۱۰۰۰۰۰ در نظر گرفته شد تا نمودار حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. برای تعیین تعداد بهینه K یا همان تعداد گروه‌ها، از روش اوانو و همکاران (Evanno et al., 2005) استفاده شد. ماتریس سهم عضویت (Q) در مقدار بهینه K با استفاده از همین نرم افزار محاسبه شد. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیرجمعیت) یک ماتریس به نام Qst را محاسبه می‌کند که این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر لاین در هر یک از زیرجمعیت‌ها می‌باشد. در بارپلات حاصل، وقتی درصد عضویت یک ژنوتیپ به یک کلاستر یا زیرجمعیت بیشتر یا مساوی ۰/۷ باشد، ژنوتیپ به آن کلاستر نسبت داده می‌شود، ولی در صورتی که درصد عضویت آن کمتر از این مقدار باشد، به عنوان ژنوتیپ ترکیبی (مخلوط شده) تعریف می‌شود. ماتریس روابط خویشاوندی^۴ با استفاده از نرم افزار TASSEL 2.1 محاسبه شد. شناسایی نشانگرهای پیوسته با مقاومت به جدایه‌های قارچ با استفاده از مدل خطی عمومی (GLM^5) وابسته به ماتریس Q (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت) و مدل خطی مخلوط (MLM^3) وابسته به ماتریس $Q + K$ (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت + ماتریس روابط خویشاوندی) جهت جلوگیری از شناسایی ارتباطات کاذب نشانگر- صفت، در نرم‌افزار TASSEL 2.1 انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ژنوتیپ و جدایه بر

2- Markov Chain Monte Carlo
3- Kinship matrix
4- General linear model
5- Mixed linear model

3- Colonies
1- Linkage groups

جدول ۱- نام و منشأ لاین‌های آفتابگردان روغنی مورد مطالعه

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

شماره	لاین	کشور	مرکز تحقیقاتی	شماره	لاین	کشور	مرکز تحقیقاتی
Number	Line	Country	Research center	Number	Line	Country	Research center
1	LC1064C	France	ASGROW	51	H158A×LC1064C	France	ASGROW
2	DM2	USA	USDA	52	H543/H543R	France	ASGROW
3	H156A/RHA274	France	ASGROW	53	H156/H543R	France	ASGROW
4	NS-R5	France	NOVARTIS	54	H543R	France	-
5	8A*/LC1064C	France	ASGROW	55	H100A/RHA274	France	ASGROW
6	HAR4	USA	USDA	56	H205A/83HR4	France	ASGROW
7	SDB1	USA	USDA	57	H156A/H543R	France	ASGROW
8	AS5305	France	ASGROW	58	H209A/83HR4	France	ASGROW
9	RHA274	USA	USDA	59	H157A/LC1064	France	ASGROW
10	SDR18	USA	USDA	60	H100A/LC1064	France	ASGROW
11	RT931	France	RUSTICA	61	H100A/90R78	France	ASGROW
12	NS-B5	France	NOVARTIS	62	AF1POPA	France	NOVARTIS
13	SDB3	USA	USDA	63	OES	France	INRAMONT
14	803-1	Serbia	IFVC	64	RHA266	USA	USDA
15	F1250/03	Hungary	-	65	PAC2	France	ENSAT
16	HA335B	USA	USDA	66	AS613	France	ASGROW
17	TMB 51	France	INRAMONT	67	11×12	Iran	SPII
18	LP-CSYB	France	ENSAT	68	H603R	France	INRAMONT
19	PM1-3	USA	USDA	69	NSF1 A4×R5	France	NOVARTIS
20	SDR19	USA	USDA	70	4	Iran	SPII
21	RHA265	USA	USDA	71	110	Iran	SPII
22	QHP1	-	-	72	28	Iran	SPII
23	RT948	France	RUSTICA	73	703-CHLORINA	France	ENSAT
24	ENSAT-283	France	ENSAT	74	30	Iran	SPII
25	HA337B	USA	USDA	75	36	Iran	SPII
26	B454/03	Hungary	-	76	NSF1 A5×R5	France	NOVARTIS
27	H100B	France	ASGROW	77	1059	Iran	SPII
28	HA304	USA	USDA	78	38	Iran	SPII
29	AS5304	France	ASGROW	79	346	Iran	SPII
30	RHA858	USA	USDA	80	CAY	France	ENSAT
31	AS5306	France	-	81	A CONTROL	France	ENSAT
32	AS3211	France	ENSAT	82	PLASTIPIC	France	ENSAT
33	AS3211	France	ENSAT	82	SDB2	France	INRAMONT
34	ENSAT-254	France	ENSAT	83	1009370 1(100K)	France	ENSAT
35	ENSAT-270	France	ENSAT	84	1009370 3(100K)	France	ENSAT
36	1009329 2(100K)	France	ENSAT	85	H158A/H543R	France	ASGROW
37	1009337 (100K)	France	ENSAT	86	H100A	France	ASGROW
38	100935 0(100K)	France	ENSAT	87	CSWW2X	France	Caussade semences
39	5DES20QR	France	BRN	88	H209A/H566R	France	ASGROW
40	7CR13=PRH6	France	C.F	89	BF1POPB	France	NOVARTIS
41	SSD580	France	ASGROW	90	AS0-1-POP-A	France	ENSAT
42	SSD581	France	ASGROW	91	AS6305	France	ENSAT
43	ENSAT-699	France	ENSAT	92	H205A/H543R	France	ASGROW
44	9CSA3	France	Caussade semences	93	H209A/LC1064	France	ASGROW
45	H049+FSB	France	-	94	H100A/83HR4	France	ASGROW
46	5AS-F1/A2×R2	France	ASGROW	95	D34	France	INRAMONT
47	8ASB2	France	ASGROW	96	sf 076	-	-
48	12ASB3	France	ASGROW	97	sf 022	-	-
49	AS3232	France	ENSAT	98	sf-109	-	-
50	15038	Hungary	-	99	sf-105	-	-
	15031	France	ASGROW	100	sf-023	-	-

