ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه بندی لاینهای ذرت (*Zea mays* L.) با استفاده از نشانگرهای ISSR

علی غفاری آذر[۱]، رضا درویش زاده[۲،۱*]، زهرا آقاعلی[۳]، دانیال کهریزی[۴] و بابک درویشی[۵]

[۱] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی

[۲] ارومیه، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده زیست فناوری

[۳] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

[۴] کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

[۵] کرج، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

از آنجا که تولید بذر هیبرید نیار به انتخاب و تلاقی لاینهای خالص مطلوب دارد لذا شناسایی لاینهایی با خصوصیات ژنتیکی مناسب یکی از اهداف اصلاح‌گران گیاه می‌باشد. در این مطالعه از نشانگر ISSR (Inter-simple sequence repeat) به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۰۰ لاین خالص ذرت استفاده شد. ۱۶ آغازگر مورد استفاده، ۸۱ مکان ژنی را تکثیر کردند که از بین آنها ۷۸ مکان ژنی (۹۵/۱۲ درصد) چندشکل بودند. آغازگرهای UBC825 و UBC811 به ترتیب بیشترین ۸ و کمترین ۲ تعداد مکان چندشکل را تولید نمودند. مقادیر میزان اطلاعات چندشکل (Polymorphic information content) (PIC) از ۰/۱۵۲ (آغازگر UBC867) تا ۰/۳۶۵ (آغازگر A12) متغیر بود و میانگین آن ۰/۲۱۳ به دست آمد. تجزیه خوشه ای بر اساس ضریب تشابه Jaccard و الگوریتم پیوستگی کامل (Complete linkage) لاینهای مورد بررسی را در ۳ گروه اصلی قرار داد. تجزیه واریانس مولکولی با استفاده از نشانگرهای ISSR نشان داد که ۹ درصد تنوع به تنوع بین گروهی و ۹۱ درصد به تنوع درون گروهی مربوط می‌شود. نتایج حاصل نشان داد که نشانگرهای ISSR قادرند چندشکلی بالایی را نشان دهند و از این‌رو ابزار مفیدی برای انگشت نگاری و دسته‌بندی ژنوتیپهای ذرت در گروههای مختلف به شمار می‌روند. از این ویژگی می‌توان در تعیین گروههای هتروتیک و پیش‌بینی هتروزیس در تولید بذر ذرت هیبرید استفاده نمود.

واژه های کلیدی: تنوع ژنتیکی، ذرت، نشانگر ISSR، AMOVA

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۹۷۳۴۴۵۸، پست الکترونیکی: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

مقدمه

ذرت (*Zea mays* L.) گیاهی تک لپه و یکساله، از خانواده گرامینه و قبیله Maydeae می‌باشد. این گیاه دیپلوئید بوده و تعداد کروموزومهای آن ۱۰ جفت (۲n=۲۰) می باشد (۱۴). منشأ اولیه ذرت، آمریکای مرکزی است و اگرچه این گیاه با اقلیم گرم سازش دارد ولی به دلیل عملکرد بالقوه بالا و تنوع فرآورده‌های حاصل از آن و نیز با توجه به قدرت سازگاری با شرایط اقلیمی گوناگون، بسیار زود در سراسر دنیا گسترش یافت و مکان سوم را پس از گندم و برنج از نظر سطح زیرکشت، میزان تولید و عملکرد در واحد سطح به خود اختصاص داد (۲۹). ذرت سرشار از انواع مواد مغذی، ویتامینها و مواد معدنی است که منجر به پیشگیری از ابتلاء به بیماریهایی چون: دیابت، بیماریهای

قلبی، بیماریهای گوارشی و سرطان می‌شود (۳۰). ذرت مانند سیب‌زمینی یکی از گیاهان نشاسته‌ای می‌باشد و در بسیاری از کشورها یکی از منابع اصلی تأمین کننده نیازهای غذایی است. اهمیت ارزیابی تنوع ژنتیکی در تولید ارقام جدید سازگار با شرایط محیطی متفاوت و دیگر برنامه‌های اصلاحی غیر قابل انکار است. در ذرت، ارزیابی تنوع ژنتیکی برای تولید لاینهای خالص متنوع و توسعه هیبریدهای قوی یک نیاز اساسی به شمار می‌آید، و همچنین برای بهبود ژرم پلاسم و توسعه ارقام سنتتیک ذرت با استفاده از ژنهای پیوسته با صفات مطلوب از جمله تحمل به تنشهای زیستی و غیر زیستی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (۱۸). ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه بندی افراد می تواند بر پایه نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی DNA انجام گیرد (۱۸ و ۳۱). نشانگرهای مولکولی DNA به دلیل عدم تاثیر پذیری از شرایط محیطی، اثرات پلیوتروپی و اپیستازی، وراثت پذیری و فراوانی بالا ابزار مؤثری می‌باشند (۳).

بین توالیهای تکراری ساده (ISSR) نواحی در ژنوم هستند که توسط توالیهای ریز ماهواره احاطه شده‌اند. نشانگرهای ISSR به علت استفاده آسان، هزینه پایین، تکرار پذیری خوب، عدم نیاز به توالی یابی DNA، توزیع تصادفی، گستردگی، پوشش ژنومی بالا و چند شکلی بالا از نشانگرهای مولکولی پرکاربرد در مطالعات انگشت نگاری ژنومی، تنوع ژنتیکی، تجزیه‌های فیلوژنتیکی و نقشه‌یابی ژنومی هستند (۷، ۹ و ۲۵). تاکنون مطالعات گسترده‌ای برای ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیتها (۱۲) و لاینهای خالص ذرت (۱۳) انجام شده است. محمد و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای ذرت بر اساس نشانگرهای ISSR گزارش کردند که نشانگرهای مورد استفاده به خوبی می‌توانند ژنوتیپهای مورد نظر را از یکدیگر متمایز نمایند (۲۰). الصادیق ایدریس و همکاران (۲۰۱۲) به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای ذرت از نشانگرهای ISSR استفاده نمودند. نشانگرهای مورد نظر توانستند سطح بالایی از چندشکلی (۶۹ درصد) را در بین ژنوتیپهای مورد مطالعه آشکار نمایند (۱۵). نتایج حاصل از ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای ذرت بومی برزیل نیز نشان داد که نشانگرهای ISSR ابزار مناسبی جهت شناسایی تنوع موجود در ژنوتیپهای مورد بررسی می‌باشند (۵).

