

شناسایی نواحی بین ریزماهورهای مرتبط با صفات آگرو-مورفولوژیک در ژنوم ذرت

علی غفاری آذر^۱، رضا درویش‌زاده^{۲*}، حمید حاتمی ملکی^۴، دانیال کهریزی^۵، بابک درویشی^۶ و ایرج برنوسی^۷

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۶

چکیده

ذرت (*Zea mays* L.) به‌عنوان یک گیاه مدل، از نظر زراعی، علوفه‌ای و صنعتی مهم است. بیش‌تر صفات با ارزش اقتصادی و مورفولوژیک توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند و به‌دلیل تاثیرپذیری از محیط، کنترل ژنتیکی پیچیده‌ای دارند. هدف از این تحقیق، مطالعه ژنتیکی و تعیین تعداد مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات آگرو-مورفولوژیک در ژنوم پلاسما ذرت با استفاده از تجزیه ارتباطی بود. بدین‌منظور، لاین‌های ذرت از نظر صفات مورفولوژیک و نشانگرهای ISSR (۱۶ آغازگر) ارزیابی شدند. نتایج ارزیابی‌های مورفولوژیک و ژنتیکی نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل‌توجهی در ژنوم پلاسما ذرت مورد مطالعه وجود دارد و در نتیجه می‌توان تجزیه ارتباطی موفق‌تری را انجام داد. در تجزیه ساختار جمعیت به‌وسیله داده‌های حاصل از ۸۱ جایگاه ISSR، لاین‌های مورد مطالعه در دو زیرجمعیت قرار گرفتند. از میان لاین‌های مورد مطالعه، دو لاین 1387/193/Chase و 66*1388 دارای بیش‌ترین اختلاط ژنتیکی بودند. تجزیه ارتباطی بر اساس مدل MLM نشان داد که تعداد ۲۵ جایگاه ISSR دارای ارتباط معنی‌داری با صفات مورد مطالعه هستند. نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی‌شده در این تحقیق، در صورت تایید می‌توانند به‌طور موثری در برنامه‌های گزینش به‌کمک نشانگر جهت انتخاب والدین مناسب برای انجام تلاقی‌ها و بهبود ژنتیکی صفات مورد نظر مورد استفاده قرار گیرند. نتایج این تحقیق نشان داد که نواحی بین ریزماهورهای قابلیت و کارایی لازم را جهت انجام تجزیه ارتباطی در گیاه ذرت دارند.

واژه‌های کلیدی: ژنوم پلاسما، صفات کمی، مکان‌یابی ژن، نشانگرهای مولکولی

- ۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- ۲- استاد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- ۳- استاد، پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- ۴- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران
- ۵- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
- ۶- استادیار، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
- ۷- دانشیار، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

* نویسنده مسئول: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

مقدمه

نشانگرهای پیوسته با یک صفت کمی در یک جمعیت خواهر-برادری است. محدودیت‌های اساسی این روش، تعداد محدود کراسینگ‌اور و در نتیجه وضوح پایین نقشه ژنتیکی (۲۰-۱۰ سانتی‌مورگان) و هزینه بالای تکثیر رگه‌ها برای رسیدن به تعداد کافی کراسینگ‌اور است. ضمن اینکه ایجاد چنین جمعیت‌هایی بسیار زمان‌بر است و جمعیت ایجاد شده فقط برای صفات و مطالعات محدودی کارایی دارد (Gupta *et al.*, 2005; Holland, 2007). در تجزیه ارتباطی که با استفاده از جمعیت‌های طبیعی نیز قابل انجام است، افراد جمعیت به‌طور تصادفی جمع‌آوری و تجزیه بر اساس عدم تعادل پیوستگی انجام می‌شود. تجزیه ارتباطی در مقایسه با نقشه‌یابی پیوستگی به‌مراتب دقیق‌تر است، زیرا به‌دلیل نوترکیبی‌های زیاد نقشه ژنتیکی وضوح بالایی دارد (Moose and Mumm, 2008).

سیبوف و همکاران (Sibov *et al.*, 2003) از نقشه‌یابی پیوستگی در گیاه ذرت استفاده و برای صفات عملکرد بذر، ارتفاع بوته، طول خوشه و رطوبت بذر به‌ترتیب ۴، ۴، ۵ و صفر QTL در نقشه پیوستگی تهیه شده با نشانگرهای ریزماهواره شناسایی کردند. کراکوسکی و همکاران (Krakowsky *et al.*, 2006)، در مکان‌یابی ژنی با جمعیت لاین‌های خویش‌آمیخته نوترکیب (RILs) ذرت نشان دادند که مکان ژنی کنترل‌کننده القاء کالوس‌زایی در ذرت با مکان ژنی شناسایی شده برای متابولیسم اسید آسبیزیک هم‌مکان بود و این فرضیه را تقویت کرد که این هورمون در شروع کالوس‌زایی در ذرت نقش دارد. در تحقیقی که توسط دینگ و همکاران (Ding *et al.*, 2015a) به‌منظور شناسایی نواحی ژنومی کنترل‌کننده مقاومت به بیماری سوختگی برگ در ۹۹۹ لاین ذرت با استفاده از تعداد ۵۶۱۱۰ نشانگر SNP انجام شد، تعداد ۱۲ نشانگر پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت شناسایی شد. لی و همکاران (Li *et al.*, 2016) نیز به‌طور هم‌زمان از سه جمعیت ذرت شامل دو جمعیت مختلف $F_{2:3}$ و یک جمعیت طبیعی برای مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده ارتفاع بوته و طول خوشه استفاده کردند و نشان دادند که نواحی ژنومی شناسایی شده با تجزیه ارتباطی در جمعیت طبیعی با مکان‌های ژنومی شناسایی شده با تجزیه پیوستگی در دو جمعیت $F_{2:3}$ هم‌پوشانی دارند. هدف از این تحقیق، ارزیابی ژرم‌پلاسم ذرت از نظر صفات آگرو-مورفولوژیک و شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات با استفاده از روش تجزیه ارتباطی بود.

ذرت (*Zea mays* L.) پس از گندم و برنج، سومین غله پراهمیت جهان است (Amirtaimoori and Chizari, 2008). ذرت گیاهی تک‌لپه و یک‌ساله، از خانواده گرامینه و دارای $2n=2x=20$ کروموزوم است (Tajbakhsh, 1996). اندازه ژنوم ذرت ۲۳۰۰ مگا جفت باز است و تخمین زده می‌شود که شامل بیش از ۳۲۰۰۰ ژن باشد (Yan *et al.*, 2011). این گیاه از جمله محصولات زراعی مهم در ایران و جهان به‌شمار می‌رود و پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۲۰ تقاضا برای آن، ۵۰ درصد افزایش یابد (Fraley, 2009). با توجه به نحوه گرده‌افشانی و دگرگشتن بودن آن (حدود ۵ درصد خودگشایی)، این گیاه به‌طور طبیعی هتروزیگوت است (Karimi, 2007). سطح زیر کشت ذرت دانه‌ای در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ حدود ۲۳۳۶۲۰ هکتار و میزان تولید آن ۱۶۵۸۸۷۵ تن بوده است. عملکرد ذرت دانه‌ای کشور در اراضی آبی ۷۱۰۱ کیلوگرم در هکتار است. استان خوزستان با ۳۳/۵ درصد از کل سطح برداشت ذرت دانه‌ای، بیش‌ترین سطح این محصول را دارد. عملکرد ذرت علوفه‌ای کشور نیز در اراضی آبی ۴۸۶۴۳ کیلوگرم در هکتار و در اراضی با کشت دیم ۱۳۶۷۹ کیلوگرم در هکتار است (Ministry of Jihad-e-Agriculture, 2015).