درصد نکروز گیاهان آلوده شده با جدایه‌های قارچی مورد مطالعه معنی‌دار است (جدول ۳). اثر متقابل ژنوتیپ $\times$ جدایه نیز در رابطه با گونه *S. sclerotiorum* معنی‌دار بود. اثر متقابل معنی‌دار حاکی از وجود مقاومت جزئی^۱ اختصاصی در لاین‌های آفتابگردان و تخصص‌یافتگی فیزیولوژیکی در جدایه‌های قارچ عامل بیماری می‌باشد که در توافق با یافته‌های سایر محققان در پاتوسیستم آفتابگردان-اسکلروتینیا (Davar et al., 2011) و همچنین سایر پاتوسیستم‌ها با مقاومت کمی می‌باشد (Leonards-Schippers et al., 1994; Talukder et al., 2004). توزیع فراوانی واکنش لاین‌های مختلف آفتابگردان روغنی در مقابل جدایه‌های قارچ اسکلروتینیا در شکل ۱ نشان داده شده است. در رابطه با اکثر جدایه‌ها تنوع پیوسته در توزیع فراوانی مشاهده شد که بیانگر پلی‌ژنیک بودن مقاومت جزئی است. تمایل منحنی در توزیع‌های فراوانی به یک جهت خاص (حساسیت) نشان می‌دهد که غالبیت به طرف آن جهت وجود دارد. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت و دسته‌بندی دقیق افراد به زیرجمعیت‌های مناسب با استفاده از اطلاعات مربوط به ۳۰ جفت آغازگر ریزماهواره (Sahranavard-Azartamar et al., 2016) به روش بیزین در نرم‌افزار Structure انجام گرفت. بیشترین مقدار دلتا K در $K=2$ مشاهده شد بنابراین مطابق با روش اوانو و همکاران (Evanno et al., 2005) به احتمال زیاد، جمعیت مورد مطالعه از دو زیرجمعیت تشکیل شده است. با احتساب $K=2$ به عنوان K بهینه ماتریس عضویت افراد به هر زیرجمعیت یا گروه (ماتریس Q) تعیین شد. بر اساس بارپلات حاصل (شکل ۲) و سهم عضویت بیشتر و مساوی ۰/۷، از ۹۴ لاین آفتابگردان روغنی، ۴۲ لاین (۴۴/۶۸ درصد) به ساختار اول (قرمز) و ۳۵ لاین (۳۷/۲۳ درصد) به ساختار دوم (سبز) تعلق داشتند. بر اساس ماتریس Q، ۱۷ لاین (۱۸/۰۹ درصد) ساختار مختلط داشتند (شکل ۲).

بررسی نمودار عدم تعادل پیوستگی نشان نشان داد که ۲/۷۶ درصد از R^2 ها (معیار سنجش عدم تعادل جفت

مکان‌ها) معنی‌دار و بزرگتر از ۰/۱ هستند ($R^2 \geq 0.1$, $P < 0.01$) (شکل ۳). LD به صورت ترکیب غیرتصادفی آلل‌ها در جایگاه‌های مختلف و فراوانی غیرهمگن هاپلوتیپ‌ها در یک جمعیت تعریف می‌شود (Gupta et al., 2005). چندین فاکتور ژنتیکی در شکل دادن بلوک‌های LD در ژنوم موثر هستند (Gupta et al., 2005; Stich et al., 2005, 2006, 2007; Oraguzie et al., 2007). افزایش LD نتیجه جهش‌های جدید، ساختار جمعیت، اتوگامی، ایزولاسیون ژنتیکی، رانش ژنتیکی، اندازه کوچک جمعیت، اپیستازی، بازآرایی ژنومی، انتخاب و درجه خویشاوندی می‌باشد و از این فاکتورها جهش و نوترکیبی از عوامل کلیدی موثر بر LD می‌باشند. در مقابل میزان بالای نوترکیبی، موتاسیون دوره‌ای، تبدیل ژنی، کراسینگ‌اور و آلوگامی باعث کاهش LD می‌شوند (Gupta et al., 2005; Oraguzie et al., 2007). در کنار ماهیت اتوگامی برنج، نوع نشانگر مورد استفاده نیز ممکن است در برآورد مقدار LD مؤثر باشد. بر طبق نظر اسلاتکین (Slatkin, 1994)، نشانگرهای چند آللی (مانند SSR) جهت حصول یک LD معنی‌دار نسبت به نشانگرهای دو آللی (مانند SNP، DaRT و ...) محتمل‌تر می‌باشند. رمینگتون و همکاران (Remington et al., 2001) نیز دامنه نسبتاً بالاتری از LD بین نشانگرهای SSR نسبت به نشانگرهای SNP را مشاهده کردند. درصد LD برآورد شده (۲/۷۶ درصد) نشان دهنده وضعیت عدم تعادل با در نظر گرفتن کل جفت نشانگرهاست. از آنجاییکه که نشانگرها از گروه‌های مختلف پیوستگی انتخاب شده‌اند بنابراین طبیعی است که در تعادل پیوستگی باشند. بنابراین درصد برآورد شده پایین بوده و اگر LD جداگانه در هر گروه پیوستگی بین مکان‌ها محاسبه شود درصدهای بالایی بدست خواهد آمد و میانگین LD گروه‌ها از این عدد بالاتر خواهد بود. از آنجایی که تعداد نشانگرها از هر گروه کم بود چنین محاسبه‌ای انجام نگرift این کار برای کل به صورت یکجا محاسبه شد تا شمای کلی از وضعیت عدم تعادل حاصل شود.

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

Table 2. Name and sequence of primers used in the present study

توالی آغازگر برگشت (۵'-۳')	توالی آغازگر رفت (۵'-۳')	موتیف (Motif)	نشانهگر (Marker)
(Reverse primer sequence)	(Forward primer sequence)		(Marker)
CCTAGCTTATGGGACGTATGGA	CAAAATACCCAGGTCAAAGCA	(AG) ₁₇	ORS785
TCTCACCCCTTCATCTCCTTCC	CCGATATTTTGACCGATATTTTGC	(AG) ₁₅	ORS807
CGTGCGTGATTAACATACCC	CATGGAAGCCGAGTTCTCT	(AT) ₆ (AG) ₁₁	ORS608
GGATTTTAGTCCGCCAATCA	GCGAAGGAAGTGAACCGATA	(AG) ₂₀	ORS609
AACTGGATTTACAGGGAGTGTT	TACGACTGACGATTCCATTCTC	(CT) ₂₆	ORS1079
ATGCAACACCCGAATCAAAG	CACCTTACGCACACCAAACC	(CT) ₁₃	ORS718
ACCTTGAGTTTAGGGATCA	GGGTTTAGCAAATAATAGGCACA	(CT) ₁₈	ORS1265
TATACGCACCGGAAAGAAAGTC	TGCAAGGTATCCATATTCACAA	(AC) ₁₃	ORS949
GTACAAAACCTTATAAATAAAACAATA	GTGAAACCTTCGGACCTCTG	(GT) ₁₇	ORS378
GCCGTGAAACAGAGAGAGGA	CCTGGAAGTGAACCGAGAAC	(AG) ₁₇	ORS694
CCTGAAGCGAAGAAGAATCG	CGCCTTATGCTGAGAGGAAA	(CT) ₁₄	ORS621
CTCCGGTGAGGATTTGGATT	CCCATTCACTCCTGTTTCCA	(AC) ₁₄	ORS488
CCAAACTCTGAATGATACTTGTGAC	CTCCATAGCAACCACCTGAAA	(AG) ₇	ORS728
CATGTTTAATAGGTTTTAATTCTAGGG	ACGATGCAAAGAATATACTGCAC	(AC) ₁₇	ORS844
TATACGCACCGGAAAGAAAGTC	TGCAAGGTATCCATATTCACAA	(AC) ₁₁	ORS878
AAACGGGAAGCAAGAATAGAACA	GATTTCGGAGCTGTTAGGAGGTAG	(AG) ₁₈	ORS1179
GGTTGCGGTAGTGGTCTGTAGT	ATACTCTTCCACCCTCAAATCCA	(CT) ₁₀	ORS1215
AAACAAACCTTTGGACGAAACTC	CAATGCCATCTGTCATCAGCTAC	(GT) ₈	ORS822
CTCCGTCACCTTAAGCACTTGTA	GATGTTGATGTTGGTGAAGTTGC	(GT) ₈ (AG) ₂₅	ORS1256
GGATTTCTTTCATCTTTGTGGTG	ACTATCGAACCTCCCTCCAAAC	(CT) ₁₅	ORS1088
GACACGCCCAACTTAACACTT	GGTACTTGGTATTCATGGGTCAT	(GA) ₁₇	ORS617
ACTCGCAGTGGAAGTCGTTAGG	TGAATGATCTATGAGTGGTGATGG	(CT) ₁₉	ORS1064
AGAATTAACCCCAACCCGGAAC	AACAAGCAAGCAAATCAACCATA	(AG) ₁₂	ORS1209
TGAACGCGTTGATTCTCTAGCC	TAGAAGCGGTTGGGTTGACAGTA	(AG) ₂₈	ORS1264
TGGTCGTAGAATTGTCGGTCAT	GCAATCGTTTCACTCTTCCATTC	(CT) ₁₄	ORS1242
GCACGACCCGGATATGTAAC	TGTGCTGAGGATGATATGCAG	(CT) ₉	ORS630
GGACTCCAACGAGAGATCAGT	TATGAGTTGGCAAGGGCTTC	(AG) ₂₁	ORS733
TCCAGTTTGGTCTTGATTGG	TGGTCAACGGATTTAGAGTCAA	(AG) ₁₃	ORS565
GTTCTTGCTTCGATCC	GACCCGAACCACACT	-	HA3040
CTTTTCAATTCCCCT	GGGATGAGCTCTGTC	-	HA3070