مطالعه تنوع ژنتیکی در ذرت به چند دلیل دارای اهمیت می باشد: ۱- تهیه و استخراج لاین از منابع ژنتیکی موجود که یکی از مهم‌ترین و اساسی‌ترین پایه‌های تحقیقاتی مؤسسات تولید کننده بذر است، ۲- حفظ و گسترش تنوع در منابع ژرم پلاسم، ۳- ارزیابی لاینها و شناسایی ترکیبهای برتر، ۴- شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش جهت بهبود عملکرد و کاهش حساسیت به تنشهای زنده و غیرزنده محیطی. با توجه به اینکه نشانگر ISSR در هر تلاش باندهای زیادی تولید می کند به عبارتی تکثیرپذیری بالایی دارد، کاربرد آن سریع و آسان است و در مقایسه با RAPD تکرارپذیرتر می‌باشد؛ از این‌رو در مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی بین افراد خویشاوند نسبت به سایر نشانگرها بیشتر استفاده می شود. این بررسی برای اولین بار در ژرم پلاسم مورد مطالعه به منظور بررسی روابط خویشاوندی و میزان شباهت یا تفاوت ژنوتیپها و تعیین گروههای بالقوه هتروتیک با استفاده از ۱۶ ترکیب آغازگری ISSR انجام گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی: در پژوهش حاضر ۱۰۰ لاین خالص ذرت از دانشگاه رازی کرمانشاه، مرکز تحقیقات کشاورزی خراسان رضوی و مؤسسه نهال و بذر کرج تهیه شده و به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی، مورد مطالعه قرار گرفتند (جدول ۱). از هر لاین خالص ۶ تکرار در گلدانهای بزرگ با قطر دهانه ۳۰ و ارتفاع ۲۶ سانتیمتر کشت و در مزرعه تحقیقاتی گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه ارومیه در قالب طرح کاملاً تصادفی چیده شدند. فاصله گلدانها در روی ردیفها ۴۰ و بین دو ردیف ۶۰ سانتیمتر در نظر گرفته شد. آبیاری گلدانها در طول فصل رشد با سیستم

قطره‌ای انجام گرفت. در طول دوره رشد رویشی هر ۱۰ گرفت.
روز یکبار کوددهی با کود ۲۰-۲۰-۲۰ (NPK) انجام

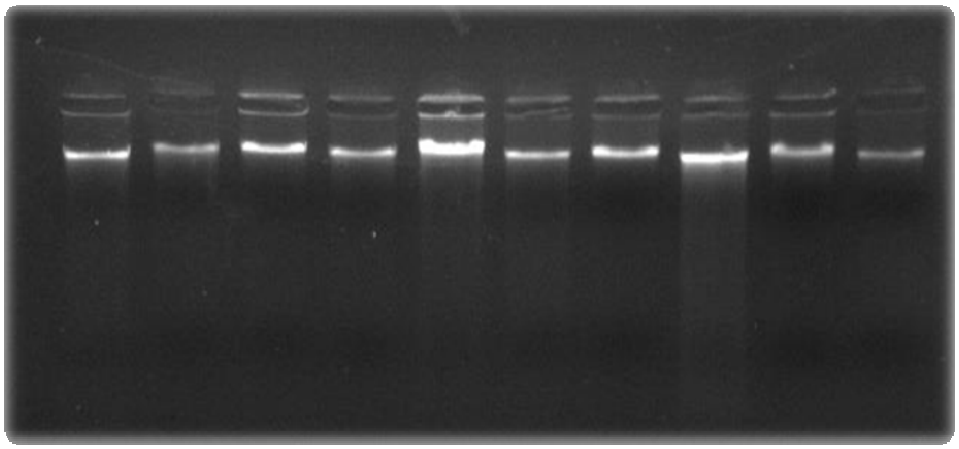
جدول ۱- کد، نام، محل جمع‌آوری و شماره کلاستر لاینهای ذرت مورد مطالعه

کد	نام لاین	محل جمع‌آوری	کلاستر	کد	نام لاین	محل جمع‌آوری	کلاستر
۱	Tenptato (White- Grade 1)	مشهد	۱	۳۴	A679/420N89	مشهد	۱
۲	K1263-1388	مشهد	۲	۳۵	K18-B /1392 (Indonesia-Colombia)	مشهد	۱
۴	36-N/M-K3653/2	مشهد	۱	۳۶	66*1388	مشهد	۱
۵	89-4*	مشهد	۱	۳۷	70*1388	مشهد	۱
۶	9/K1911	مشهد	۱	۳۸	14*/89	مشهد	۱
۷	74*/1388	مشهد	۱	۳۹	6*/88	مشهد	۱
۸	8/K1911	مشهد	۱	۴۰	3K19/1	مشهد	۱
۹	25*/89	مشهد	۱	۴۱	K1263/1 (Sterilized)	مشهد	۲
۱۰	K1264 /1	مشهد	۱	۴۲	1387/193/Chase*	مشهد	۱
۱۱	48*1390	مشهد	۱	۴۳	K615/1	مشهد	۳
۱۲	13/K19/1	مشهد	۱	۴۴	39*/89 (Sibcer)	مشهد	۳
۱۳	11K1910	مشهد	۱	۴۵	16*/89	مشهد	۳
۱۴	5/K1911	مشهد	۱	۴۶	115*13981 (White cob corn)	مشهد	۳
۱۵	4/K1911	مشهد	۱	۴۷	138*/89	مشهد	۳
۱۶	7/K1911	مشهد	۱	۴۸	K19*/1392 (Isolate)	مشهد	۳
۱۷	6/K19/1	مشهد	۱	۴۹	P13L2	مشهد	۳
۱۸	2K1911	مشهد	۱	۵۰	P19L17 Kahia	کرمانشاه	۳
۱۹	55-N- K3640/S	مشهد	۱	۵۱	P15L16	کرمانشاه	۳
۲۰	43*89 (Red cob corn)	مشهد	۱	۵۲	P6L1	کرمانشاه	۳
۲۱	172*/89	مشهد	۱	۵۳	P3L2	کرمانشاه	۳
۲۲	67*/88	مشهد	۱	۵۴	P14L1 Kahia	کرمانشاه	۳
۲۳	23*89	مشهد	۱	۵۵	P19l3	کرمانشاه	۳
۲۴	10/K 19/1	مشهد	۱	۵۶	P9L3 Kahia	کرمانشاه	۲
۲۵	1*/89 (Red cob corn)	مشهد	۱	۵۷	P15 L16 Kahia	کرمانشاه	۳
۲۶	34*/1399	مشهد	۳	۵۸	P11L7	کرمانشاه	۳
۲۷	20*1399	مشهد	۳	۵۹	P14L2	کرمانشاه	۳
۲۸	S2/QPM/SUKMA (Indonesia)	مشهد	۲	۶۰	P14L2	کرمانشاه	۳
۲۹	K19/1	مشهد	۲	۶۱	P10L5	کرمانشاه	۳
۳۰	K166 B/89	مشهد	۲	۶۲	P16L6 Kahia	کرمانشاه	۳
۳۱	163*/6/15	مشهد	۲	۶۳	P16L4 Kahia	کرمانشاه	۳
۳۲	KE70012/ 1-12 -1388	مشهد	۱	۶۴	P15L4	کرمانشاه	۳
۳۳	75*/1388	مشهد	۳	۶۵	P1L4 (Dialell- Karaj)	کرمانشاه	۳