تنوع ژنتیکی اساس برنامه‌های به‌نژادی گیاهی است و اطلاع از سطح تنوع موجود در ژرم پلاسم‌ها و خزانه‌های ژنی برای تشخیص تکرارها در بانک‌های ژنی، غنی‌سازی ذخایر ژنی از طریق اینتروگرسیون ژن‌های مطلوب و شناسایی ژن‌های مناسب ضروری است (Mohammadi and Prasanna, 2003). نشانگرهای مورفولوژیک و DNA در مطالعه تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم ذرت استفاده شده‌اند (Le Clerc *et al.*, 2005; Idris *et al.*, 2012; Molin *et al.*, 2013). با ظهور نشانگرهای مولکولی DNA، امکان شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی و گزینش به‌کمک نشانگر برای به‌نژادی صفات با وراثت‌پذیری پایین و صفات با قابلیت ظهور در مراحل انتهایی رشد و توسعه گیاه میسر شده است. با ارزیابی تنوع فنوتیپی و مولکولی در یک جمعیت ژنتیکی، می‌توان از طریق تجزیه ارتباطی (Association analysis) به‌عنوان روشی جایگزین برای نقشه‌یابی پیوستگی (Linkage-based analysis)، نشانگرهای مولکولی پیوسته با عوامل کنترل‌کننده صفات را شناسایی کرد. هدف از نقشه‌یابی پیوستگی، شناسایی

مواد و روشها

مواد گیاهی و ارزیابی فنوتیپی

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل ۱۰۰ لاین خالص ذرت (جدول ۱) بودند که از مؤسسه نهال و بذر کرج، مرکز تحقیقات کشاورزی خراسان رضوی و دانشگاه رازی کرمانشاه تهیه شدند. هر یک از لاینهای مورد مطالعه در شش گلدان به ابعاد ۲۴×۲۴ سانتی‌متر

به‌منزله شش تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی در محوطه گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه کشت شدند. پس از مرحله گلدهی، صفات آگرو- مورفولوژیک مختلف از قبیل ارتفاع بوته، ارتفاع بوته تا اولین بلال، عرض برگ، تعداد بلال، میزان کلروفیل، وزن دانه در بوته، وزن چوب بلال، قطر ابتدای چوب بلال، قطر وسط چوب بلال، طول چوب بلال، وزن خشک بوته، تاریخ ظهور گل نر، تاریخ ظهور بلال اول و تاریخ ظهور بلال دوم اندازه‌گیری شدند.

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های ذرت مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. Characteristics of maize genotypes used in the present study

| Genotype code | Number in barplot | Genotype name | Preparation site | Subpopulation | Subpopulation membership percentage | | |
|---------------|-------------------|----------------------------------|------------------|---------------|-------------------------------------|------|-------|
| | | | | | Green | Red | Mixed |
| 1 | 1 | Tenptato (White- First class) | Mashhad | Green | 7.2 | 92.8 | |
| 2 | 2 | K1263-1388 | Mashhad | Green | 0.7 | 99.3 | |
| 4 | 3 | 36-N/M-K3653/2 | Mashhad | Green | 8.2 | 91.8 | |
| 5 | 4 | 89-4* | Mashhad | Green | 0.8 | 99.2 | |
| 6 | 5 | 9/K1911 | Mashhad | Green | 0.6 | 99.4 | |
| 7 | 6 | 74*/1388 | Mashhad | Green | 4.8 | 95.2 | |
| 8 | 7 | 8/K1911 | Mashhad | Green | 1.2 | 98.8 | |
| 9 | 8 | 25*/89 | Mashhad | Green | 8.2 | 91.8 | |
| 10 | 9 | K1264 /1 | Mashhad | Green | 1 | 99 | |
| 11 | 10 | 48*1390 | Mashhad | Green | 1 | 99 | |
| 12 | 11 | 13/K19/1 | Mashhad | Green | 5.4 | 94.6 | |
| 13 | 12 | 11K1910 | Mashhad | Green | 0.7 | 99.3 | |
| 14 | 13 | 5/K1911 | Mashhad | Green | 1 | 99 | |
| 15 | 14 | 4/K1911 | Mashhad | Green | 3 | 97 | |
| 16 | 15 | 7/K1911 | Mashhad | Green | 0.7 | 99.3 | |
| 17 | 16 | 6/K19/1 | Mashhad | Green | 3 | 97 | |
| 18 | 17 | 2K1911 | Mashhad | Green | 0.9 | 99.1 | |
| 19 | 18 | 55-N- K3640/S | Mashhad | Green | 2.4 | 97.6 | |
| 20 | 19 | 43*89 (Red cob corn) | Mashhad | Green | 0.5 | 99.5 | |
| 21 | 20 | 172*/89 | Mashhad | Green | 0.5 | 99.5 | |
| 22 | 21 | 67*/88 | Mashhad | Green | 1.4 | 98.6 | |
| 23 | 22 | 23*89 | Mashhad | Green | 2.4 | 97.6 | |
| 24 | 23 | 10/K 19/1 | Mashhad | Green | 0.6 | 99.4 | |
| 25 | 24 | 1*/89 (Red cob corn) | Mashhad | Green | 1.3 | 98.7 | |
| 26 | 25 | 34*/1399 | Mashhad | Green | 2.5 | 97.5 | |
| 27 | 26 | 20*1399 | Mashhad | Green | 3.4 | 96.6 | |
| 28 | 27 | S2/QPM/SUKMA (Indonesia) | Mashhad | Green | 5.4 | 94.6 | |
| 29 | 28 | K19/1 | Mashhad | Green | 7.2 | 92.8 | |
| 30 | 29 | K166 B/89 | Mashhad | Green | 5.8 | 94.2 | |
| 31 | 30 | 163*/6/15 | Mashhad | Green | 5.6 | 94.4 | |
| 32 | 31 | KE70012/ 1-12 -1388 | Mashhad | Green | 8.1 | 91.9 | |
| 34 | 32 | A679/420N89 | Mashhad | Green | 2.9 | 97.1 | |
| 35 | 33 | K18-B /1392 (Indonesia-Colombia) | Mashhad | Green | 0.7 | 99.3 | |
| 36 | 34 | 66*1388 | Mashhad | Mixed | 47.5 | 52.5 | ✓ |
| 37 | 35 | 70*1388 | Mashhad | Green | 1.6 | 98.4 | |
| 38 | 36 | 14*/89 | Mashhad | Green | 0.9 | 99.1 | |
| 39 | 37 | 6*/88 | Mashhad | Green | 2.3 | 97.7 | |
| 40 | 38 | 3K19/1 | Mashhad | Green | 1.4 | 98.6 | |