جدول ۳- میانگین مربعات درصد نکروز و پوسیدگی در یک سانتی‌متری پایه‌ی ساقه در لاین‌های آفتابگردان روغنی بعد از

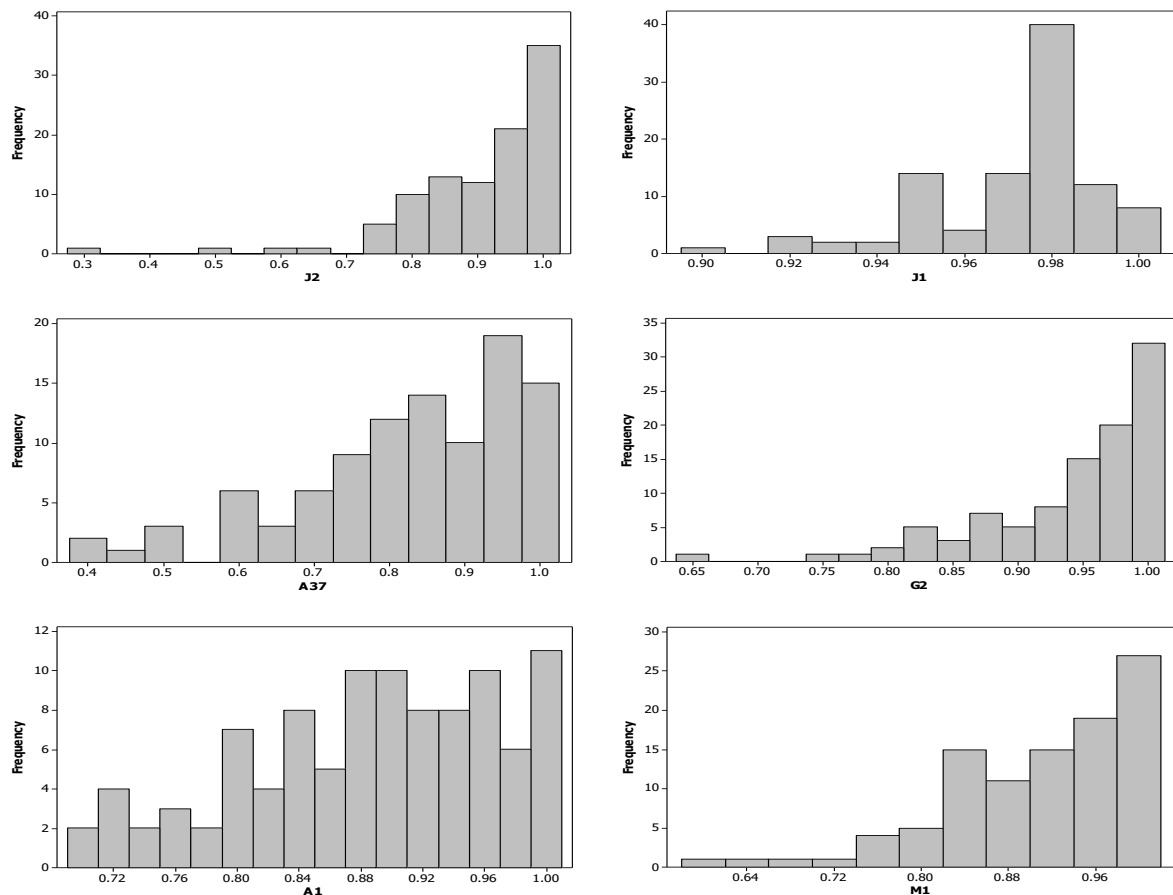
آلودگی با جدایه‌های قارچ *Sclerotinia*

Table 3. Mean square of necrosis and rot percentage in one centimeter of basal stem in oily sunflower lines post contamination with fungal isolates

Analysis of variance					
Source of variations	df	<i>S. minor</i>		<i>S. sclerotiorum</i>	
		MS	E(MS)*	MS	E(MS)*
Line	99	0.10**	$\delta_e^2 + r\alpha\delta_g^2$	0.16**	$\delta_e^2 + r\alpha\delta_g^2$
Isolate	2	1.26**	$\delta_e^2 + r\delta_{gxi}^2 + \frac{rg\sum\alpha^2}{a-1}$	1.06**	$\delta_e^2 + r\delta_{gxi}^2 + \frac{rg\sum\alpha^2}{a-1}$
Line × isolate	198	0.05	$\delta_e^2 + r\delta_{gxi}^2$	0.08**	$\delta_e^2 + r\delta_{gxi}^2$
Residual	600	0.05	δ_e^2	0.05	δ_e^2
Variance components					
Fungus	Mean of necrosis	V _g	V _e	CV _g	
<i>S. minor</i>	91.2%	0.01	0.05	8.2%	
<i>S. sclerotiorum</i>	89.9%	0.01	0.05	12.3%	

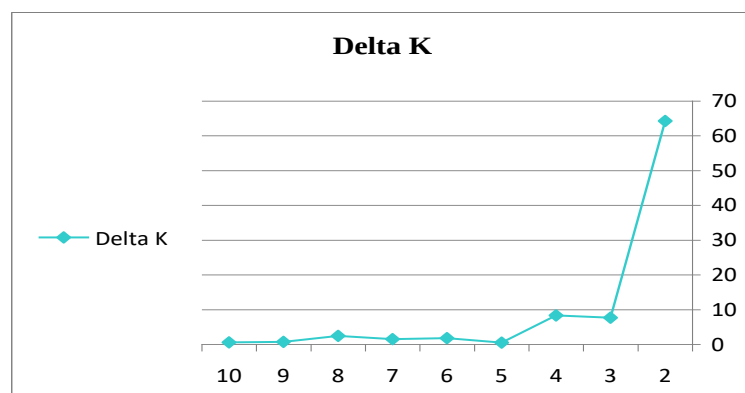
*امید ریاضی میانگین مربعات با در نظر گرفتن ژنوتیپ به عنوان اثر تصادفی و جدایه به عنوان اثر ثابت نوشته شده اند. α , δ , g به ترتیب تعداد سطوح تکرار، جدایه و ژنوتیپ را نشان می‌دهند. V_g , V_e و CV_g به ترتیب واریانس ژنتیکی، واریانس محیطی و ضریب تغییرات ژنتیکی را نشان می‌دهند. $E(MS)$, MS و df به ترتیب درجه آزادی، میانگین مربعات و امید ریاضی میانگین مربعات را نشان می‌دهند.