ادامه جدول ۱-

۶۶	P11L9	کرمانشاه	۳	۸۵	R59 (Paternal)	کرج	۱
۶۷	P11L6	کرمانشاه	۳	۸۶	Super sweet-1387 Basin	مشهد	۲
۶۸	P9L6	کرمانشاه	۳	۸۷	197/ Power Hense-S2	مشهد	۳
۶۹	P13L3	کرمانشاه	۳	۸۸	Challenged 1389/st	مشهد	۳
۷۰	P3L11	کرمانشاه	۳	۸۹	Sweet white/ 1390	مشهد	۳
۷۱	P3L1	کرمانشاه	۳	۹۰	1390 Sweet 3151*	مشهد	۳
۷۲	P10L7	کرمانشاه	۳	۹۱	52*Sweet	مشهد	۳
۷۳	P16L12 Kahia	کرمانشاه	۳	۹۲	Popcorn-53 or 54 (Linear)	مشهد	۱
۷۴	p1L15 Kahia	کرمانشاه	۳	۹۳	W37a	کرج	۳
۷۵	P19L5 Kahia	کرمانشاه	۳	۹۴	KS13	کرج	۱
۷۶	P10L9	کرج	۳	۹۵	R319	کرج	۳
۷۷	K615/1	کرج	۳	۹۶	R59 (Paternal)	کرج	۱
۷۸	Mo17	کرج	۳	۹۷	W153R	کرج	۳
۷۹	OH43/1-42	کرج	۳	۹۸	K1533 Popcorn	کرج	۳
۸۰	K12264/ 5-1	کرج	۳	۹۹	R59*R (Double cross- maternal)	کرج	۳
۸۱	R=59	کرج	۳	۱۰۰	B73(RFC or CMS)	کرج	۳
۸۲	K615/1	کرج	۳	۱۰۱	1264/ 1	کرج	۳
۸۳	B73	کرج	۳	۱۰۲	MO17	کرج	۳
۸۴	OH43/1042 (Paternal)	کرج	۳	۱۰۳	ZK472221	کرج	۳

ارزیابی ژنوتیپی: پس از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله چهار برگی از ۶ تکرار هر لاین یک نمونه برگی مخلوط تهیه شد. DNA نمونه‌های برگی به روش CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (۲۲) استخراج گردید. ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده و آگاهی از میزان خلوص و غلظت آن با استفاده از اسپکتروفتومتری با طول موج ۲۶۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت (شکل ۱).



شکل ۱- کیفیت سنجی DNA استخراج شده از برخی از لاینهای ذرت مورد مطالعه با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد

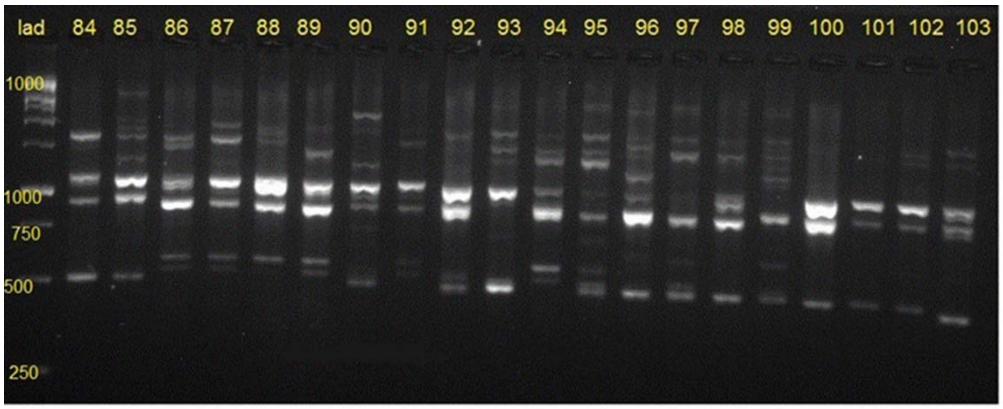
ارزیابی ژنتیکی ژنوتیپها با ۱۶ ترکیب آغازگری ISSR انجام شد (جدول ۲).

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده

نام آغازگر	توالی (۵′ → ۳′)
UBC890	$VHV(GT)_7$
B9	(GGT)2CAAG
A12	$(GA)_6CC$
UBC807	$(AG)_8T$
UBC 811	$(GA)_8C$
UBC812	$(GA)_8A$
UBC820	$(GT)_8C$
UBC825	$(AC)_7T$
UBC827	$(AC)_8G$
UBC835	$(AG)_8YC$
UBC841	$(GA)_8YC$
UBC 848	(CA)8RG
UBC867	(GGC)6
UBC884	HBH(AG)7
UBC885	$(AC)_8YT$
A7	$(AG)_{10}T$

R = A/T, Y = G/C, B = T/G/C; D = A/T/G, H = A/TIC, V = A/G/C

برای انجام واکنشهای تکثیر در حجم نهایی ۲۵µl، ۰/۵µl dNTP (۵۰ mM)، ۰/۷µl کلرید منیزیم (۱۰ mM)، ۲/۵µl بافر PCR (۱۰X)، ۱۰pmol از هر کدام از آغازگرها، ۰/۲۸ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، آب دوبار تقطیر شده و ۲۵ng DNA پایه استفاده شد. واکنش تکثیر در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه برای شروع واشرست سازی DNA، سپس ۳۶ چرخه شامل: ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۵-۳۵ درجه سانتی گراد (بسته به ترکیب آغازگری)، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه و بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر ABI (Applied Biosystem) انجام گرفت. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۷ درصد و بافر TBE 0.5X (Tris base- Boric acid- EDTA) الکتروفورز شدند. برای مشاهده باندها از اتیدیوم بروماید و اشعه UV استفاده گردید (شکل ۲).