Table 1. Continued

جدول ۱- ادامه

| Genotype code | Number in barplot | Genotype name | Preparation site | Subpopulation | Subpopulation membership percentage | | |
|---------------|-------------------|----------------------------|------------------|---------------|-------------------------------------|------|-------|
| | | | | | Green | Red | Mixed |
| 41 | 39 | K1263/1 (Sterilized) | Mashhad | Green | 2.3 | 97.7 | |
| 42 | 40 | 1387/193/Chase* | Mashhad | Mixed | 55.4 | 44.6 | ✓ |
| 43 | 41 | K615/1 | Mashhad | Red | 98.9 | 1.1 | |
| 44 | 42 | 39*/89 (<i>Sibcer</i>) | Mashhad | Red | 99.2 | 0.8 | |
| 45 | 43 | 16*/89 | Mashhad | Red | 98.2 | 1.8 | |
| 46 | 44 | 115*13981 (White cob corn) | Mashhad | Red | 98.1 | 1.9 | |
| 47 | 45 | 138*/89 | Mashhad | Red | 97.8 | 2.2 | |
| 48 | 46 | K19*/1392 (Isolate) | Mashhad | Red | 94.7 | 5.3 | |
| 49 | 47 | P13L2 | Mashhad | Red | 97.7 | 2.3 | |
| 50 | 55 | P19L17 Kahia | Kermanshah | Red | 99.2 | 0.8 | |
| 51 | 56 | P15L16 | Kermanshah | Red | 99.3 | 0.7 | |
| 52 | 57 | P6L1 | Kermanshah | Red | 99.4 | 0.6 | |
| 53 | 58 | P3L2 | Kermanshah | Red | 99.2 | 0.8 | |
| 54 | 59 | P14L1 Kahia | Kermanshah | Red | 97.7 | 2.3 | |
| 55 | 60 | P19L3 | Kermanshah | Red | 99.6 | 0.4 | |
| 56 | 61 | P9L3 Kahia | Kermanshah | Red | 99 | 1 | |
| 57 | 62 | P15 L16 Kahia | Kermanshah | Red | 99.5 | 0.5 | |
| 58 | 63 | P11L7 | Kermanshah | Red | 99.1 | 0.9 | |
| 59 | 64 | P14L2 | Kermanshah | Red | 99.5 | 0.5 | |
| 60 | 65 | P14L2 | Kermanshah | Red | 98.3 | 1.7 | |
| 61 | 66 | P10L5 | Kermanshah | Red | 99 | 1 | |
| 62 | 67 | P16L6 Kahia | Kermanshah | Red | 99.2 | 0.8 | |
| 63 | 68 | P16L4 Kahia | Kermanshah | Red | 98.4 | 1.6 | |
| 64 | 69 | P15L4 | Kermanshah | Red | 98.4 | 1.6 | |
| 65 | 70 | P1L4 (Dialell- Karaj) | Kermanshah | Red | 98.3 | 1.7 | |
| 67 | 71 | P11L6 | Kermanshah | Red | 97.5 | 2.5 | |
| 68 | 72 | P9L6 | Kermanshah | Red | 99.4 | 0.6 | |
| 69 | 73 | P13L3 | Kermanshah | Red | 99.3 | 0.7 | |
| 70 | 74 | P3L11 | Kermanshah | Red | 99.3 | 0.7 | |
| 71 | 75 | P3L1 | Kermanshah | Red | 98.9 | 1.1 | |
| 72 | 76 | P10L7 | Kermanshah | Red | 98.1 | 1.9 | |
| 73 | 77 | P16L12 Kahia | Kermanshah | Red | 99.2 | 0.8 | |
| 74 | 78 | p1L15 Kahia | Kermanshah | Red | 99.2 | 0.8 | |
| 75 | 79 | P19L5 Kahia | Kermanshah | Red | 96.1 | 3.9 | |
| 76 | 80 | P10L9 | Karaj | Red | 96.1 | 3.9 | |
| 77 | 81 | K615/1 | Karaj | Red | 98.4 | 1.6 | |
| 78 | 82 | Mo17-I | Karaj | Red | 98.1 | 1.9 | |
| 79 | 83 | OH43/1-42 | Karaj | Red | 98.7 | 1.3 | |
| 80 | 84 | K12264/ 5-1 | Karaj | Red | 99.1 | 0.9 | |
| 81 | 85 | R=59 | Karaj | Red | 99.2 | 0.8 | |
| 82 | 86 | K615/1 | Karaj | Red | 93.1 | 6.9 | |
| 83 | 87 | B73 | Karaj | Red | 97.2 | 2.8 | |
| 84 | 88 | OH43/1042 (Paternal) | Karaj | Red | 98.2 | 1.8 | |
| 85 | 89 | R59 (Paternal) | Karaj | Red | 97.7 | 2.3 | |
| 86 | 48 | Super sweet-1387 Basin | Mashhad | Red | 99.2 | 0.8 | |
| 87 | 49 | 197/ Power Hense-S2 | Mashhad | Red | 96.2 | 3.8 | |
| 88 | 50 | Challenged 1389/st | Mashhad | Red | 98.4 | 1.6 | |
| 89 | 51 | Sweet white/ 1390 | Mashhad | Red | 99.1 | 0.9 | |
| 90 | 52 | 1390 Sweet 3151* | Mashhad | Red | 99.2 | 0.8 | |
| 91 | 53 | 52*Sweet | Mashhad | Red | 97.1 | 2.9 | |
| 92 | 54 | Popcorn-53 or 54 (Linear) | Mashhad | Red | 98.9 | 1.1 | |
| 93 | 90 | W37a | Karaj | Red | 98.2 | 1.8 | |
| 94 | 91 | KS13 | Karaj | Red | 98.3 | 1.7 | |
| 95 | 92 | R319 | Karaj | Red | 98.9 | 1.1 | |

Table 1. Continued

جدول ۱- ادامه

| Genotype code | Number in barplot | Genotype name | Preparation site | Subpopulation | Subpopulation membership (%) | | |
|---------------|-------------------|-------------------------------|------------------|---------------|------------------------------|------|-------|
| | | | | | Green | Red | Mixed |
| 96 | 93 | R59 (Paternal) | Karaj | Red | 89.4 | 10.6 | |
| 97 | 94 | W153R | Karaj | Red | 96.6 | 3.4 | |
| 98 | 95 | K1533 Popcorn | Karaj | Red | 95.5 | 4.5 | |
| 99 | 96 | R59*R (Double cross-maternal) | Karaj | Red | 94.9 | 5.1 | |
| 100 | 97 | B73(RFC or CMS) | Karaj | Red | 99.3 | 0.7 | |
| 101 | 98 | 1264/ 1 | Karaj | Red | 90.5 | 9.5 | |
| 102 | 99 | MO17-II | Karaj | Red | 95.2 | 4.8 | |
| 103 | 100 | ZK472221 | Karaj | Red | 96.3 | 3.7 | |

استخراج DNA ژنومی و نشانگر ISSR

نمونه برداری برگه به صورت مخلوطی از شش تکرار هر لاین در مرحله چهار برگه انجام و سپس DNA ژنومی با روش CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (Murray and Thompson, 1980) استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل آگارز یک درصد تعیین شد. برای انگشتنگاری ژرم پلاسما از ۱۶ آغازگر ISSR استفاده شد (جدول ۲). آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق، با توجه به الگوی نواربندی واضح از میان ۶۰ آغازگر ISSR بر اساس مطالعات ادریس و همکاران (Idris *et al.*, 2012) و محمد و همکاران (Muhammad *et al.*, 2017) در ذرت انتخاب شدند. واکنش تکثیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۵۰ mM)، ۰/۷ میکرولیتر کلرید منیزیم (۱۰ mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ X)، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها، ۰/۲۸ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۱۴/۰۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و ۲۵ نانوگرم DNA ژنومی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystem) انجام شد. برنامه دمایی دستگاه شامل واسرشته سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، سپس ۳۶ چرخه حرارتی به صورت واسرشته سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای مناسب اتصال برای هر ترکیب آغازگر (جدول ۲) و توسعه رشته جدید به مدت ۱۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در انتهای ۳۶ چرخه، یک مرحله توسعه نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. محصولات PCR، روی ژل آگارز ۱/۷ درصد از هم دیگر تفکیک شدند و برای مشاهده باندها نیز از روش رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل داده ها