*Expected mean squares are presented considering genotype and isolate as random and fixed factors, respectively. r , a and g show the levels of replication, isolate and genotype, respectively. V_g , V_e and CV_g represents genotypic variance, environmental variance and coefficient of variation, respectively. df , MS and $E(MS)$ show the degree of freedom, mean square, and expected mean square, respectively.



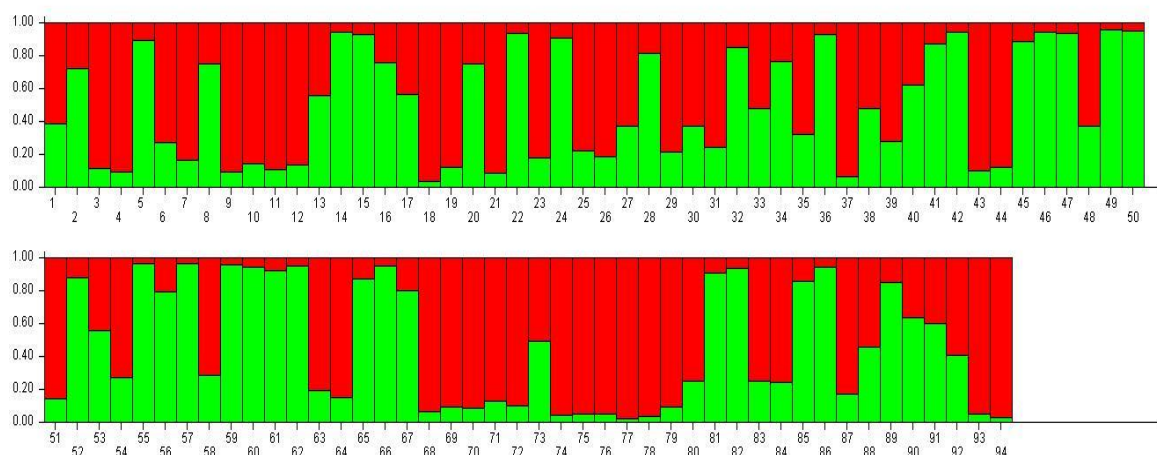
شکل ۱- توزیع فراوانی واکنش لاین‌های آفتابگردان روغنی در مقابل جدایه‌های قارچ عامل بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی یقه ساقه. واکنش لاین‌ها سه روز پس از مایه‌زنی، به صورت درصد قسمت نکروزه و پوسیده در یک سانتیمتری از پایه‌ی ساقه یادداشت‌برداری شده است. محور افقی جدایه‌های قارچ عامل بیماری و محور عمودی فراوانی افراد (لاین‌های آفتابگردان) در هر طبقه را نشان می‌دهد. J1, J2 و A37 از گونه *S. sclerotiorum* و A1 و G2 از گونه *S. minor* هستند.

Figure 1. Frequency distribution of sunflower lines for resistance to basal stem rot disease isolates, scored 3 days after basal stem inoculation based on the percentage of the area exhibiting necrosis symptoms on 1 cm of the stem base and all around it. The horizontal axis shows the isolate name of the fungus and the vertical axis represents the abundance of individuals (sunflower lines) in each class. J1, J2 and A37 belong to *S. sclerotiorum* and M1, G2 and A1 belong to *S. minor*.



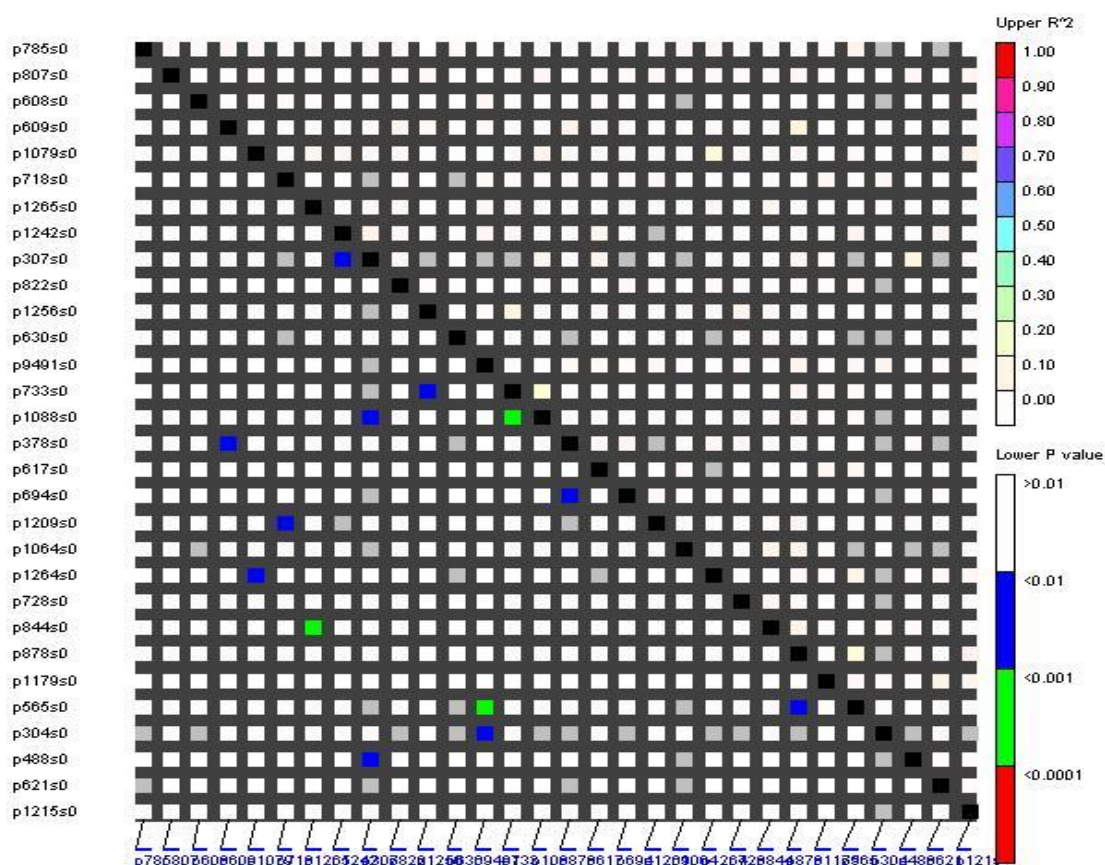
شکل ۲- نمودار دوطرفه برای تعیین تعداد زیرجمعیت‌ها در ژرم پلاسما آفتابگردان روغنی مورد مطالعه ($K=2$) بر اساس نشانگرهای ریزماهوره در نرم‌افزار Structure.