شکل ۲- چندشکلی تکثیر شده توسط آغازگر UBC827 در برخی از لاینهای ذرت مورد مطالعه. نشانگر اندازه 1kb Gene ruler (Fermentas)

تجزیه و تحلیل داده‌ها: قطعات تکثیر شده حاصل از PCR بر اساس حضور یا عدم حضور قطعه مورد نظر در نشانگر به ترتیب به صورت یک و صفر امتیازدهی شدند و ماتریس حاصل در تجزیه های آماری مورد استفاده قرار گرفت. تعداد و درصد مکانهای چند شکل با استفاده از نرم افزار PopGen32 محاسبه گردید. خصوصیات مکانهای تکثیر شده مانند Ne، I، He، Na و H در لاینهای مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار GenAlEx6/051 (۲۳) و PopGen32 (۳۵) محاسبه گردید. برای ترسیم دندروگرام از ضریب تشابه جاکارد بر پایه الگوی Complete linkage در نرم افزار NTSYS2.1 (۲۸) استفاده شد. تجزیه به مختصات اصلی (PcoA) با استفاده از ماتریس Dcenter حاصل از ماتریس تشابه در نرم افزار NTSYS2.1 انجام شد. فاصله ژنتیکی Nei بین گروههای مورد مطالعه (کرمانشاه، خراسان رضوی و کرج) با استفاده از نرم افزار GenAlEx6/051 و PopGen32 محاسبه شد. برای بررسی

تنوع بین و درون گروهها از تجزیه واریانس مولکولی و نرم افزار GenAlEx6/051 استفاده شد. سطوح تمایز ژنتیکی (PhiPT) و همچنین میزان اطلاعات چند شکلی (Polymorphism information content;PIC) بر اساس فرمول زیر و با استفاده از نرم افزار GenAlEx6/051 محاسبه شد (۶):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} P_i^2$$

در این فرمول Pi فراوانی آلل iام می‌باشد.

نتایج و بحث

اطلاعات نشانگرها: در این پژوهش از ۱۶ ترکیب آغازگری ISSR بر روی ۱۰۰ لاین خالص ذرت به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده شد. ترکیبات آغازگری مورد استفاده توانستند ۸۱ مکان ژنی را تکثیر کنند. از بین مکانهای تکثیری، ۷۸ مکان ژنی (۹۵/۱۲ درصد) چندشکل بودند. آغازگرهای UBC825 و UBC811 به ترتیب بیشترین ۸ و کمترین ۲ تعداد مکان چند شکل را تولید نمودند. بالا بودن چند شکلی به دست آمده در این پژوهش (۹۶/۳ درصد) را می‌توان به کارآیی بالای نشانگرهای مورد استفاده و همچنین تعداد زیاد ژنوتیپهای مورد بررسی نسبت داد (۱۹). با توجه به اینکه نشانگرهای ISSR بسیار متنوع‌اند و در سراسر ژنوم پخش هستند، بنابراین استفاده از این نشانگرها می‌تواند سطح بالایی از چند شکلی را آشکار سازد (۳۲ و ۳۳). در مطالعه تنوع ژنتیکی لاینهای زودرس ذرت با استفاده از نشانگرهای SSR (Simple sequence repeat)، ۴۶ نشانگر ۱۳۷ باند چند شکل تولید کردند (۴). تعداد آللها برای هر مکان بین ۲ تا ۵ متغیر و میانگین آن نیز ۲/۹۶ بود. میانگین تعداد آلل هر نشانگر مولکولی در هر مکان ژنی مناسب بودن آن در تخمین تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهد. بنابراین آغازگرهایی که تعداد آلل بیشتری تکثیر می نمایند، برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب تر هستند (۲۷). دامنه تعداد آلل مؤثر از ۱/۱۶ برای آغازگر UBC867 تا ۱/۶۲ برای آغازگر A12 متغیر بود، میانگین آلل مؤثر ۱/۳۴ برآورد شد (جدول ۳). تعداد آلل مؤثر از محاسبه تعداد آللها و فراوانی آنها به دست می‌آید. تعداد آلل مؤثر ۱ در مکانهای ژنی UBC807(2500)، UBC807(300) و B9(1000) بیانگر وجود یک آلل با حداکثر اثر و ویژگی منحصر به فرد می‌باشد. آلل مؤثر ۱/۰۶ برای مکان ژنی UBC825(500) نشان‌دهنده دو آلل با فراوانی آللی کاملاً متفاوت و وجود یک آلل نادر برای این مکان است.

با توجه به اینکه نشانگر ISSR، یک نشانگر غالب است با نرم افزارهای تجزیه تنوع ژنتیکی مانند PopGene32 و GenAlEx 6/051 نمی توان هتروزیگوسیتی مشاهده را محاسبه کرد. بنابراین محاسبه سایر شاخصهای تنوع از جمله Fst و Chisq امکان پذیر نبود. دامنه PIC در لاینهای مورد مطالعه از ۰/۱۵۲ برای آغازگر UBC867 تا ۰/۳۶۵ برای مکان A12 متغیر بود. میانگین PIC در لاینهای مورد مطالعه ۰/۲۱۳ بود (جدول ۳). در مطالعات مختلفی از شاخص PIC برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای ذرت استفاده شده است (۴، ۵ و ۲۰). میزان اطلاعات چند شکل، یکی از شاخصهای مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آنها می‌باشد. مقادیر بالای PIC دلالت بر چندشکلی بالا و وجود آلل یا آللهای نادر در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش به سزایی دارد (۸). با توجه به میزان PIC می‌توان بیان نمود که آغازگر A12 مناسب ترین آغازگر برای بررسی تنوع ژنتیکی و تمایز ژنوتیپها می‌باشد. مقایسه دو شاخص هتروزیگوسیتی مورد انتظار تصحیح شده (uHe) و میزان اطلاعات چند شکلی نشان داد که همبستگی بالایی بین این دو شاخص وجود دارد به طوری‌که نشانگرهایی با هتروزیگوسیتی بالا دارای میزان اطلاعات چند شکلی بالا نیز بودند.