امتیازدهی باندها در ژل، به صورت یک برای وجود نوار و صفر برای عدم وجود نوار صورت گرفت و ماتریس صفر و یک به دست آمده برای تجزیه و تحلیل های آماری استفاده شد. ابتدا با استفاده از روش آماری Bayesian در نرم افزار Structure 2.3.4، تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته بندی دقیق ژنوتیپها به زیر جمعیت های مناسب (K) انجام گرفت (Pritchard *et al.*, 2000). در این نرم افزار، مقادیر زیر جمعیت فرضی اولیه (K) بین ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد جهت افزایش دقت، برای هر یک از زیر جمعیتها ۱۰ تکرار لحاظ شد. همچنین جهت حصول منحنی حداکثر درست نمایی از مدل Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰۰ تکرار آزمایش (Burn-in) و ۱۰۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده شد (Evanno *et al.*, 2005). برای تعیین تعداد بهینه K، از روش ایوانو و همکاران (Evanno *et al.*, 2005) استفاده شد. نرم افزار Structure برای هر مقدار K (زیر جمعیت) یک ماتریس به نام Qst محاسبه می کند که شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر زیر جمعیت است. سپس با استفاده از نرم افزار TASSEL 2.1 میزان عدم تعادل پیوستگی (Linkage Disequilibrium) محاسبه شد. عدم تعادل پیوستگی (LD) ارتباط غیر تصادفی بین آللها در جایگاه های ژنی مختلف است که از این پیوستگی ژنتیکی غیر تصادفی بین نشانگرها و ژن های کنترل کننده صفات می توان برای تعیین مکان های ژنی استفاده کرد. در نهایت، نشانگرهای پیوسته و دارای ارتباط معنی دار با صفات مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار TASSEL 2.1 بر اساس مدل خطی مخلوط وابسته به مدل Q+K (ماتریس سهم عضویت افراد به زیر جمعیتها و ماتریس روابط خویشاوندی یا Kinship) شناسایی شدند.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این پژوهش

Table 2. Characteristics of the ISSR primers used in the present study

| Primer name | Primer sequence (3' → 5') [†] | Annealing Temperature (°C) | Multiplied bands | Polymorphic bands | Band size (Minimum-Maximum)(bp) |
|-------------|--|----------------------------|------------------|-------------------|---------------------------------|
| UBC890 | VHV(GT) ₇ | 56 | 7 | 7 | 600-1700 |
| B9 | (GGT)2CAAG | 35 | 4 | 3 | 500-1000 |
| A12 | (GA) ₆ CC | 42 | 5 | 5 | 600-1700 |
| UBC807 | (AG) ₈ T | 46 | 5 | 3 | 300-2500 |
| UBC 811 | (GA) ₈ C | 48 | 2 | 2 | 750-1000 |
| UBC812 | (GA) ₈ A | 42 | 7 | 7 | 600-1700 |
| UBC820 | (GT) ₈ C | 52 | 6 | 6 | 500-1500 |
| UBC825 | (AC) ₇ T | 52 | 8 | 8 | 300-2000 |
| UBC827 | (AC) ₈ G | 54 | 7 | 7 | 750-2200 |
| UBC835 | (AG) ₈ YC | 52 | 3 | 3 | 750-2500 |
| UBC841 | (GA) ₈ YC | 41 | 6 | 6 | 350-1000 |
| UBC 848 | (CA) ₈ RG | 55 | 7 | 7 | 450-1600 |
| UBC867 | (GGC) ₆ | 40 | 3 | 3 | 500-1000 |
| UBC884 | HBH(AG) ₇ | 40 | 3 | 3 | 550-650 |
| UBC885 | (AC) ₈ YT | 40 | 4 | 4 | 500-1000 |
| A7 | (AG) ₁₀ T | 52 | 4 | 4 | 500-1000 |

[†]: R = A/T, Y = G/C, B = T/G/C; D = A/T/G, H = A/T/C, V = A/G/C

نتایج و بحث

تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی

حداقل، حداکثر، میانگین و ضریب تغییرات فنوتیپی صفات در ۱۰۰ ژنوتیپ مورد مطالعه (جدول ۳)، وجود تنوع ژنتیکی بالا در ژرمپلاسم ذرت مورد بررسی را نشان داد. بیشترین مقدار ضریب تغییرات فنوتیپی (به عنوان شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی) در صفت وزن دانه و کمترین مقدار آن در صفت تعداد بلال مشاهده شد (جدول ۳). مطالعات قبلی نیز وجود تنوع قابل ملاحظه در ژرمپلاسم ذرت را گزارش کرده‌اند. برای نمونه ارتفاع بوته بین ۰/۵ الی ۵ متر و روز تا گلدهی بین ۲ الی ۱۱ ماه در ذرت گزارش شده است (Yan et al., 2011). نتایج ارزیابی تنوع ژنتیکی با نشانگرهای ISSR نشان داد که به طور کلی ۱۶ آغازگر ISSR استفاده شده در این تحقیق، ۸۱ جایگاه ژنی را تکثیر کردند (جدول ۲). از بین این ۸۱ مکان، ۷۸ مکان ژنی (۹۵/۱۲ درصد) چندشکل بودند. تعداد آلل برای هر مکان ژنی بین ۲ تا ۵ آلل متغیر بود و میانگین تعداد آلل‌ها نیز ۲/۹۶ آلل به دست آمد (جدول ۲).

وجود تنوع وسیع در ذرت حدود هزاران سال پس از اهلی سازی این گیاه، می‌تواند علاوه بر آزاد کرده افشان بودن گیاه، به دلیل وجود عناصر قابل تحرک (Transposable elements) در ژنوم ذرت و وقوع حوادث جهش نیز باشد (Walbot, 2009). مطالعات قبلی (Tracy et al., 2006)

نیز وجود جهش‌های مختلف در کروموزوم‌های شماره ۳، ۴، ۵، ۹ و ۱۰ ذرت شیرین را گزارش کرده‌اند. وجود تنوع ژنتیکی در ژرمپلاسم ذرت، نه تنها پیش‌نیاز برنامه‌های دورگ‌گیری است، بلکه لازمه شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات مختلف از طریق تجزیه ارتباطی نیز می‌باشد. تجزیه ارتباطی بر مبنای تنوع ژنتیکی طبیعی درون جمعیتی و بر اساس مفهوم نامتعادلی پیوستگی ژنی (تفکیک هم‌زمان و غیرتصادفی دو مکان ژنی) است.

در مطالعات تجزیه ارتباطی لازم است از جمعیت‌های طبیعی استفاده شود که در حالت ایده‌آل نباید ساختاری در جمعیت مورد مطالعه وجود داشته باشد، زیرا وجود ساختار در جمعیت عامل بازدارنده جهت دستیابی به نتایج قابل اعتماد است و در صورتی که اثر ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در تجزیه ارتباط لحاظ نشوند، نتایج مثبت دروغین به دست می‌آید (Breseghello and Sorrells, 2006). از طرفی، تجزیه ساختار جمعیت به زیرجمعیت‌ها، شناسایی ژنوتیپ‌های مختلط را نیز امکان‌پذیر می‌سازد (Dadras et al., 2014). با توجه به تغییرات مقدار ΔK به‌ازای تعداد مختلف گروه‌ها (K) (شکل ۲) و بیشترین مقدار منحنی در $K=2$ ، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در دو گروه قرار گرفتند. وجود ساختار در جمعیت مورد بررسی بیانگر اهمیت استفاده از ماتریس ساختار در مطالعات مرتبط با تجزیه ارتباطی در ژرمپلاسم ذرت است تا بتوان درصد خطاهای مثبت را کاهش داد.