Figure 2. Bilateral graph for determining optimum subpopulations in studied oily sunflower germplasm ($K=2$) based on microsatellite markers in Structure software.



شکل ۳- تجزیه کلاستر مبتنی بر مدل Bayesian لاین‌های آفتابگردان روغنی مورد مطالعه بر اساس نشانگرهای ریزماهواره. هر رنگ یک زیرجمعیت را نشان می‌دهد. اعداد روی محور افقی و عمودی به ترتیب شماره افراد و ضریب تعلق هر فرد به کلاستر یا زیرجمعیت را نشان می‌دهد.

Figure 3. Bayesian model based-cluster analysis of studied sunflower lines by using microsatellite markers. Numbers on the y-axis indicate the membership coefficient (Q) and on the x-axis indicate the individual's number.



شکل ۴- پلات عدم تعادل پیوستگی بر اساس جفت نشانگرهای SSR. قسمت بالای قطر نشان دهنده ی میزان عدم تعادل پیوستگی و قسمت پایین قطر سطح معنی‌داری بین جفت نشانگرها را نشان می‌دهد.

Figure 4. LD plot generated by SSR marker pairs. The upper diagonal shows the amount of linkage disequilibrium and the lower diagonal shows the levels of significance between each pair of markers.

وضوح و موفقیت تجزیه ارتباط بستگی به میزان و ساختار LD در جمعیت تحت بررسی دارد (Stich et al., 2005, 2006). در تحقیقی (Nordborg and Tavaré et al., 2002) با بررسی الگوهای LD در *Arabidopsis thaliana* گزارش کردند که سطح LD در جمعیت‌های بزرگ کمتر از جمعیت‌های کوچک است که این روند در ذرت نیز مشاهده شده است.

بر اساس نتایج حاصل از مدل GLM، ۱۴ نشانگر SSR ارتباط معنی‌داری با مقاومت به جدایه‌های قارچ نشان دادند که از این تعداد ارتباط، چهار نشانگر در سطح احتمال یک درصد و ۱۰ نشانگر در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. مکان‌های مرتبط و معنی‌دار بر اساس این مدل شامل ارتباط دو مکان با هر یک از جدایه‌های J1 و J2 از گونه *S. sclerotiorum* و A1 و G2 از گونه *S. minor* و سه مکان با جدایه‌های A37 از گونه *S. sclerotiorum* و M1 از گونه *S. minor* بود (جدول ۴). بر اساس مدل ارتباطیابی MLM که به منظور دقت بیشتر و اریبی کمتر نتایج از اطلاعات بیشتری نسبت به مدل GLM جهت شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات استفاده می‌کند، تعداد ۱۲ نشانگر معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد و مرتبط با صفات مورد ارزیابی شناسایی شد. از نشانگرهای شناسایی شده، دو نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت به جدایه‌های J1 و J2 از گونه *S. sclerotiorum* و G2 و M1 از گونه *S. minor*

minor، سه نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت به جدایه A37 و یک نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل کننده مقاومت به جدایه A1 از گونه *S. minor* شناسایی شدند (جدول ۴).

تعدادی نشانگر مشترک برای صفات مختلف هم با مدل خطی عمومی و هم با مدل خطی مخلوط شناسایی شدند. به عنوان مثال نشانگر HS3070 به طور مشترک هم برای مقاومت به جدایه‌های A37 و J2 (هر دو از گونه *S. sclerotiorum*) شناسایی شد. نشانگر ORS617 به طور مشترک هم برای مقاومت به جدایه M1 از گونه *S. minor* و J1 از گونه *S. sclerotiorum* شناسایی شد. شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌نژادی دارد، زیرا گزینش/اصلاح همزمان مقاومت به چندین جدایه/صفت را امکان‌پذیر می‌سازد (Tuberosa et al., 2002; Hittalmani et al., 2003). چندین مطالعه برای شناسایی مکان‌های ژنی مقاومت به بیماری اسکروتینیا در آفتابگردان انجام گرفته است (Bert et al., 2002; Mestries et al., 1998; Micic et al., 2004; Micic et al., 2005a,b; Röncke et al., 2005; Yue et al., 2008; Davar et al., 2010). عموزاده و همکاران (Amoozadeh et al., 2015) در بررسی مقاومت غیر اختصاصی و اختصاصی جدایه برای پوسیدگی اسکروتینایی یقه ساقه در آفتابگردان، ۱۱ جایگاه ژنی بر روی ۱۱ گروه پیوستگی برای مقاومت به دو جدایه قارچ شناسایی کردند.

جدول ۴ - نشانگرهای SSR پیوسته با مقاومت به بیماری پوسیدگی اسکروتینایی یقه ساقه در لاین‌های آفتابگردان روغنی

مورد مطالعه بر اساس مدل‌های ارتباطیابی GLM و MLM

Table 4. Simple sequence repeat markers identified for resistance to basal stem rot disease in studied oily sunflower germplasm using GLM and MLM

جدایه (Isolate)	نشانگر (Marker)	مدل خطی عمومی (GLM)		مدل خطی مخلوط (MLM)	
		P- marker	R ²	F-marker	P-marker
J2	ORS822	0.0518	0.12	2.3054	0.05
<i>S. sclerotiorum</i>	HS3070	0.0156	0.14	3.2665	0.01
A37	ORS621	0.0497	0.07	3.1282	0.04
<i>S. sclerotiorum</i>	ORS565	0.0361	0.11	3.5259	0.03
	HS3070	0.0433	0.10	2.5828	0.04
M1	ORS617	0.0428	0.07	-	-
<i>S. minor</i>	ORS844	0.0187	0.09	3.6213	0.03
	ORS1265	0.0038	0.12	5.9449	0.003
G2	ORS1209	0.0517	0.14	2.1075	0.05
<i>S. minor</i>	ORS1088	0.048	0.04	4.0261	0.04
A1	ORS608	0.0012	0.12	-	-
<i>S. minor</i>	ORS378	0.0514	0.08	3.1078	0.05
J1	ORS617	0.0042	0.12	5.876	0.004
<i>S. sclerotiorum</i>	ORS822	0.0084	0.16	3.3505	0.008