جدول ۳- پارامترهای تخمین تنوع ژنتیکی مربوط به آغازگرهای ISSR مورد استفاده در لاینهای ذرت

نام آغازگر	AT	TAL	PL	Ne	H	I	Nm	UHe	PIC
UBC807	۵۶	۵	۳	۱/۲۶	۰/۱۷	۰/۲۷	۵۰/۲۴	۰/۱۸	۰/۱۸
B9	۳۵	۴	۳	۱/۳۹	۰/۲۵	۰/۳۹	۴/۱۸	۰/۲۲	۰/۲۲
A12	۴۲	۵	۵	۱/۶۲	۰/۳۷	۰/۵۵	۲۸/۳۰	۰/۳۶	۰/۳۶
UBC890	۴۶	۷	۷	۱/۴۳	۰/۲۹	۰/۴۵	۳۲۷/۱۹	۰/۲۸	۰/۲۸
UBC884	۵۸	۳	۳	۱/۴۱	۰/۲۴	۰/۳۷	۴۳/۶۸	۰/۲۳	۰/۲۳
UBC812	۴۲	۷	۷	۱/۱۶	۰/۱۳	۰/۲۵	۱۵/۲۲	۰/۱۵	۰/۱۵
UBC811	۵۲	۲	۲	۱/۴۱	۰/۲۴	۰/۴۵	۲۰۵/۲۸	۰/۲۷	۰/۲۷
UBC820	۵۲	۶	۶	۱/۳۳	۰/۲۲	۰/۳۶	۳۴/۴۵	۰/۱۹	۰/۱۹
UBC825	۵۴	۸	۸	۱/۳۸	۰/۲۵	۰/۳۹	۱۵/۸۹	۰/۲۱	۰/۲۱
UBC827	۵۲	۷	۷	۱/۳۵	۰/۲۵	۰/۳۹	۲۵/۶۸	۰/۲۳	۰/۲۳
UBC835	۴۱	۳	۳	۱/۴۸	۰/۲۷	۰/۴۲	۹/۲۹	۰/۱۵	۰/۱۵
UBC841	۵۵	۶	۶	۱/۳۶	۰/۲۴	۰/۳۸	۲۳۸/۳۰	۰/۱۸	۰/۱۸
UBC848	۴۰	۷	۷	۱/۳۸	۰/۲۵	۰/۳۳	۲۵/۰۶	۰/۱۹	۰/۱۹
UBC867	۴۰	۳	۳	۱/۱۶	۰/۱۴	۰/۲۶	۱۵/۴۳	۰/۱۵	۰/۱۵
UBC88	۴۰	۴	۴	۱/۳۶	۰/۲۳	۰/۳۷	۱۷/۸۱	۰/۱۲۱	۰/۲۱
A7	۵۲	۴	۴	۱/۱۵	۰/۱۳	۰/۲۵	۱۹/۳۹	۰/۱۴	۰/۱۳۸
Mean	-	-	-	۱/۳۴	۰/۲۳	۰/۳۷	۵/۷۳۳	۰/۲۱۳	۰/۲۱۳
St.Dev	-	-	-	۰/۱۲	۰/۰۶۱	۰/۰۸	۹۷/۶۱	۰/۰۵۸	۰/۰۵۸

AT= دمای اتصال آغازگر، TAL= تعداد کل مکانهای تکثیری، PL= تعداد مکان چندشکل، Ne= تعداد آلل مؤثر، I= شاخص شانون، uHe= هتروزیگوسیتی مورد انتظار تصحیح شده، H= فاصله ژنتیکی Nei، Nm= میزان تمایز ژنتیکی، PIC= میزان اطلاعات چندشکل.

بالاترین مقدار Nm (۳۲۷/۱۹) مربوط به آغازگر UBC890 و کمترین مقدار آن (۴/۱۸۹) مربوط به آغازگر B9 بود. میانگین Nm ۵/۷ برآورد شد (جدول ۳). به طور کلی اگر Nm کمتر از یک باشد تمایز بین لاینها بیشتر خواهد بود و اگر مقدار آن بیشتر از یک باشد تمایز کمی بین لاینها وجود خواهد داشت (۳۴). شاخص شانون (I) از ۰/۲۵ برای آغازگر UBC812 تا ۰/۵۵ برای آغازگر A12 متغیر بود و میانگین آن ۰/۳۷به دست آمد (جدول ۳). میزان PIC و شاخص شانون بیانگر میزان چندشکلی در بین ژنوتیپهاست. تنوع ژنتیکی بالا می‌تواند به دلایل فعالیت بالای عناصر ترنسپوزونی، نوترکیبی میوزی، رانش ژنتیکی، انتخاب طبیعی و مصنوعی باشد (۱۱). فاصله ژنتیکی Nei بین لاینهای مربوط به گروههای مشهد و کرمانشاه، ۰/۰۴۹، کرج و مشهد ۰/۰۳۴ و کرمانشاه و کرج ۰/۰۲۲ برآورد شد.