جدول ۳- آماره‌های توصیفی صفات مورفولوژیک مورد مطالعه در لاین‌های ذرت در این تحقیق

Table 3. Descriptive statistics of the studied morphological characters in maize lines in the current research

| Character | Mean | Minimum | Maximum | Coefficient of variation |
|-------------------------------|--------|---------|---------|--------------------------|
| Plant height | 149.87 | 58 | 252 | 17 |
| Plant height until first ear | 60.49 | 20 | 142 | 27 |
| Leaf length | 75.15 | 41 | 84 | 13 |
| Leaf width | 7.36 | 4 | 11 | 14 |
| Ear number | 1.78 | 1 | 3 | 3 |
| Chlorophyll content | 40.94 | 20 | 89 | 23 |
| Grain weight per plant | 43.36 | 0.5 | 151 | 69 |
| Cob's dry weight | 14.52 | 1.38 | 40 | 47 |
| Cob's diameter in first part | 2.54 | 0.8 | 4 | 20 |
| Cob's diameter in middle part | 2.26 | 0.6 | 6 | 23 |
| Cob's length | 13 | 4 | 21 | 26 |
| Plant dry weight | 51 | 15 | 135 | 36 |
| Days to tassel emergence | 68.88 | 42 | 93 | 45 |
| Days to first ear emergence | 78.10 | 60 | 93 | 7 |
| Days to second ear emergence | 85.93 | 71 | 103 | 7 |

درصد عضویت ۱۰۰ لاین ذرت مورد مطالعه به هر یک از زیرجمعیت‌ها در جدول ۱ ارایه شده است. در صورتی که درصد عضویت ژنوتیپی کم‌تر از ۰/۷ باشد، به‌عنوان ژنوتیپ مخلوط در نظر گرفته می‌شود (Spataro et al., 2011). با توجه به درصد عضویت هر ژنوتیپ به زیرگروه‌ها (جدول ۱) و باریلات حاصل از نرم‌افزار Structure (شکل ۳)، بیش‌ترین اختلاط در لاین‌های Chase/193/1387 و 66*1388 (هر دو از مشهد) مشاهده شد. از میان ۱۰۰ لاین، ۶۰ لاین به زیرجمعیت اول (قرمز) و ۳۸ لاین به زیرجمعیت دوم (سبز) تعلق داشت. از ۵۴ لاین مربوط به جمعیت مشهد، ۳۸ لاین (۷۰/۳۷ درصد) به زیرجمعیت دوم و ۱۴ لاین (۲۹/۶۳ درصد) به زیرجمعیت اول تعلق داشت و بنابراین همه لاین‌های زیرجمعیت دوم (سبز)، مربوط به جمعیت مشهد بودند (جدول ۱). همه لاین‌های جمعیت‌های کرمانشاه و کرج نیز در زیرجمعیت اول (قرمز) قرار گرفتند و می‌توان نتیجه گرفت که لاین‌های مربوط به این دو جمعیت از خویشاوندی بیش‌تری برخوردار هستند. وجود ساختار در ژرم‌پلاسما ذرت به‌دلیل فشار گزینشی از نظر صفات زراعی در برنامه‌های به‌نژادی گیاهی آن دور از ذهن نیست (Ersoz et al., 2009).

(Buckler et al., 2009). مقاومت به بیماری‌ها (Zwonitzer et al., 2010; Chen et al., 2012; Ding et al., 2012). تحمل به تنش‌های غیرزیستی (Agrama and Moussa, 1996). مورفولوژی گیاه (Xu et al., 2009; Ding et al., 2015b; Chen et al., 2016). رنگ گیاه (Chen et al., 2014) از طریق جمعیت‌های در حال تفرق و تجزیه QTL انجام شده است. در پژوهش حاضر، به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مهم آگرو-مورفولوژیک در لاین‌های ذرت، به‌دلیل وجود ساختار در ژرم‌پلاسما مورد بررسی، تجزیه ارتباطی با استفاده از مدل MLM انجام گرفت (جدول ۴). در تجزیه ارتباط با استفاده از مدل MLM در مجموع ۲۵ مکان ISSR که دارای ارتباط معنی‌داری ($P \leq 0.01$) با ژن‌های کنترل‌کننده صفات مورد بررسی بودند، شناسایی شدند. بر این اساس، سه مکان با ژن‌های کنترل‌کننده ارتفاع بوته، سه مکان با ژن‌های کنترل‌کننده ارتفاع بوته تا بلال، یک مکان با ژن‌های کنترل‌کننده طول برگ، دو مکان با ژن‌های کنترل‌کننده تعداد بلال، دو مکان با ژن‌های کنترل‌کننده وزن چوب بلال، دو مکان با ژن‌های کنترل‌کننده طول چوب بلال، دو مکان با ژن‌های کنترل‌کننده قطر ابتدای چوب بلال، دو مکان با ژن‌های کنترل‌کننده قطر وسط چوب بلال، سه مکان با ژن‌های کنترل‌کننده تاریخ ظهور گل‌نر، دو مکان با ژن‌های کنترل‌کننده تاریخ ظهور بلال اول و سه مکان با ژن‌های کنترل‌کننده وزن دانه پیوستگی نشان دادند (جدول ۴).

شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه

مطالعات بسیاری در ذرت در مورد تعیین جایگاه‌های ژنی کنترل‌کننده صفات مختلف مانند رسیدگی فیزیولوژیک

جدول ۴- نتایج حاصل از تجزیه ارتباطی با مدل MLM در ذرت با استفاده از نشانگرهای ISSR
Table 4. The results of association analysis with MLM model in maize using ISSR markers

| Trait | Locus | MLM | |
|-------------------------------|--------------|----------|----------|
| | | P-marker | F-marker |
| Plant height | ubc827(1700) | 0.00 | 9.78 |
| | ubc812(1000) | 0.00 | 8.69 |
| | B9(700) | 0.00 | 12.67 |
| Plant height until first ear | ubc827(1700) | 0.00 | 8.6 |
| | B9(700) | 0.00 | 9.9 |
| | ubc812(1000) | 0.00 | 9.47 |
| Leaf length | ubc884(550) | 0.01 | 7.88 |
| Ear number | ubc867(1000) | 0.00 | 11.1 |
| | 825(1000) | 0.00 | 93.31 |
| Grain weight per plant | ubc841(350) | 0.01 | 6.25 |
| | ubc841(500) | 0.01 | 6.23 |
| | ubc885(600) | 0.01 | 6.34 |
| Cob's weight | ubc841(500) | 0.01 | 6.61 |
| | ubc885(600) | 0.01 | 6.56 |
| Cob's diameter in first part | ubc841(500) | 0.00 | 13.79 |
| | ubc812(1000) | 0.00 | 11.79 |
| Cob's diameter in middle part | ubc812(1000) | 0.00 | 11.3 |
| | ubc848(1500) | 0.00 | 8.45 |
| | ubc835(750) | - | - |
| Cob's length | ubc885(500) | 0.01 | 7.98 |
| | ubc827(1700) | 0.00 | 8.72 |
| Plant dry weight | ubc848(750) | - | - |
| Days to tassel emergence | ubc841(350) | 0.00 | 11.37 |
| | ubc820(1500) | 0.01 | 7.36 |
| | ubc820(1500) | 0.01 | 6.89 |
| Days to first ear emergence | ubc884(550) | 0.00 | 8.46 |
| | ubc841(350) | 0.01 | 6.59 |