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

آفتابگردان ۲۹ نشانگر SSR شناسایی کردند که ارتباط معنی‌داری با صفات آگرومورفولوژیک نشان می‌دادند. Sahranavard-Azartamar و همکاران (Sahranavard-*et al.*, 2015) در تجزیه ارتباط برای ۱۲ صفت آگرومورفولوژیک در آفتابگردان روغنی با مدل های GLM و MLM به ترتیب ۹ و ۱۶ مکان SSR با ارتباط معنی‌دار شناسایی کردند که تغییرات قابل توجهی از صفات را توجیه می‌نمودند. Jannatdoust و همکاران (Jannatdoust *et al.*, 2015) در تجزیه ارتباط برای ۹ صفت مهم مرتبط با دانه شامل عملکرد پروتئین، درصد پروتئین، طول دانه، قطر دانه، وزن دانه، وزن مغز دانه و درصد مغز به کل دانه در آفتابگردان آجیلی تحت شرایط تنش ملایم و شدید خشکی با استفاده از مدل خطی عمومی به ترتیب ۲، ۵ و ۱۱ مکان رتروترنسپوزون و بر اساس مدل خطی مخلوط ۲، ۵ و ۱۱ مکان رتروترنسپوزون با ارتباط معنی‌دار با صفات شناسایی کردند. Jun و همکاران (Jun *et al.*, 2008) با استفاده از تجزیه ارتباط و نشانگرهای SSR، ۱۱ QTL برای صفت محتوای پروتئین در ۹۶ نمونه سویا شناسایی کردند که برخی از این QTLها قبلاً شناسایی نشده بودند. Sun و همکاران (Sun *et al.*, 20014) با استفاده از تجزیه ارتباط در ۲۱۴ نمونه سویا با ۴۹۵ نشانگر SSR نشانگرهای مرتبط با مکان‌های ژنی درگیر در مقاومت به *Phytophthora sojae* را شناسایی کردند. در این مطالعه ۴ نشانگر Satt634-133، Satt634-149، Sat-222-168 و Satt301-190 هم در مدل GLM و هم در مدل MLM برای مقاومت نسبی در برابر *P. sojae* شناسایی شدند. البته لازم است اعتبارسنجی نشانگرهای شناسایی شده و مرتبط با صفات در چنین مطالعاتی، در جمعیت‌های بزرگ و با سطح بالاتری از تنوع و همچنین در محیط‌های مختلف (تکرار در سال‌ها و مکان‌های مختلف) نیز انجام گیرند تا از ارتباط آن‌ها با صفات مورد مطالعه اطمینان حاصل شود و بدین ترتیب کارایی کاربرد این نشانگرها در برنامه‌های مختلف اصلاحی مانند گزینش به کمک

در مطالعه ایشان، شش QTL مشترک برای دو جدایه شناسایی شد. در مطالعه‌ای Fusari و همکاران (Fusari *et al.*, 2012) واکنش ۹۴ لاین اینبرد آفتابگردان را در مقابل قارچ عامل بیماری اسکروتینیایی در شرایط مزرعه‌ای بررسی کردند. در آزمایش مولکولی تنوع ژنتیکی لاین‌های خالص با ۴۳ ژن کاندیدا تهیه شد. ایشان با استفاده از مدل خطی مخلوط (MLM) ارتباط بین داده‌های حاصل از واکنش به قارچ عامل بیماری و ژنوتیپ افراد را بررسی کردند و یک ژن کاندید HaRIC-B شناسایی کردند که ۲۰ درصد از تغییرات فنوتیپی مقاومت به بیماری را توجیه می‌نمود. Talukder و همکاران (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، ۲۷ نشانگر SNP مرتبط با مقاومت به بیماری شناسایی کردند. در پژوهش آن‌ها ژن‌های HaCOI1-1 و HaCOI1-2 که ۷/۴ درصد تغییرات فنوتیپی مقاومت را توجیه می‌نمودند، برای اصلاح مقاومت به پوسیدگی اسکروتینیایی انتخاب شدند. در مطالعه‌ای Iquira و همکاران (Iquira *et al.*, 2015) با انجام تلقیح مصنوعی واکنش ۱۰۱ ژنوتیپ سویا را در مقابل عامل بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه بررسی کردند. در آزمایش مولکولی، با استفاده از تکنیک تهیه ژنوتیپ با استفاده از توالی یابی (GBS) ۸۳۹۷ نشانگر SNP توسعه یافت. در بررسی ارتباط بین نشانگرهای SNP و فنوتیپ بیماری لاین‌ها با استفاده از مدل MLM سه ناحیه ژنومی (Gm03, Gm08, Gm20) مرتبط با مقاومت به پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه شناسایی شد. قوی‌ترین ارتباط ($P\text{-value} = 2.03 \times 10^{-6}$) مربوط به نشانگر Gm03 بود. این نشانگر به تنهایی ۲۱ درصد از تنوع فنوتیپی مقاومت به بیماری را توجیه می‌نمود. در آفتابگردان مطالعاتی در راستای شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات آگرومورفولوژیک انجام گرفته است. Vanitha و همکاران (Vanitha *et al.*, 2014) در

نشانگرهای مشترک به دلیل اینکه گزینش همزمان مقاومت به چندین جدایه قارچی را امکان‌پذیر می‌سازد، در برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان با انتخاب به کمک نشانگر (MAS) و تولید ارقام مقاوم به بیماری اسکروتینیا اهمیت اساسی دارد.

نشانگر افزایش یابد (Azizi et al., 2017). در تجزیه ارتباط با مدل خطی مخلوط ۱۲ مکان SSR شناسایی شد که ارتباط معنی‌داری با ژن‌های کنترل کننده مقاومت به بیماری داشتند. نشانگر ORS617 به طور مشترک برای مقاومت به جدایه M1 از گونه *S. minor* و J1 از گونه *S. sclerotiorum* شناسایی شد. شناسایی

References

- Abdullah, S.K. and Al-Mousawi, K.A. (2010). Fungi associated with seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars grown in Iraq. *Phytopathologia*, **57**: 11-20.
- Anonymous. (2010). Agribusiness handbook: sunflower crude and refined oil. *FAO/EBRD pp.* 5-14.
- Abdurakhmonov, I.Y. and Abdulkarimov, A. (2008). Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources. *International Journal of Plant Genomics*, **2008**: 574927.
- Alizadeh, M., Aalami, A., Shirzadian-Khorramabad, R., Ebadi, A.A. and Azizi, H. (2016). Genetic variation and association analysis of some important traits related to grain in rice (*Oryza sativa* L.) germplasm. *Journal of Plant Molecular Breeding*, **4(1)**: 26-34.
- Amoozadeh, M., Darvishzadeh, R., Davar, R., Abdollahi-Mandoulakani, B., Haddadi, P. and 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.
- Amoozadeh, A., Rahmani, S. and Nemati, F. (2013). Poly (ethylene) glycol/AlCl₃ as a new and efficient system for multicomponent Biginelli-type synthesis of pyrimidinone derivatives. *Heterocyclic Communications*, **19(1)**: 69-73.
- Ataie, R., Mohammadi, V., Taleai, A.R. and Nagavi, M.R. (2013). Association mapping of root traits in barley. *Iranian Journal of Field Crop Science*, **44**: 347-357.
- Azizi, H., Aalami, A., Esfahani, M. and Ebadi, A.A. (2017). Association and structure analysis of some of rice (*Oryza sativa* L.) genetic resources based on microsatellite markers, *Cereal Research*, **7(1)**: 1-16.
- Basirnia, A., Hatami Maleki, H., Darvishzadeh, R. and Ghavami, F. (2014). Mixed linear model association mapping for low chloride accumulation rate in oriental-type tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm. *Journal of Plant Interactions*, **9**: 666-672.
- Bert, P.F., Jouan, I., de Labrouhe, T.D., Serre, F., Nicolas, P. and 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.
- Bhutta, A.R. (1998). Biological studies on some fungi associated with sunflower in Pakistan (Doctoral dissertation, *Sindh Agriculture University, Tando Jam*).
- Boland, G.J. and Hall, R. (1994). Index of plant hosts of *sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **16**: 93-108.
- Bolton, M.D., Thomma, B.P. and Nelson, B.D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, **7**: 1-16.
- Breseghele, F. and Sorrells, M. E. (2006). Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Science*, **46**: 1323-1330.
- Çevik, F., Göksu, M.Z.L., Derici, O.B. and Fındık, Ö. (2009). An assessment of metal pollution in surface sediments of Seyhan dam by using enrichment factor, geoaccumulation index and statistical analyses. *Environmental Monitoring and Assessment*, **152**: 309-317.
- Chang, C. and Janzen, H.H. (1996). Long-term fate of nitrogen from annual feedlot manure applications. *Journal of Environmental Quality*, **25**: 785-790.
- Chapman, J.M., Cooper, J.D., Todd, J.A. and Clayton, D.G. (2003). Detecting disease associations due to linkage disequilibrium using haplotype tags: a class of tests and the determinants of statistical power. *Human Heredity*, **56(1-3)**: 18-31.