در گیاهان زراعی، یکی از معیارهای انتخاب والدین برای تلاقی و بهره‌مندی از پدیده هتروزیس، فاصله ژنتیکی می-باشد. هرچند مکانیسمهای ژنتیکی دخیل در فرآیند هتروزیس به‌خوبی درک نشده‌اند ولی مشخص شده است که هیبریدهای حاصل از تلاقی بین والدین با روابط ژنتیکی کمتر و فاصله ژنتیکی بیشتر قدرت بیشتری را نسبت به هیبریدهای حاصل از والدین با فاصله ژنتیکی کمتر از خود نشان می‌دهند. بنابراین افراد متعلق به گروههای مشهد و کرمانشاه (جدول ۱) می‌توانند به طور بالقوه به عنوان والدین تلاقی در برنامه‌های اصلاحی ذرت استفاده شوند.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA): به منظور تمایز و تفکیک لاینهای مختلف ذرت، تجزیه واریانس مولکولی با در نظر گرفتن محل تهیه لاینها به عنوان گروه با استفاده از نرم افزار GenAlEx6.501 انجام گردید. تجزیه واریانس

مولکولی با استفاده از نشانگرهای ISSR نشان داد که ۹ درصد تنوع محاسبه شده به تنوع بین گروهی (Among pops) و ۹۱ درصد به تنوع درون گروهی (Within pops) مربوط می‌شود. مقدار PhiPT برابر ۰/۰۸۹ بود (جدول ۴). این نتایج نشان می‌دهد که تمایز بین گروههای مختلف (محل تهیه لاینها) کم می‌باشد. بنابراین در گزینش جهت رسیدن به هتروزیس بهتر است که انتخاب از لاینهای درون گروهها انجام گیرد. تنوع کم بین گروههای لاینهای خالص ذرت می‌تواند نشان دهنده جریان ژنی بالا در بین گروهها و همچنین وجود روش گزینشی متفاوت در هر گروه باشد. (۲۴). بالا بودن تنوع درون گروهی نسبت به تنوع بین گروهی نشان می‌دهد که در بین گروههای مختلف ساختار ژنتیکی بارزی وجود ندارد (۱۰).

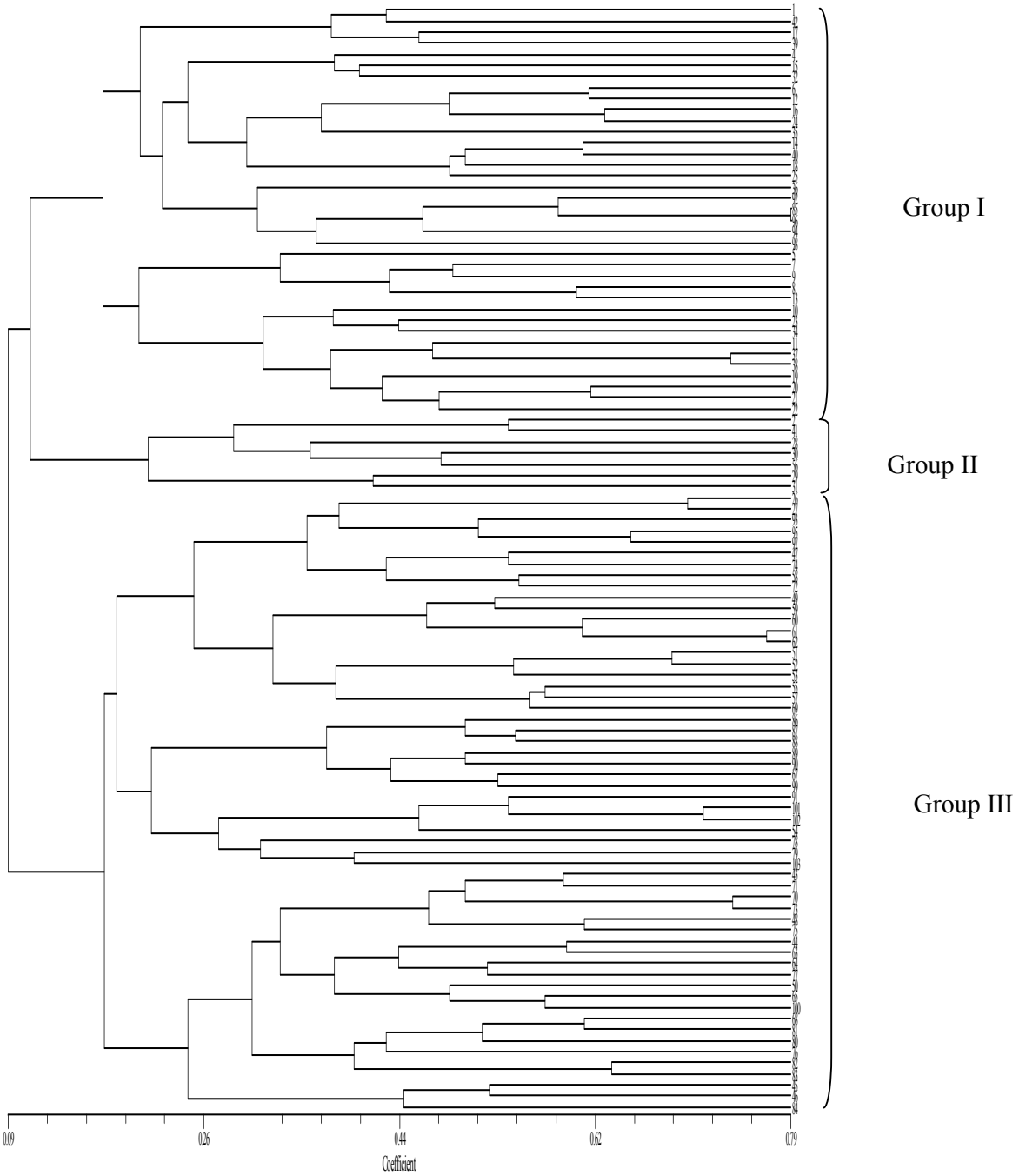
جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی ژرم پلاسم ذرت مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای ISSR

منابع	df	SS	MS	Est.Var	%
بین جمعیت	۲	۱۰۸/۴	۵۴/۲	۱/۳۴	۹
درون جمعیت	۹۷	۱۳۳۵/۸	۱۳/۷	۱۳/۷۷	۹۱
کل	۹۹	۱۴۴۴/۳		۱۵/۱۱	۱۰۰

تجزیه خوشه‌ای: یکی از بهترین راهکارهای طبقه بندی ذخایر ژنتیکی و تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی بین افراد، استفاده از الگوریتمهای آماری چند متغیره است. تجزیه خوشه ای از تکنیکهای آماری چند متغیره است که هدف آن گروه بندی افراد بر اساس مجموعه صفات آنهاست. به طوری که افراد با صفات مشابه در یک خوشه قرار می‌گیرند. در تجزیه خوشه‌ای افراد داخل یک خوشه دارای بیشترین یکنواختی بوده و در بین خوشه‌ها بیشترین تفاوت وجود دارد. بنابراین اگر گروه بندی درست انجام گرفته باشد اجزا یا افراد داخل خوشه از لحاظ ژنتیکی به هم نزدیکتر و افراد خوشه‌های متفاوت از هم دورترند (۱۷).