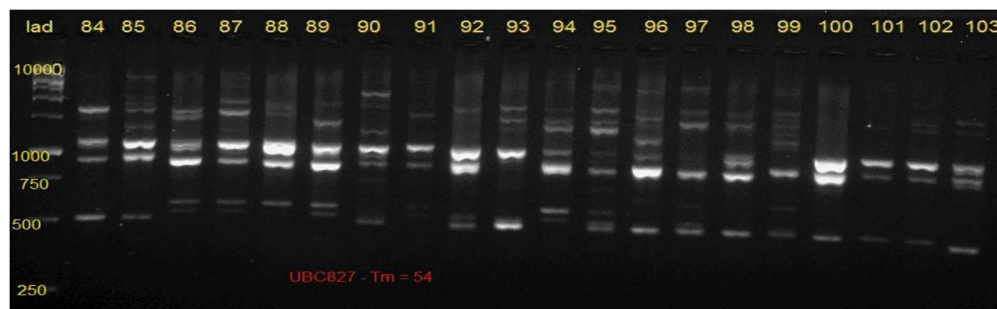
درصد از تغییرات فنوتیپی صفت را توجیه کردند. یک QTL اثر افزایشی، دو QTL اثر غالبیت و دو QTL اثر غالبیت ناقص داشتند. لی و همکاران (Li *et al.*, 2016) نیز از طریق تجزیه ارتباطی، ۴۱ نشانگر SNP پیوسته با صفات ارتفاع بوته و بلال شناسایی کردند.

سرجیو و همکاران (Sergio *et al.*, 2003) با استفاده از یک جمعیت در حال تفرق، چهار نشانگر SSR پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده عملکرد دانه به ترتیب با اثر افزایشی ۸۵/۴۷، ۸۰/۳۹، ۷۷/۶۲- و ۹۱/۴۶- در گروه‌های پیوستگی ۲، ۷ و ۸ گزارش کردند که ۱۱/۱۸-۵/۲۲ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت را توجیه کردند. دومنیک و همکاران (Domenyuk *et al.*, 2002) با استفاده از یک جمعیت در حال تفرق F₂ ذرت، تعداد نه نشانگر ISSR پیوسته برای ارتفاع بوته و ۱۱ نشانگر ISSR پیوسته برای وزن ۱۰۰ دانه شناسایی کردند. در مطالعه‌ای دیگر، ارتباط معنی‌دار بین

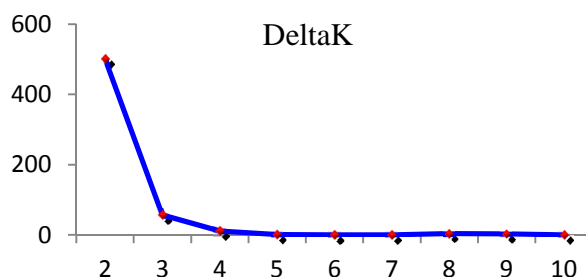
تراکم گیاهی به‌عنوان یک عامل مهم در افزایش عملکرد ذرت مطرح است (Cardwell, 1982; Zhang *et al.*, 2014). صفاتی از قبیل ارتفاع بوته و ارتفاع بلال در ذرت تاثیر به‌سزایی در تعیین تراکم گیاهی دارند (Cai *et al.*, 2012). فهم بهتر ساختار ژنتیکی این صفات به به‌نژادگران کمک می‌کند تا وارثه‌هایی را توسعه دهند که به تراکم بالا متحمل باشند و به این ترتیب بتوان عملکرد را افزایش داد (Li *et al.*, 2016). در مطالعه‌ای، زانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2006) برای صفت ارتفاع بوته، نه QTL در گروه‌های پیوستگی ۲، ۳، ۴، ۸ و ۹ شناسایی کردند که هر QTL ۵/۵۱-۱۵/۱۹ درصد و همه آن‌ها در مجموع ۷۸/۲۷ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت را توجیه کردند. یکی از QTLها اثر فوق غالبیت، دو QTL اثر افزایشی و سایر QTLها اثر غالبیت نشان دادند. آن‌ها برای ارتفاع چوب بلال پنج QTL شناسایی کردند که در کل ۴۱/۵۰

نشان می‌دهند که مکان‌های بین‌ریزماهورهای در ذرت با نواحی ژنومی کنترل‌کننده صفات در عدم تعادل پیوستگی هستند و می‌توانند به‌طور موثری در مطالعات مکان‌یابی ژن در این گیاه استفاده شوند.

نشانه‌های ISSR و مقاومت به بیماری سوختگی برگ در ذرت با استفاده از یک جمعیت در حال تفرق F₂ شناسایی شد (Barakat *et al.*, 2009). اگرچه نشانه‌های ISSR مورد استفاده در تحقیق حاضر با گزارش‌های قبلی (Barakat *et al.*, 2009) مشابهت ندارند، اما هم‌سو با آنها



شکل ۱- نوارهای تولید شده در تعدادی از لاین‌های ذرت مورد مطالعه به‌وسیله الکتروفورز ژل آگارز با استفاده از نشانگر UBC827
Figure 1. Fingerprint of the some studied maize lines produced by agarose gel electrophoresis using UBC827 ISSR primer



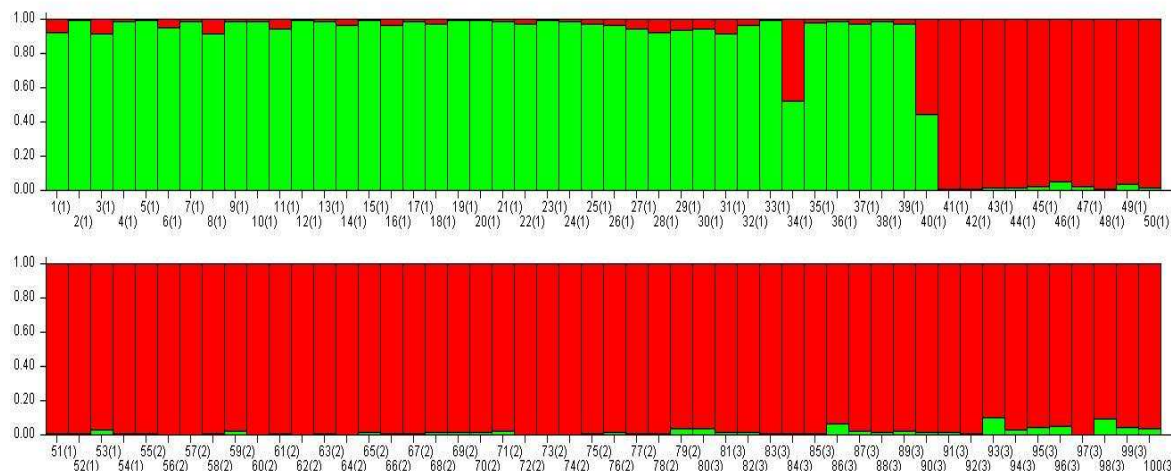
شکل ۲- بای‌پلات نرم‌افزار Structure برای تعیین تعداد زیرجمعیت‌ها (K=۲) در ژرم‌پلاسم ذرت مورد مطالعه با استفاده از نشانه‌های ISSR
Figure 2. Bilateral graphs from Structure software to determine optimum subpopulations (K=2) in the studied maize germplasm using ISSR markers

2016) تعدادی از نشانه‌های ریزماهور به‌طور هم‌زمان با بیش از یک صفت زراعی پیوسته بودند. در این تحقیق نیز، برخی از نشانه‌های ISSR با چند صفت پیوسته بودند که از آن جمله می‌توان به نشانگر UBC827 که با صفات ارتفاع بوته و ارتفاع بوته تا بلال پیوسته بود، اشاره کرد. همچنین، نشانگر UBC812 با صفات ارتفاع بوته، ارتفاع بوته تا بلال، طول برگ، قطر ابتدای چوب بلال، قطر وسط چوب بلال و طول چوب بلال و نشانگر B9 با صفات ارتفاع بوته و ارتفاع بوته تا بلال پیوستگی نشان دادند. سایر نشانه‌ها نیز از جمله UBC890، UBC841، UBC885، UBC884 و UBC885 بین صفات مختلف مشترک بودند. وجود نشانه‌های