- Dadras, A.R., Sabouri, H., Nejad, G.M., Sabouri, A. and Shoai-Deylami, M.** (2014). Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. *Molecular Biology Reports*, **41**: 3317-3329.
- Darvishzadeh, R.** (2016). Genetic variability, structure analysis, and association mapping of resistance to broomrape (*Orobanche aegyptiaca* Pers.) in tobacco. *Journal of Agricultural Science and Technology*, **18**: 1407-1418.
- Davar, R., Darvishzadeh, R. and Majd, A.** (2011). Genotype-isolate interaction for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. *Phytopathologia Mediterranea*, **50**(3): 442-449.
- Davar, R., Darvishzadeh, R., Majd, A., Ghosta, Y. and Sarrafi, A.** (2010). QTL mapping of partial resistance to basal stem rot in sunflower using recombinant inbred lines. *Phytopathologia Mediterranea*, **49**: 330-341.
- Duan, Y., Ge, C., Zhang, X., Wang, J. and Zhou, M.** (2014). A rapid detection method for the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Australasian Plant Pathology*, **43**: 61-66.
- Ersoz, E.S., Yu, J. and Buckler, E.S.** (2007). Applications of linkage disequilibrium and association mapping in crop plants. In *Genomics-assisted crop improvement* (pp. 97-119). Springer Netherlands.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J.** (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**: 2611-2620.
- FAO.** (2016). Food and Agriculture Organization. Available online at://faostat.fao.org/.
- Farrokhi, J., Darvishzadeh, R., Hatami Maleki, H., Nasser, L.A. and Asghari, F.** (2015). Identification of microsatellite markers linked to morphological and biochemical traits in Iranian native apple (*Malus × domestica* Borkh) cultivars. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **6**(4): 117-128.
- Farrokhi, E., Khodabandeh, A., Daneshian, J. and Rhmanpour, S.** (2010). Farrokh Hybrid, a pioneer of the new generation of Iranian sunflower hybrids. Third International Seminar on Oilseeds and Edible Oils, Tehran, Center for Knowledge Coordination and Oil Seeds Industry.
- Fusari, C.M., Di Rienzo, J.A., Troglia, C., Nishinakamasu, V., Moreno, M.V., Maringolo, C. and Heinz, R.** (2012). Association mapping in sunflower for *sclerotinia* head rot resistance. *BMC Plant Biology*, **12**: 1.
- Gaetán, S. and Madia, M.** (2005). Occurrence of stem rot on canola caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Argentina. *Plant Disease*, **89**(5): 530.
- Gomes, L.C., Di Benedetto, G. and Scorrano, L.** (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature Cell Biology*, **13**: 589-598.
- Gupta, P.K., Rustgi, S. and Kulwal, P.L.** (2005). Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects. *Plant Molecular Biology*, **57**: 461-485.
- Hahn, V.** (2002). Genetic variation for resistance to *Sclerotinia* head rot in sunflower inbred lines. *Field Crop Research*, **77**: 153-159.
- Hansen, M., Kraft, T., Ganestam, S., Saell, T. and Nilsson, N.O.** (2001). Linkage disequilibrium mapping of the bolting gene in sea beet using AFLP markers. *Genetical Research*, **77**(01): 61-66.
- Hittalmani, S., Huang, N., Courtois, B., Venuprasad, R., Shashidhar, H.E., Zhuang, J.Y. and Srivantaneeyakul, S.** (2003). Identification of QTL for growth-and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. *Theoretical and Applied Genetics*, **107**: 679-690.
- Iqura, E., Humira, S. and François, B.** (2015). Association mapping of QTLs for sclerotinia stem rot resistance in a collection of soybean plant introductions using a genotyping by sequencing (GBS) approach. *BMC Plant Biology*, **15**: 5.
- Jannatdoust, M., Darvishzadeh, R., Ziaiefard, R., Azizi, H. and 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, T.H., Van, K., Kim, M.Y., Lee, S.H. and Walker, D.R.** (2008). Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica*, **62**: 179-191.
- Kearsey, M.J. and Pooni, H.S.** (1996). The genetical analysis of quantitative traits. 1st edition. Chapman & Hall, London, 381 pp.
- Kraakman, A.T., Niks, R.E., Van den Berg, P.M., Stam, P. and Van Eeuwijk, F.A.** (2004). Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics*, **168**(1): 435-446.
- Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Schäfer-Pregl, R., Ritter, E., Knapp, S.J., Salamini, F. and**

- Gebhardt, C.** (1994). Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics*, **137**: 67-77.
- Mannai, Y.E., Shehzad, T. and Okuno, K.** (2011). Variation in flowering time in sorghum core collection and mapping of QTLs controlling flowering time by association analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **58**: 983-989.
- Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Schon, C.C., Knapp, J., Tang, S. and Melchinger, A.E.** (2004). QTL mapping of Sclerotinia midstalk-rot resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**: 1474-1484.
- Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Schon, C.C., and 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.
- Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Melchinger, A.E., Knapp, S.J., Tang, S., and 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.
- Mestries, E., Gentzbittel, L., de Labrouhe, D.T., Nicolas, P. and Vear, F.** (1998). Analyses of quantitative trait loci associated with resistance to shape *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Molecular Breeding*, **4**: 215-226.
- Moose, S.P. and Mumm, R.H.** (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology*, **147(3)**: 969-977.
- Musa-Khalifani, Kh.** (2016). Identification of molecular markers associated with resistance to Sclerotinia disease in sunflower using association-based approach. M. Sc. Thesis, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University.
- Myles, S., Peiffer, J., Brown, P.J., Ersoz, E.S., Zhang, Z., Costich, D.E. and Buckler, E.S.** (2009). Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design. *The Plant Cell*, **21(8)**: 2194-2202.
- Nordborg, M. and Tavare, S.** (2002). Linkage disequilibrium: what history has to tell us? *Trends in Genetics*, **18(2)**: 83-90.
- Oraguzie, N.C., Phillip, L.W., Rikkerink, E.H.A. and Silva, H.N.D.** (2007). Linkage Disequilibrium: in Association Mapping in Plants. Springer. New York. NY. pp: 11- 39.
- Poormahamad Kiani, S., Talia P., Maury P., Grieu, P., Heinz, R., Perrault, A.** (2007). Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science*, **172**: 773-787.
- Price, K. and 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, J.K., Stephens, M., Rosenberg, N.A. and Donnelly, P.** (2000). Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*, **67**: 170-181.
- Pritchard, J. K., Wen, X. and Falush, D.** (2007). Documentation for structure software: Version 2.2. Department of Human Genetics, University of Chicago; Department of Statistics, University of Oxford.
- Remington, D.L., Thornsberry, J.M., Matsuoka, Y., Wilson, L.M., Whitt, S.R., Doebley, J., Kresovich, S., Goodman, M.M. and Buckler, E.S.** (2001). Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *PNAS*, **98**: 11479-11484.
- Rönicke, S., Hahn, V., Vogler, A. and Friedt, W.** (2005). Quantitative trait loci analysis of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. *Phytopathology*, **95**: 834-839.
- Roy, J.K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, H.S. and Gupta, P.K.** (2006). Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science*, **90**: 5-10.
- Saeed, A. and Darvishzadeh, R.** (2017). Association analysis of biotic and abiotic stresses resistance in chickpea (*Cicer spp.*) using AFLP markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **31(4)**: 698-708.
- Saeed, A., Darvishzadeh, R. and Basirnia, A.** (2013). Simple sequence repeat markers associated with agro-morphological traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Zem-Agri*, **100**: 433-440.
- Saharan, G. S. and Mehta, N.** (2008). Economic importance. In: *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management*. Springer, India, pp. 41-45.
- Sahranavard-Azartamar, F., Ghadimzadeh, M. and Darvishzadeh, R.** (2016). Genetic diversity and structure analysis of oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) based on microsatellit markers. *Plant Genetic Researches*, **2(2)**: 15-32.

- Sahranavard-Azartamar, F., Darvishzadeh, R., Ghadimzadeh, M., Azizi, H. and Aboulghasemi, Z.** (2015). Identification of SSR loci related to some important agromorphological traits in different oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines using association mapping. *Crop Biotechnology*, **10**: 73-87.
- Shaaf, S., Bihamta, M.R., Taleai, A.R., Mohammadi, V. and kaliliyan, B.** (2012). Association analysis of single nucleotide variation in sunflower time genes PpH1, HvCO1 and HvGI in the barley. *Modern Genetics*, **7**: 179-191.
- Sharfun-Nahar, S., Mushtaq, M. and Hashmi, M. H.** (2005). Seed-borne mycoflora of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pakistan Journal of Botany*, **37**: 451-457.
- Shehzad, T., Iwata, H. and Okuno, K.** (2009). Genome-wide association mapping of quantitative traits in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) by using multiple models. *Breeding Science*, **59**: 217- 227.
- Slatkin, M.** (1994). An exact test for neutrality based on the Ewens snampling distribution. *Genetic Research*, **64**: 71-74.
- Soleimani Gezeljeh, A., Darvishzadeh, R., Ebrahimi, A. and Bihamta, M.R.** (2018). Identification of SSR and retrotransposon-based molecular markers linked to morphological characters in oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) under natural and water-limited states. *Journal of Genetics*, <https://doi.org/10.1007/s12041-018-0901-4>.
- Stich, B., Melchinger, A.E., Piepho, H.P., Hamrit, S., Schipprack, W., Maurer, H.P. and Reif, J.C.** (2007). Potential causes of linkage disequilibrium in a European maize breeding program investigated with computer simulations. *Theoretical and Applied Genetics*, **115**: 529-536.
- Stich, B., Maurer, H.P., Melchinger, A.E., Frisch, M., Heckenberger, M., Van der Voort, J.R. and Reif, J.C.** (2006). Comparison of linkage disequilibrium in elite European maize inbred lines using AFLP and SSR markers. *Molecular Breeding*, **17(3)**: 217-226.
- Stich, B., Melchinger, A.E., Frisch, M., Maurer, H.P., Heckenberger, M. and Reif, J.C.** (2005). Linkage disequilibrium in European elite maize germplasm investigated with SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*, **111**: 723-730.
- Sun, J., Guo, N., Lei, J., Li, L., Hu, G. and Xing, H.** (2014). Association mapping for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Genetics*, **93**: 355-363.
- Talukder, Z.I., Hulke, B.S., Qi, L., Scheffler, B.E., Pegadaraju, V., McPhee, K. and 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.
- Talukder, Z.I., Tharreau, D. and Price, A.H.** (2004). Quantitative trait loci analysis suggests that partial resistance to rice blast is mostly determined by race-specific interactions. *New Phytologist*, **162(1)**: 197-209.
- Tang S., Yu J.K., Slabaugh M.B., Shintani D.K. and Knapp S.J.** (2002). Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theoretical and Applied Genetics*, **105**: 1124-1136.
- Thornberry, J.M., Goodman, M.M., Doebley, J., Kresovich, S., Nielsen, D. and Buckler, E.S.** (2001). Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics*, **28**: 286-289.
- Tuberosa, R., Salvi, S., Sanguineti, M. C., Landi, P., Maccaferri, M. and Conti, S.** (2002). Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: Case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Annals of Botany*, **89**: 941-963.
- Young, N.D.** (1996). QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology*, **34(1)**: 479-501.
- Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., Bi, I.V., Yamasaki, M., Doebley, J.F. and Kresovich, S.** (2006). A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, **38**: 203-208.
- Yue, B., Radi, S.A., Vick, B.A., Cai, X., Tang, S., Knapp, S.J., Gulya, T.J., Miller, J.F. and Hu, J.** (2008). Identifying quantitative trait loci for resistance to *Sclerotinia* head rot in two USDA sunflower germplasms. *Phytopathology*, **98**: 926-931.
- Vanitha, J., Manivannan, N. and Chandirakala, R.** (2014). Qualitative trait loci analysis for seed yield and component traits in sunflower. *African Journal of Biotechnology*, **13**: 754-761
- Weiss, K.M. and Clark, A.G.** (2002). Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *Trends in Genetics*, **18(1)**: 19-24.

Identification of Microsatellite Markers Linked with Genomic Regions Involved in Resistance to Basal Stem Rot Disease Isolates in Oily Sunflower (*Helianthus annuus* L.) under Controlled Conditions

Khadijeh Mousa Khalifani¹, Reza Darvishzadeh^{2,*}, Masoud Abrinbana³
and Aram Nouri¹

- 1- Former M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
- 2- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: August 26, 2017 – Accepted: March 14, 2018)

Abstract

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is an important crop that its oil has nutritional and high economic value. Basal stem rot, caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*, is one of the important and devastating disease of sunflower. The use of resistant cultivars is considered as the most important and effective method to control the disease. In this study, the reaction of 100 oily sunflower lines to three isolates of *S. sclerotiorum* and three isolates of *S. minor* was studied. Identification of gene loci associated with resistance to disease was done with markers produced with 30 SSR primers pairs. The results showed that some of sunflower genotypes had well resistant to *Sclerotinia* disease. Population structure analysis using Structure software identified 2 subpopulations (K=2). Association analysis using TASEEL software with general and mixed linear models (GLM and MLM) identified 14 and 12 loci, respectively that have significant association with resistant genes related to *Sclerotinia*. ORS617 locus was commonly related to genes associated with resistance to M1 from *S. minor* and J1 from *S. sclerotiorum*. The common markers are important in sunflower breeding programs making possible simultaneously selection for several traits and producing resistant cultivars to *Sclerotinia* disease.

Keywords: Sunflower, *Sclerotinia* rot, Linkage disequilibrium, Horizontal resistance, Gene mapping

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