گروه بندی لاینهای ذرت با سه ضریب تشابه تطابق ساده، دایس و جاکارد و الگوریتمهای مختلف انجام شد. تجزیه کلاستر با استفاده از ضریب تشابه ژنتیکی جاکارد و الگوریتم پیوستگی کامل لاینهای مورد بررسی را در ۳ گروه اصلی قرار داد (شکل ۳). گروه سوم و دوم به ترتیب بیشترین ۵۶ و کمترین ۷ تعداد لاین را به خود اختصاص دادند. در این گروه بندی، لاینهایی از مرکز تحقیقاتی خاص در کنار هم قرار نگرفتند که می‌تواند ناشی از یکی بودن منشأ بذری لاینهای مختلف باشد که در اثر تبادل مواد ژنتیکی بین مراکز تحقیقاتی مختلف صورت گرفته است (۲۶). مروتو و همکاران (۲۰۱۴) نیز در ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۲ هیبرید و لاین خالص ذرت (از هر کدام ۶ نمونه) با استفاده از نشانگر RAPD (Random amplified polymorphic DNA) نتایج مشابهی را به دست آوردند (۲۱). در مطالعه دیگری که توسط کاروالهو و همکاران (۲۰۰۲) به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۷۹ توده بومی برزیل و دو رقم اصلاح شده ذرت انجام شد، نشانگرهای ISSR ژنوتیپهای مورد بررسی را در ۳ گروه اصلی قرار دادند. در این گروه بندی ژنوتیپهایی با منشأ جغرافیایی متفاوت در کنار یکدیگر قرار گرفتند (۸). ضریب همبستگی کوفنتیک ۰/۵۹ بود که نشان دهنده مطابقت خوب بین ماتریس تشابه حاصل از دندروگرام و ماتریس تشابه اولیه است. به منظور توجیه پراکنش نشانگرهای مولکولی در سطح ژنوم از تجزیه به مولفه‌های اصلی استفاده شد. دو مولفه اول و دوم به ترتیب ۹/۱۵ و ۷/۵۲ درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه نمودند. توجیه درصد کمی از تغییرات توسط هر مؤلفه در این مطالعه، بیانگر این است که نشانگرهای استفاده شده مستقل از هم هستند و نماینده نقاط مختلفی از ژنوم هستند. در واقع نشانگرهای انتخاب شده پراکنش مناسبی را در ژنوم ذرت دارند.

با توجه به نیاز کشور برای ذرت دانه ای (۱۶) تحقیقات مختلف به زراعی و به نژادی در راستای افزایش تولید در جریان است (۱ و ۲). در این مطالعه به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۰۰ لاین خالص ذرت از ۱۶ آغازگر ISSR استفاده شد. ترکیبات آغازگری مورد استفاده توانستند ۸۱ مکان ژنی را تکثیر کنند.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۱۰۰ لاین ذرت بر اساس داده های حاصل از نشانگرهای ISSR

از بین مکانهای تکثیری، ۷۸ مکان ژنی چندشکل بودند. با توجه به چندشکلی بالا می توان نتیجه گرفت نشانگرهای ISSR ابزار مفیدی برای انگشت نگاری و دسته‌بندی ژنوتیپهای ذرت در گروههای بالقوه هتروتیک به شمار می‌روند. در گام بعدی تحقیق می توان از گروههای حاصل تعدادی فرد را انتخاب و تلاقی داده و عملکرد هیبرید های حاصل را بررسی کرد. بدین ترتیب می توان با استفاده از عملکرد هیبرید های بررسی شده و ضریب خویشاوندی

ژنوتیپها، عملکرد هیبریدهای تولید نشده را با روش BLUP (Best linear unbiased prediction) پیش‌بینی کرد.

منابع

۱- ده یادگاری، م.، قلمبران، م.ر. و برنارد، ف. (۱۳۹۶). بررسی تاثیر غلظت های مختلف آلژینات بر برخی از شاخصهای فیزیولوژیکی رشد گیاهچه ذرت (*Zea mays* L.) در محیط آلوده به ترکیبات نفتی (گازوئیل). مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۳۰، ۷۸۸-۷۷۶.

۲- ملازم، د. و بشیرزاده، ع. (۱۳۹۶). بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و پرولین در ارقام ذرت (*Zea mays* L.) تحت تنش شوری. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران)، جلد ۳۰ ، ۹۰-۷۷.

3- Agarwal, M., Shrivastava, N. and Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Plant Cell Reports, 27: 617-631.

4- Akinwale, R.O., Badu-Apraku, B., Fakorede, M.A.B. and Vroh-Bi, I. (2014). Heterotic grouping of tropical early-maturing maize inbred lines based on combining ability in Striga-infested and Striga-free environments and the use of SSR markers for genotyping. Field Crops Research, 156: 48-62.

5- Amaral Júnior, A.T., Oliveira, E.C., Azeredo Gonçalves, L.S., Alberto Scapim, C., Silvia Candido, L., Conceição Silva, T.R., Vittorazzi, C. and Cunha, K.S. (2011). Assessment of genetic diversity among maize accessions using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology, 10(69): 15462-15469.

6- Anderson, A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley, S.D. and Sorrells, M.E. (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome, 36(1): 181-186.

7- Archak, S., Gaikwad, A.B., Gautam, D., Rao, E.V.V.B. and Swamy, K.R.M. (2003) Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. Genome, 46: 362-369.

8- Carvalho, V.P., Ruas, P.M., Ruas, C.F., Ferreira, J.M. and Moreira, R.M.P. (2002). Assessment of genetic diversity in maize (*Zea mays* L.) landraces using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 2(4): 557-568.

9- Dalamu Behera, T.K., Gaikwad, A.B., Saxena, S. and Bharadwaj, C. (2012). Morphological and molecular analyses define the genetic diversity of Asian bitter gourd (*Momordica charantia* L.). Australian Journal of Crop Science, 6: 261-267.

10- Diz, A.P. and Presa, P. (2009). The genetic diversity pattern of *Mytilus galloprovincialis* in Galician Rias (NW Iberian estuaries). Aquaculture, 287(3): 278-285.

11- Doebley, J.F. (2004). The genetics of maize evolution. Annual Review of Genetics, 38: 37-59.

12- Dubreuil, P. and Charcosset, A. (1998). Genetic diversity within and among maize populations: a comparison between isozyme and nuclear RFLP loci. Theoretical and Applied Genetics, 96: 577-587.

13- Dubreuil, P. and Charcosset, A. (1999). Relationships among maize inbred lines and populations from European and North American origins as estimated using RFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, 99: 473-480.

14- Ellneskog-Staam, P., Henry Loaisiga, C. and Merker, A. (2007). Chromosome C-banding of the Teosinte *Zea nicaraguensis* and comparison to other *Zea* species. Hereditas, 144: 96-101.

15- Elsadig Idris, A., Babiker Hamza, N., Osman Yagoub, S., Ibrahim, A. and El-Amin, H. (2012). Maize (*Zea mays* L.) genotypes diversity study by utilization of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 6(10): 42-47.

16- Emam, Y. (2009). Cereal crop. Shiraz University Press.

17- Hair, J. F., Anderson, R.E., Tatham, R.L. and William, C. (1995). Black (1995), Multivariate data analysis with readings. New Jersy: Prentice Hall.

18- Hoxha, S., Shariflou, M.R. and Sharp, P. (2004). Evaluation of genetic diversity in Albanian maize using SSR markers. Maydica, 49: 97-103.

19- Mokrani, L., Gentzbittel, L., Azanza, F., Fitamant, L., Al-Chaarani, G. and Sarrafi, A. (2002). Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil content and agronomic

traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theoretical and Applied Genetics, 106(1): 149-156.

20- Muhammad, R.W., Qayyum, A.A., hmad, M.Q., Hamza, A., Yousaf, M., Ahmad, B., Younas, M., Malik, W., Liaqat, S. and Noor, E. (2017). Characterization of maize genotypes for genetic diversity on the basis of inter simple sequence repeats. Genetics and Molecular Research, 16(1): 1-9.

21- Mrutu, B.A., Feyissa, T. and Ndunguru, J. (2014). Assessment of genetic diversity of maize inbred lines and hybrids in Southern Highlands of Tanzania by using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. American Journal of Research Communication, 2(4): 84-99.

22- Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8(19): 4321-4326.

23- Peakall, R.O.D. and Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6(1): 288-295.

24- Pinera, J.A., Blanco, G., Vázquez, E. and Sánchez, J.A. (2007). Genetic diversity of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations of Spanish Coasts: a preliminary study. Marine Biology, 151(6): 2153-2158.

25- Reddy, M.P., Sarla, N. and Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128: 9-17.

26- Rincon Sanchez, F., Johnson, B., Crossa, J. and Taba, S. (1996). Cluster analysis, an approach to sampling variability in maize accessions. Maydica, 41: 307-316.

27- Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P. and Ganal, M.W. (1998). A microsatellite map of wheat. Genetics, 149: 2007-2023.

28- Rohlf, F.J. (2006). Ntsys version v. 2.21. New York: Exeter Software.

29- Sandhu, K.S., Singh, N. and Malhi, N.S. (2007). Some properties of corn grains and their flours I: Physicochemical, functional and chapati-making properties of flours. Food Chemistry, 101: 938-946.

30- Rouf Shah, T., Prasad, K. and Kumar, P. (2016). Maize- A potential source of human nutrition and health: A review. Cogent Food & Agriculture, 2: 1-9.

31- Sajjad, M., Khan, S.H. and Khan, A.S. (2011). Exploitation of germplasm for grain yield improvement in spring wheat (*Triticum aestivum*). International Journal of Agriculture and Biology, 13: 695-700.

32- Shafiei-Astani, B., Ong, A.H.K., Valdiani, A., Tan, S.G., Yong, C.S.Y., Ahmady, F., Alitheen, N.B., Ng, W.L. and Kaur, T. (2015). Molecular genetic variation and structure of Southeast Asian crocodile (*Tomistoma schlegelii*): comparative potentials of SSRs versus ISSRs. Gene, 571: 107-116.

33- Wang, X., Yang, R., Feng, S., Hou, X., Zhang, Y., Li, Y. and Ren, Y. (2012). Genetic variation in *Rheum palmatumand* and *Rheum tanguticum* (Polygonaceae), two medicinally and endemic species in China using ISSR markers. PLOS ONE, 7: e51667.

34- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. Annals of Eugenics, 15: 323-354.

35- Yeh, F.C., Yang, R., Boyle, T.J., Ye, Z. and Xiyan, J.M. (2000). PopGene32, microsoft windows-based freeware for population genetic analysis, version 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.

Assessment of genetic diversity and grouping of maize lines (*Zea mays* L.) using ISSR markers

Ghafari Azar A.[1], Darvishzadeh R.[1,2], Aghaali Z.[3], Kahrizi D.[4] and Darvishi B.[5]

[1] Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R.of Iran.

[2] Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, I.R.of Iran.

[3] Dept. of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.of Iran.

[4] Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Razi, Kermanshah, I.R.of Iran.

[5] Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, I.R.of Iran.

Abstract

Since the production of maize hybrids needs to selection and crossing of desirable inbred lines, identification of lines with suitable genetic characteristics is one of the objectives of plant breeders. In this study, ISSR markers were used to assess genetic diversity in 100 inbred lines of maize. Sixteen primers amplified 81 loci, of which 78 (95.12 %) were polymorphic. The maximum and minimum number of polymorphic bands were produced by UBC825 (8 loci) and UBC811 (2 loci) primers, respectively. The polymorphic information content (PIC) ranged from 0.65 (UBC849) to 0.93 (443), with an average of 0.77. Cluster analysis based on Jaccard's similarity coefficient and complete linkage algorithm categorized the studied lines into 3 main clusters. The analysis of molecular variance using ISSR data showed that 9% of the variation was explained by the variation among population and 91% by the variation within population. The results showed that the ISSR markers capable to display a high degree of polymorphism among lines and are useful tools for fingerprinting and categorizing of maize genotypes into different groups. This feature can be used in determining heterotic groups and prediction of heterosis in maize hybrid production.

Key words: AMOVA, genetic diversity, ISSR marker, maize.