در پژوهش حاضر، تعداد نشانه‌های مثبت شناسایی شده در مدل MLM در مقایسه با مدل GLM کم‌تر بود (داده‌ها ارائه نشده‌اند) و نشان داد که استفاده از مدل MLM (Q+K) در ذرت بهبود معنی‌داری در کاهش نتایج مثبت کاذب در تجزیه ارتباط در مقایسه با مدل‌های خطی منفرد K یا Q ارائه می‌دهد (Zhu *et al.*, 2008). در تحقیقی که به‌منظور مکان‌یابی ارتباطی صفات زراعی در ذرت با استفاده از نشانه‌های ریزماهور انجام گرفت (Mikic *et al.*, 2016)، مشخص شد که تعداد نشانه‌های مثبت شناسایی شده در مدل MLM در مقایسه با GLM کم‌تر است. همچنین، در مطالعه آنها (Mikic *et al.*)

مشترک بین چندین صفت ممکن است به دلیل پلائیوتروپی و یا پیوستگی ژن‌ها باشد (Jun *et al.*, 2008). نواحی ژنومی مهم شناسایی شده که در کنترل بیش از یک صفت مهم نقش دارند و درصد قابل توجهی از تغییرات صفات را توجیه می‌کنند، در صورت تأیید با آزمایش‌های تکمیلی می‌توانند به نشانگرهای اختصاصی SCAR تبدیل

مشتک برای غربال جمعیت‌ها و انتخاب به‌کمک نشانگر (MAS) استفاده شوند. از آنجا که شناسایی نشانگرهای مشترک گزینش هم‌زمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازد (Tuberosa *et al.*, 2002) از اهمیت ویژه‌ای در به‌زادگی گیاهان برخوردار است.



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

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

استفاده از تجزیه ارتباطی، نشانگرهای مثبت مشترکی برای صفاتی از قبیل وزن چوب بلال، قطر ابتدای بلال و وزن دانه در بوته و نیز صفات تاریخ ظهور گل نر و تاریخ ظهور بلال اول شناسایی شدند که چنین نشانگرهای مشترکی امکان گزینش هم‌زمان برای این صفات را امکان‌پذیر می‌سازند.

نتیجه‌گیری کلی

ژرم‌پلاسما ذرت مورد مطالعه در این تحقیق، دارای تنوع ژنتیکی قابل توجهی جهت انجام تجزیه ارتباطی بود. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده کارایی نشانگرهای بارز مانند ISSR در تعیین ساختار جمعیت گیاهی در گیاه ذرت بود. با

References

- Amirtaimoori, S. and Chizari, A. H. 2008. Investigation of sustainable self-sufficiency in maize production in Iran: Total factor productivity approach. *Pajouhesh and Sazandegi* 79: 169-177. (In Persian with English Abstract).
- Barakat, M. N., El-Shafei, A. A. and Al-Doss, A. A. 2009. Identification of molecular markers linked to northern corn leaf blight resistance in yellow population of maize. *Genes, Genomes and Genomics* 3: 89-95.
- Breseghele, F. and Sorrells, M. E. 2006. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Science* 46: 1323-1330.
- Buckler, E. S., Holland, J. B., Bradbury, P. J., Acharya, C. B., Brown, P. J., Browne, C., Ersoz, E., Flint-Garcia, S., Garcia, A., Glaubitz, J. C., Goodman, M. M., Harjes, C., Guill, K., Kroon, D. E., Larsson, S., Lepak, N. K., Li, H., Mitchell, S. E., Pressoir, G., Peiffer, J. A., Rosas, M. O., Rocheford, T. R., Romay, M. C., Romero, S., Salvo, S., Sanchez Villeda, H., da Silva, H. S., Sun, Q., Tian, F., Upadyayula, N., Ware, D., Yates, H., Yu, J., Zhang, Z., Kresovich, S. and McMullen, M. D. 2009. The genetic architecture of maize flowering time. *Science* 325: 714-718.
- Cai, H., Chu, Q., Gu, R., Yuan, L., Liu, J., Zhang, X., Chen, F., Mi, G. and Zhang, F. 2012. Identification of QTLs for plant height, ear height and grain yield in maize (*Zea mays* L.) in response to nitrogen and phosphorus supply. *Plant Breeding* 131: 502-510.

- Cardwell, V. B. 1982.** Fifty years of Minnesota corn production: Sources of yield increase. **Agronomy Journal** 74: 984-990.
- Chen, J., Ding, J., Li, H., Li, Z., Sun, X., Li, J., Wang, R., Dai, X., Dong, H., Song, W., Chen, W., Xia, Z. and Wu, J. 2012.** Detection and verification of quantitative trait loci for resistance to Fusarium ear rot in maize. **Molecular Breeding** 30: 1649-1656.
- Chen, Y., Chen, J. and Wu, J. 2014.** Fine mapping of gene Rab1 for red glume collar in maize. **Acta Agriculturae Boreali-Sinica** 29: 7-12.
- Chen, J., Zhang, L., Liu, S., Li, Z., Huang, R., Li, Y., Cheng, H., Li, X., Zhou, B., Wu, S., Chen, W., Wu, J. and Ding, J. 2016.** The genetic basis of natural variation in kernel size and related traits using a four-way cross population in maize. **PLoS ONE** 11: e0153428.
- Ding, J., Li, H., Wang, Y., Zhao, R., Zhang, X., Chen, J., Xia, Z. and Wu, J. 2012.** Fine mapping of *Rscmv2*, a major gene for resistance to sugarcane mosaic virus in maize. **Molecular Breeding** 30: 1593-1600.
- Ding, J., Ali, F., Gengshen, C., Li, H., Mahuku, G., Yang, N., Narro, L., Magorokosho, C., Makumbi, D. and Yan, J. 2015a.** Genome-wide association mapping reveals novel sources of resistance to northern corn leaf blight in maize. **BMC Plant Biology** 15: 206: 1-11.
- Ding, J., Zhang, L., Chen, J., Li, X., Li, Y., Cheng, H., Huang, R., Zhou, B., Li, Z., Wang, J. and Wu, J. 2015b.** Genomic dissection of leaf angle in maize (*Zea mays* L.) using a four-way cross mapping population. **PLoS ONE** 10: e0141619.
- Domenyuk, V. P., Verbitskaya, T. G., Belousov, A. A. and Sivolap, I. M. 2002.** Marker analysis of quantitative traits in maize by ISSR-PCR. **Russian Journal of Genetics** 38 (10): 1161-1168.
- Ersoz, E. S., Yu, J. and Buckler, E. S. 2009.** Applications of linkage disequilibrium and association mapping in maize. In Kriz, A. L. and Larkins, B. A. (Eds.). *Molecular genetic approaches to maize improvement*. Springer-Verlag, New York, NY. pp: 173-195.
- 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.
- Fraley, R. T. 2009.** Molecular genetic approaches to maize improvement—an introduction. In: Kriz, A. L. and Larkins, B. A. (Eds.). *Molecular genetic approaches to maize improvement*. Springer, Berlin Heidelberg. pp: 3-6.
- 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.
- Holland, J. B. 2007.** Genetic architecture of complex traits in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 10: 156-161.
- Idris, A. E., Hamza, N. B., Yagoub, S. O., Ibrahim, A. I. A. and El-Ami, H. K. A. 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: 42-47.
- 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** 162: 179-191.
- Karimi, H. 2007.** Forage crops breeding and cultivation. Tehran University Press, Tehran, Iran. 428 p. (In Persian).
- Krakowsky, M. D., Lee, M., Garay, L., Woodman-Clikeman, W., Long, M. J., Sharopova, N., Frame, B. and Wang, K. 2006.** Quantitative trait loci for callus initiation and totipotency in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 113: 821-830.
- Le Clerc, V., Bazante, F., Baril, C., Guiard, J. and Zhang, D. 2005.** Assessing temporal changes in genetic diversity of maize varieties using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics** 110: 294-302.
- Li, X., Zhou, Z., Ding, J., Wu, Y., Zhou, B., Wang, R., Ma, J., Wang, S., Zhang, X., Xia, Z., Chen, J. and Wu, J. 2016.** Combined linkage and association mapping reveals QTL and candidate genes for plant and ear height in maize. **Frontiers in Plant Science** 7: 833.
- Ministry of Jihad-e-Agriculture. 2015.** Agricultural statistics, Vol. 1: Crop plants. General Directorate of Statistics and Information, Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran. (In Persian).
- Mohammadi, S. A. and Prasanna, B. M. 2003.** Analysis of genetic diversity in crop plants- salient statistical tools and considerations. **Crop Science** 43: 1235-1248.

- Molin, D., Coelho, C. J., Máximo, D. S., Ferreira, F. S., Gardingo, J. R. and Matiello, R. R. 2013.** Genetic diversity in the germplasm of tropical maize landraces determined using molecular markers. **Genetics and Molecular Research** 12: 99-114.
- Moose, S. P. and Mumm, R. H. 2008.** Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. **Plant Physiology** 147: 969-977.
- Muhammad, R. W., Qayyum, A., Ahmad, 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): gmr16019438. doi: 10.4238/gmr16019438.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. 1980.** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research** 8: 4321-4325.
- Osipova, E. S., Koveza, O. V., Troitskij, A. V., Dolgikh, Y. I., Shamina, Z. B. and Gostimskij, S. A. 2003.** Analysis of specific RAPD and ISSR fragments in maize (*Zea mays* L.) somaclones and development of SCAR markers on their basis. **Russian Journal of Genetics** 39 (12): 1412-1419.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Rosenberg, N. A. and Donnelly, P. 2000.** Association mapping in structured populations. **American Journal of Human Genetics** 67: 170-181.
- Sergio T. S., Cláudio Lopes De Souza, J. R., Antonio Augusto Franco, G., Adelmo Rezende, S., Alexandre Franco, G., Claudete Aparecida, M., Luciana Lasry, B. and Anete Pereira, D. S. 2003.** Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 2: Quantitative trait loci (QTL) for grain yield, plant height, ear height and grain moisture. **Hereditas** 139: 107-115.
- Mikic, S., Kondic-Spika, A., Brbaklic, L., Stanisavljevic, D., Trkulja, D., Tomicic, M., Nastasic, A., Kobiljski, B., Prodanovic, S. and Momirovic, G. S. 2016.** Multiple marker-traits associations for maize agronomic traits. **Chilean Journal of Cultural Research** 76: 300-306.
- Sibov, S. T., de Souza, C. L., Garcia, A. A. F., Silva, A. R., Garcia, A. F., Mangolin, C. A., Lasry Benchimol, L. and Pereira de Souza, A. 2003.** Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 2: Quantitative trait loci (QTL) for grain yield, plant height, ear height and grain moisture. **Hereditas** 139 (2): 107-115.
- Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R. and Negri, V. 2011.** Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. **Theoretical and Applied Genetics** 122: 1281-1291.
- Tajbakhsh, M. 1996.** Maize: Agronomy, breeding, pests and diseases. Ahrar Press, Tabriz, Iran. 136 p. (In Persian).
- Tracy, W. F., Whitt, S. R. and Buckler, E. S. 2006.** Recurrent mutation and genome evolution: Example of sugary1 and the origin of sweet maize. **Crop Science** 46: 1-7.
- Tuberosa, R., Gill, B. S. and Quarrie, S. A. 2002.** Cereal genomics: Ushering in a brave new world. **Plant Molecular Biology** 48: 445-449.
- Walbot, V. 2009.** 10 reasons to be tantalized by the B73 maize genome. **PLoS Genet** 5: e1000723.
- Xu, D. L., Cai, Y. L., Lv, X. G., Dai, G. Q., Wang, G. Q., Wang, J. G., Sun, H. Y. and Tan, H. N. 2009.** QTL mapping for plant-tape traits in maize. **Journal of Maize Science** 17: 27-31.
- Yan, J., Warburton, M. and Crouch, J. 2011.** Association mapping for enhancing maize (*Zea mays* L.) genetic improvement. **Crop Science** 51: 433-449.
- Zhu, C., Gore, M., Buckler, E. S. and Yu, J. 2008.** Status and prospects of association mapping in plants. **The Plant Genome** 1: 5-20.
- Zhang, Z. M., Zhao, M. J., Ding, H. P., Rong, T. Z. and Pan T. 2006.** Quantitative trait loci analysis of plant height and ear height in maize (*Zea mays* L.). **Russian Journal of Genetics** 42: 306-310.
- Zhang, Q., Zhang, L., Evers, J., van der Werf, W., Zhang, W. and Duan, L. 2014.** Maize yield and quality in response to plant density and application of a novel plant growth regulator. **Field Crops Research** 164: 82-89.
- Zwonitzer, J. C. J., Coles, N. D. N., Krakowsky, M. D., Arellano, C., Holland, J. B., McMullen, M. D., Pratt, R. C. and Balint-Kurti, P. J. 2010.** Mapping resistance quantitative trait loci for three foliar diseases in a maize recombinant inbred line population: Eevidence for multiple disease resistance? **Phytopathology** 100: 72-79.



University of Guilan
Faculty of Agricultural
Sciences

Cereal Research
Vol. 8, No. 1, Spring 2018 (97-109)

Identification of Inter simple sequence repeat regions associated with agro-morphological traits in maize genome

Ali Ghaffari Azar¹, Reza Darvishzadeh^{2,3*}, Hamid Hatami Maleki⁴, Danial Kahrizi⁵, Babak Darvishi⁶ and Iraj Bernoosi⁷

Received: August 16, 2017

Accepted: March 17, 2018

Abstract

Maize (*Zea mays* L.) as a model plant is important from agricultural, feed and industrial point view. Most of economically important traits and morphological traits are controlled by several genes and also influenced by environment effects and hence possessed complicated genetic control. This research was aimed to study the genetic control and identification of genomic regions controlling agro-morphological traits in maize germplasm using association analysis approach. Maize inbred lines were evaluated based on morphological and 16 ISSR primers. Results of morphological and genetically evaluations trials revealed existence of genetic variability in the studied germplasm which is mandatory item for successful association analysis study. Analysis of population structure using 81 ISSR loci divided the population into 2 sub-populations. Among studied lines, lines 1387/193/chase (Mashhad population) and 66*1388 (Mashhad population) showed maximum genetic admixture. Association analysis using MLM model represented 25 ISSR loci which possessed significant relation with studied traits. Positive markers identified in this research, could effectively applied in marker assisted selection programs to achieve suitable parental lines and also improvement of trait of interest. Also, this is resulted that inter simple sequence regions have acceptable ability and performance in association mapping of maize.

Keywords: Germplasm, Molecular markers, QTL mapping, Quantitative traits

1. M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

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

3. Professor, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Plant Genetics and Production, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

5. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Razi, Kermanshah, Iran.

6. Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

7. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran

* Corresponding author: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir