University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

Cereal Research
Vol. 12, No. 3, Autumn 2022 (281-295)
doi: 10.22124/CR.2023.24569.1769
pISSN: 2252-0163 eISSN: 2538-6115

RESEARCH PAPER OPEN ACCESS

Investigating the genetic diversity of grain maize lines using microsatellite markers

Ebrahim Souri Laki[1*], Seyyed Hassan Marashi[2] and Vahid Jokarfard[3]

1. Ph.D. Graduate, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran (*Corresponding author: souri.um2018@gmail.com)
2. Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Comprehensive abstract

Introduction

Maize is one of the most important sources of energy supply to feed poultry, livestock, as well as humans, and the primary and raw material for industrial and food products. This valuable crop plant in terms of world production ranks third after wheat and rice. Since knowing the genetic diversity in germplasm collections and determining the genetic relationships between breeding materials is the first and most important step in breeding researches, so identifying high diversity and suitable genetic potential lines is one of the goals of plant breeders to product and introduce new varieties. The objective of this study is to investigate the genetic diversity of 18 maize inbred lines using microsatellite (SSR) markers, to evaluate the efficiency of the studied markers, and to introduce the most appropriate ones in determining the genetic diversity of maize lines.

Materials and methods

The plant materials of this research included 18 inbred lines of maize prepared from the Agriculture and Natural Resources Research Center of Khorasan-Razavi province, Iran. DNA extraction was carried out by CTAB method from fresh and young leaf samples after the three-leaf stage of seedlings. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a final volume of 10 µl, and horizontal electrophoresis on 3% agarose gels as well as vertical electrophoresis on 6% polyacrylamide gels were used to observe the amplified fragments. For data analysis, first the amplified fragments (bands) on the gels were valued and quantified, so that the numbers 1 and 0 were considered for the presence and absence of each band in each maize line, respectively. To evaluate the genetic diversity, different diversity indices including number of effective alleles, polymorphic information content (PIC) and Nei's gene diversity were estimated using POPGEN software, and the most suitable markers were introduced. To group the studied maize lines, cluster analysis and principal coordinates analysis were performed and the corresponding graphs were drawn using NTSYSpc 2.0 software.

Research findings

Assessing the genetic diversity of maize lines based on microsatellite markers showed that 20 SSR markers used in this research amplified a total of 81 scorable loci, whose size ranged from 65 to 200 bp. The average number effective alleles, polymorphism information content and Nei's gene diversity were calculated as 2.05, 0.71 and 0.62, respectively, indicating that there was a considerable genetic diversity among the studied maize lines. Evaluating the polymorphic information content (PIC) index showed that the markers used in this study had highly variable PIC from 0.28 (for Phi024) to 0.91 (for Phi038) with an average of 0.71. Cluster analysis by UPGMA method using Jaccard similarity

coefficient grouped 18 maize inbred lines into three distinct clusters with 1, 6 and 11 lines, respectively. Molecular analysis of variance based on three groups derived from cluster analysis showed that 11% and 89% of the total variance was between and within population, respectively. The results of principal coordinate analysis and grouping if maize lines based on the bi-plot of the first and second vectors confirmed the grouping of the cluster analysis.

Conclusion

The results of the current study showed that there was a significant genetic diversity among the studied maize lines, which can be used in breeding programs. Also, microsatellite markers (SSRs) had the ability to assess the genetic diversity and separation of maize genotypes from each other. Evaluating the different diversity indices for the studied markers in this research showed that the markers Phi034, Phi038, Phi076, Phi084, and Phi092 were more suitable markers for determining genetic diversity. Therefore, it is recommended to use these informative markers to determine genetic diversity as well as to identify heterotic pattern in maize breeding programs.

Keywords: Cluster analysis, Informative markers, Polymorphic information content, Principal coordinate analysis

Received: July 23, 2022 Accepted: November 07, 2022

Cite this article:

Souri Laki, E., Marashi, S.H. and Jokarfard, Vahid. 2023. Investigating the genetic diversity of grain maize lines using microsatellite markers. *Cereal Research*, 12(3), pp. 281-295.

تحقیقات غلات
دوره دوازدهم، شماره سوم، پاییز ۱۴۰۱ (۲۹۵-۲۸۱)
doi: 10.22124/CR.2023.24569.1769
مقاله پژوهشی
دسترسی آزاد

ارزیابی تنوع ژنتیکی لاین‌های ذرت دانه‌ای با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

ابراهیم سوری لکی[1*]، سید حسن مرعشی[2] و وحید جوکارفرد[3]

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران (* نویسنده مسئول: souri.um2018@gmail.com)

۲- استاد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده جامع

مقدمه: ذرت یکی از مهم‌ترین منابع تأمین انرژی در تغذیه طیور، دام و همچنین انسان و ماده خام تولیدات صنعتی و غذایی است. این گیاه زراعی ارزشمند از نظر تولید جهانی بعد از گندم و برنج در رتبه سوم دنیا قرار دارد. از آن‌جایی که آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی در مجموعه ژرم‌پلاسم و تعیین روابط ژنتیکی بین مواد اصلاحی، اولین و اصلی‌ترین مرحله در پژوهش‌های به‌نژادی است، از این‌رو شناسایی لاین‌های با پتانسیل ژنتیکی مناسب و تنوع بالا یکی از اهداف به‌نژادگران گیاهی جهت تهیه و معرفی ارقام جدید می‌باشد. هدف از این پژوهش، بررسی میزان تنوع ژنتیکی ۱۸ لاین اینبرد ذرت با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (SSR)، ارزیابی کارآیی نشانگرها و معرفی مناسب‌ترین آنها در تعیین تنوع ژنتیکی لاین‌های ذرت بود.

مواد و روش‌ها: مواد گیاهی این تحقیق شامل ۱۸ لاین اینبرد ذرت تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی بود. استخراج DNA به روش CTAB از نمونه‌های برگی تازه و جوان پس از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله سه برگی انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام و جهت مشاهده قطعات تکثیرشده، از الکتروفورز افقی روی ژل‌های آگارز سه درصد و نیز از الکتروفورز عمودی روی ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید شش درصد استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا قطعات تکثیرشده (نوارها) روی ژل‌ها، ارزش‌گذاری و کمی شدند، به این ترتیب که اعداد یک و صفر به‌ترتیب برای وجود و عدم وجود هر نوار در هر یک از لاین‌های ذرت در نظر گرفته شد. سپس جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی، شاخص‌های مختلف تنوع از جمله تعداد آلل موثر، محتوای اطلاعات چندشکلی و تنوع ژنی نئی با استفاده از نرم‌افزار POPGEN برآورد و مناسب‌ترین نشانگرها معرفی شدند. برای گروه‌بندی لاین‌های ذرت مورد مطالعه نیز تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی انجام و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc 2.0 رسم شدند.

یافته‌های تحقیق: ارزیابی تنوع ژنتیکی لاین‌های ذرت بر اساس نشانگرهای ریزماهواره نشان داد که ۲۰ نشانگر ریزماهواره استفاده شده در این پژوهش در مجموع ۸۱ مکان قابل امتیازدهی تولید کردند که اندازه آنها در محدوده ۲۰۰-۶۵ جفت باز متغییر بود. متوسط تعداد آلل موثر، محتوای اطلاعات چندشکلی و تنوع ژنی نئی به‌ترتیب ۲/۰۵، ۰/۷۱ و ۰/۶۲ محاسبه شد و نشان داد که تنوع قابل توجهی بین لاین‌های مورد مطالعه وجود داشت. بررسی محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نشان داد که نشانگرهای استفاده شده در این پژوهش دارای PIC بسیار متغیر از ۰/۲۸ (برای نشانگر Phi024) تا ۰/۹۱ (برای نشانگر Phi038) با میانگین ۰/۷۱ بودند. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد، ۱۸ لاین اینبرد ذرت

را در سه خوشه متمایز به‌ترتیب با تعداد ۱، ۶ و ۱۱ لاین گروه‌بندی کرد. تجزیه واریانس مولکولی بر اساس سه گروه حاصل از تجزیه خوشه‌ای نیز نشان داد که ۱۱ درصد از تنوع کل در بین گروه‌ها و ۸۹ درصد در درون گروه‌ها وجود داشت. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی و گروه‌بندی لاین‌ها بر اساس بای‌پلات حاصل از دو بردار اول و دوم، گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای را مورد تایید قرار داد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل توجهی در بین لاین‌های ذرت مورد مطالعه وجود داشت که از این تنوع می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد. همچنین، نشانگرهای ریزماهواره (SSR) توانایی تشخیص تنوع و تفکیک ژنوتیپ‌های ذرت را از یکدیگر دارند. ارزیابی شاخص‌های مختلف تنوع برای نشانگرهای مطالعه شده در این تحقیق نشان داد که نشانگرهای Phi034، Phi038، Phi076، Phi084 و Phi092 نشانگرهای بهتری برای تعیین تنوع ژنتیکی بودند. بنابراین، استفاده از این نشانگرهای آگاهی‌بخش جهت تعیین تنوع ژنتیکی و نیز شناسایی الگوی هتروتیک در برنامه‌های به‌نژادی ذرت پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه به مولفه‌های اصلی، تجزیه خوشه‌ای، محتوای اطلاعات چندشکلی، نشانگرهای آگاهی‌بخش

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۶

نحوه استناد به این مقاله:

سوری لکی، ابراهیم، مرعشی، سید حسن، و جوکارفرد، وحید. ۱۴۰۱. ارزیابی تنوع ژنتیکی لاین‌های ذرت دانه‌ای با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. *تحقیقات غلات*، ۱۲(۳): ۲۹۵-۲۸۱.

مقدمه

ذرت (*Zea mays* L.) گیاهی تک‌لپه و یک‌ساله، از خانواده گرامینه یا غلات و زیر خانواده Maydeae با 2n=20 کروموزوم است که بیش‌تر در مناطق گرمسیری و معتدل جهان کشت می‌شود و از نظر تولید جهانی بعد از گندم و برنج، مقام سوم را به‌خود اختصاص داده است (FAO, 2015). ذرت یکی از مهم‌ترین منابع تامین انرژی برای انسان و همچنین برای دام و طیور است، و ماده خام تولیدات صنعتی و غذایی محسوب می‌شود. در ایران کشت ذرت دانه‌ای به‌دلیل نقش و سهم ۷۰-۶۵ درصدی آن در ترکیب جیره غذایی طیور، روز به روز توسعه بیش‌تری پیدا کرده و ضرورت افزایش تولید آن آشکارتر می‌شود. ایران با داشتن شرایط اقلیمی مناسب و متنوع، از جمله مناطق با پتانسیل بالا جهت تولید ذرت است و بنابراین، اجرای برنامه‌های به‌نژادی به‌منظور افزایش عملکرد در واحد سطح با توجه به محدودیت‌های اراضی زراعی، امری ضروری است (Sandhu *et al*., 2007).

آگاهی از مقدار تنوع ژنتیکی ذخایر وراثتی گونه‌های گیاهی در به‌نژادی از اهمیت بالایی برخوردار است. کاهش تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی علاوه بر افزایش اپیدمی امراض و بیماری‌ها، احتمال شناسایی ترکیب‌های ژنی جدید و مفید را کاهش و سرعت اصلاح گیاهان را کندتر می‌کند. از آن‌جایی که کشاورزی و تولید محصول به استفاده از ارقام با عملکرد بالا بستگی دارد، بنابراین تنوع ژنتیکی در گیاهان از نظر کاربردی بسیار مورد توجه است، به‌طوری‌که انتخاب موفقیت‌آمیز ژنوتیپ‌های برتر از داخل توده‌های مورد اصلاح به وجود تنوع ژنتیکی بستگی دارد و بدون آن پیشرفت چندانی در اصلاح گیاهان زراعی ممکن نیست (Semagn *et al*., 2010). عوامل بسیاری در ایجاد تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی نقش دارند که از این عوامل می‌توان به جهش، مهاجرت، نوترکیبی، گزینش و رانش ژنتیکی اشاره کرد. 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 محسوب می‌شود. همچنین وجود تنوع در ذرت برای بهبود ژرم‌پلاسم و توسعه ارقام مصنوعی با استفاده از ژن‌های پیوسته با صفات مطلوب از جمله تحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی ضروری است (Hoxha *et al*., 2004).

مطالعه تنوع ژنتیکی در ذرت به دلایل زیر ضروری و دارای اهمیت است: ۱- مطالعه تنوع ژنتیکی جهت حفظ و گسترش تنوع در منابع ژرم‌پلاسم ضروری است، ۲- با توجه به سطح زیر کشت وسیع ذرت، ارزیابی لاین‌ها و شناسایی ترکیب‌های برتر بسیار مهم است، ۳- شناسایی و استخراج لاین‌های برتر از منابع ژنتیکی، ۴- بررسی تنوع نه تنها برای بهبود ژنتیکی ذرت، بلکه جهت کاهش حساسیت به تنش‌های زنده و غیرزنده محیطی اهمیت دارد (Bernardo, 2001).

ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌های موجود در ژرم‌پلاسم‌ها می‌تواند بر اساس صفات ریخت شناسی و روش‌های سنتی یا کلاسیک انجام شود. اگرچه با استفاده از این روش‌ها در دهه‌های گذشته موفقیت‌های بسیار زیادی به‌دست آمده است، اما روش‌های کلاسیک به‌دلیل زمان‌بر بودن به‌تنهایی کافی نیستند. امروزه نشانگرهای مولکولی DNA به‌عنوان ابزاری قدرتمند در ارزیابی تنوع و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در اختیار به‌نژادگران بوده و استفاده از آنها به‌عنوان روش مکمل، به فرایند به‌نژادی گیاهان سرعت و دقت بخشیده است (Mir-Mohammadi Maibody and Golkar, 2019).

تا کنون پژوهش‌های بسیاری در زمینه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و لاین‌های ذرت با نشانگرهای مولکولی انجام شده است (Lu and Bernardo, 2001; Elsadig Idris *et al*., 2012). دهقان نیری و همکاران (Dehghan Naieri *et al*., 2005) در پژوهشی با استفاده از ۱۰ جفت نشانگر ریزماهواره به بررسی تنوع ژنتیکی ۴۶ لاین اینبرد ذرت پرداختند. آن‌ها گزارش کردند که نشانگرهای ریزماهواره چندشکلی بالایی را در بین لاین‌های ذرت نشان می‌دهند و ابزار مفیدی برای انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌ها و دسته‌بندی آن‌ها هستند. وانگ و همکاران (Wang *et al*., 2008) نیز تنوع ژنتیکی ۹۵ لاین ذرت را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مطالعه و گزارش کردند که تنوع ژنتیکی در لاین‌های اینبرد ذرت کاهش یافته و اصلاح شجره‌ای سبب تولید لاین‌های اینبرد برگزیده‌ای شده است که پایه ژنتیکی در آن‌ها بسیار کاهش یافته است. محمد و همکاران (Muhammad *et al*., 2017) تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ذرت را با استفاده از نشانگرهای ISSR ارزیابی کردند و نشان دادند که نشانگرهای ISSR نیز توانایی تعیین تنوع و تمایز ژنوتیپ‌های ذرت را دارند. رضایی و همکاران (Rezaie *et al*., 2018) نیز با هدف

تعیین گروه‌های هتروتیک، تنوع ژنتیکی ۲۷ لاین اینبرد ذرت فوق شیرین را به‌وسیله نشانگرهای ریزماهواره بررسی کردند. در مجموع ۳۶ باند با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر ریزماهواره تکثیر شد و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) نشانگرها از ۰/۵۵ تا ۰/۹۱ با میانگین ۰/۷۳ متغییر بود. نتایج آن‌ها نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، شناسایی گروه‌های هتروتیک و پیش‌بینی هتروزیس در ذرت بسیار مناسب هستند.

در این تحقیق نیز تنوع ژنتیکی تعدادی از لاین‌های خالص ذرت با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ارزیابی می‌شود. هدف از اجرای تحقیق، تعیین روابط ژنتیکی لاین‌های خالص مورد استفاده در برنامه‌های اصلاحی و تولید ارقام هیبرید ذرت، گروه‌بندی لاین‌ها بر اساس داده‌های حاصل از نشاگرهای ریزماهواره و پیش‌بینی برترین هیبریدها است. بدیهی است نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند در مدیریت و بهره‌برداری از لاین‌ها و اصلاح هدف‌مند آن‌ها بسیار مفید و موثر باشد و مسیر و زمان به‌نژادی را کوتاه‌تر و سریع‌تر کند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد مطالعه در این آزمایش شامل ۱۸ لاین خالص ذرت بود که از بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی تهیه و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹۵ کشت شد. مشخصات لاین‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارایه شده است. با توجه به این‌که آزمایش به صورت گلدانی اجرا شد، در ابتدا ۵۴ گلدان به قطر دهانه ۳۳/۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر و دارای زهکش انتهایی، تهیه شد. سپس هر یک از گلدان‌ها با خاک، کود دامی پوسیده، خاک برگ و پرلیت به‌نسبت ۴۵ درصد خاک،۲۰ درصد کود دامی، ۲۵ درصد پرلیت و ۱۰ درصد خاک برگ پر شد. وزن گلدان‌ها با ترازوی حساس ثبت شد تا شرایط کاملاً یکسانی برای تمامی گلدان‌ها ایجاد شود. بذر لاین‌های مورد نظر در عمق ۳/۵ سانتی‌متری سطح خاک، کشت شد. گلدان‌ها به‌طور تصادفی در داخل گلخانه تحقیقاتی با شرایط کاملاً یکسان در سه ردیف مجزا قرار گرفتند، طوری‌که فاصله بین ردیف‌ها ۵۵ سانتی‌متر و فاصله بین گلدان‌ها روی ردیف‌ها ۳۵ در نظر گرفته شد. آبیاری گلدان‌ها در طول فصل رشد با سیستم آبیاری قطره‌ای صورت گرفت و در طول دوره رشد رویشی هر ۱۵ روز یک‌بار کودهی با کود NPK انجام شد. عملیات تنک کردن گیاهچه‌ها در مرحله پنج برگی به‌منظور یکسان کردن تعداد بوته‌ها در گلدان‌ها انجام شد و تراکم بوته‌ها در هر گلدان به‌گونه‌ای به سه بوته کاهش یافت که بوته‌ها از دیواره گلدان پنج سانتی‌متر فاصله داشتند.

جدول ۱- مشخصات لاین‌های ذرت مورد مطالعه

Table 1. Characteristics of the studied maize lines

Row	Genotype	Origin	Generation
1	B73	RYD Latin America	S_7
2	80-2-1Ghch	Derived from F_2 of commercial single cross hybrids germplasm	S_5
3	85-2-1- Ghch	Derived from F_2 of commercial single cross hybrids germplasm	S_5
4	A188	RYD Swiss (Zurikh)	S_7
5	Qpm-kh	Indonesia (Makkasar)	S_5
6	102PCH	Derived from F_2 of commercial single cross hybrids germplasm	S_5
7	77GHCH	Derived from F_2 of commercial single cross hybrids germplasm	S_5
8	K1263/1	Derived from F_2 of commercial single cross hybrids germplasm	S_5
9	99-1Ghch	Derived from F_2 of commercial single cross hybrids germplasm	S_5
10	104 Ghch	Derived from F_2 of commercial single cross hybrids germplasm	S_5
11	Ethm82	Swiss (Zurikh)	S_7
12	MO17	LSC Latin America	S_7
13	105Ghch	Derived from F_2 of commercial single cross hybrids germplasm	S_5
14	Dh5x7	INRA (France)	S_7
15	95-2 Ghch	Derived from F_2 of commercial single cross hybrids germplasm	S_5
16	107Ghch	Derived from F_2 of commercial single cross hybrids germplasm	S_5
17	85-2Ghch	Derived from F_2 of commercial single cross hybrids germplasm	S_5
18	Qpm-w	Indonesia (makkasar)	S_7

ارزیابی ژنوتیپی

نمونه‌های برگی به‌منظور استخراج DNA ژنومی از برگ‌های تازه و جوان پس از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله چهار برگی تهیه و برای هر ژنوتیپ یک نمونه برگی مخلوط از سه تکرار تهیه شد. استخراج DNA ژنومی به روش CTAB (Saghai-Maroof *et al.*, 1984) انجام شد. جهت تعیین کیفیت DNA استخراج شده، از روش الکتروفورز افقی توسط ژل آگارز یک درصد استفاده و برای نمونه‌هایی که کیفیت پایینی داشتند، استخراج DNA مجدداً انجام شد. برای تعیین کمیت DNA استخراج شده نیز از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ کمپانی ترمو (Thermo Nanodrop) استفاده شد. مقدار جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دتکتور دستگاه تعیین و پس از پردازش توسط نرم‌افزار دستگاه، غلظت DNA بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر مشخص شد. قابل ذکر است که مقدار جذب نور ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر از مولکول دو رشته‌ای DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر معادل یک واحد می‌باشد. همچنین جذب نور در ۲۸۰ نانومتر نیز قرائت و نسبت جذب نور در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر ($A_{260/280}$) تعیین شد.

ارزیابی ژنتیکی لاین‌ها با استفاده از ۲۰ نشانگر ریزماهواره (SSR) که از پایگاه داده‌های ژنومی ذرت (www.maziegdb.org./SSR.phpGBS) انتخاب شدند، انجام گرفت (جدول ۲). معیار انتخاب نشانگرها، کارایی بالای نشانگرهای انتخابی در ظهور چندشکلی بود تا در تمایز ژنوتیپ‌ها به نحو موثری عمل کنند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در دستگاه ترموسایکلر Applided Biosystems Thermocycler انجام شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر حاوی ۰/۱ میکرولیتر Taq-DNA پلی‌مراز (با غلظت نهایی ۰/۴ واحد)، بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر به‌میزان ۱ میکرولیتر، $MgCl_2$ (با غلظت ۵۰ میلی‌مولار به‌میزان ۰/۴۸ میکرولیتر، dNTPs (با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) به‌میزان ۰/۲ میکرولیتر، (آغازگرهای مستقیم و معکوس) با غلظت ۰/۵ میکرومولار هر کدام به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، آب دیونیزه استریل به مقدار ۵ میکرولیتر و ۲ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت حدود ۵۰ نانوگرم بود. برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر شامل واسرشته‌سازی اولیه به‌مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴°c و به دنبال آن، ۳۵ چرخه حرارتی سه‌مرحله‌ای شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°c به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵°c به‌مدت ۴۵ ثانیه و بسط آغازگرها روی رشته DNA الگو در دمای ۷۲°c به‌مدت یک دقیقه بود و در انتها فرآورده‌های تکثیر شده تا زمان انجام الکتروفورز در دمای ۴°c نگهداری شدند. لازم به توضیح است که به‌منظور اختصاصی‌تر شدن اتصال آغازگرها به DNA الگو و جلوگیری از اتصال غیرتخصصی و حذف نوارهای شبه‌ریزماهواره، برنامه دمایی به‌صورت Touch down انجام شد، به این ترتیب که دمای مرحله اتصال آغازگرها در چرخه اول ۶۵°c در نظر گرفته شد و در هر چرخه یک درجه از این دما کاسته شد تا طی ۱۰ چرخه به دمای ۵۵°c برسد و پس از آن، ۳۰ چرخه حرارتی باقی‌مانده با همین دما انجام شد.

برای انجام الکتروفورز، ۱۰ میکرولیتر محصول تکثیر شده طی واکنش PCR با ۲ میکرولیتر محلول رنگی بارگذاری (Dye) مخلوط و روی ژل آگارز ۳ درصد (۱/۵ گرم آگارز در ۵۰ میلی‌لیتر بافر TBE 1 X)، بارگذاری شد. برای نشانگرهایی که توسط آگارز ۳ درصد چندشکلی واضحی نشان ندادند، از الکتروفورز عمودی و ژل پلی‌آکریلامید ۶ درصد استفاده شد. ژل آکریل آمید نیز با استفاده از نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد.

تجزیه‌های آماری

به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی لاین‌های ذرت مورد مطالعه بر اساس نشانگرهای ریزماهواره و ارزیابی کارایی نشانگرها، ابتدا نوارهای تولید شده در موقعیت‌های مختلف ژل‌های الکتروفورزی برای هر نشانگر در تمامی لاین‌ها، شناسایی و وجود و عدم وجود هر نوار در هر لاین به‌ترتیب با اعداد یک و صفر کمی شد. شاخص‌های مختلف تنوع شامل تعداد آلل‌های مشاهده شده و چند شکل، تعداد آلل‌های مؤثر، تنوع ژنی نئی و محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) با استفاده از نرم‌افزارهای POPGEN و Excel محاسبه شد. برای گروه‌بندی لاین‌ها نیز ابتدا ضرایب تشابه و روش‌های تجزیه خوشه‌ای مختلف بررسی و علاوه بر رسم دندروگرام، ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس تشابه و ماتریس کوفنتیک حاصل از دندروگرام هر روش با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc 2.0 محاسبه و روشی که علاوه بر ضریب همبستگی کوفنتیک بالاتر، دندروگرام آن نیز حالت پله‌ای نداشت، به‌عنوان بهترین روش انتخاب شد. برای تعیین تعداد گروه‌ها و رسم خط برش نیز از مقادیر ادغام (Fusion value) استفاده و

خط برش از ناحیه‌ای که دارای بیش‌ترین فاصله بین دو ادغام متوالی بود، رسم شد. جهت تعیین تنوع بین و درون گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای نیز تجزیه واریانس مولکولی بین گروه‌ها انجام شد.

تعداد آلل موثر، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر نشانگر (Powell *et al*., 1996) و تنوع ژنی نئی (Nei and Li, 1979) به‌ترتیب با استفاده از روابط (۱) تا (۳) توسط نرم‌افزار POPGEN نسخه ۱/۳۲ محاسبه شد:

$$Ne=\frac{1}{(\sum pi)^2} \quad (۲)$$

$$PIC_i=1-\sum_{j=1}^{n} p_{ij}^2 \quad (۱)$$

$$Nei=\sum_{k=1}^{r} \frac{H_k}{r^1} \quad (۳)$$

در این روابط، Pi فراوانی آلل iام، n تعداد آل‌ها و k تعداد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد.

نتایج و بحث

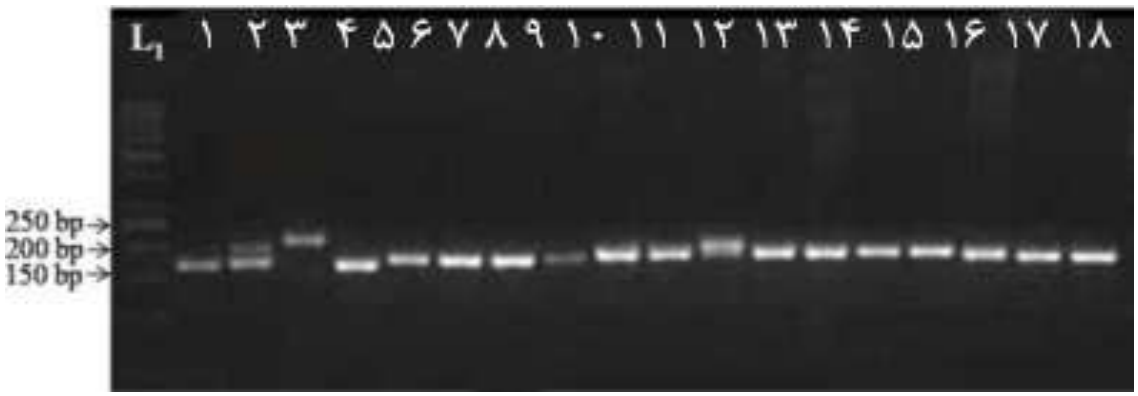
نتایج حاصل از ارزیابی شاخص‌های مختلف تنوع شامل تعداد آلل‌های مشاهده و چندشکل، تعداد آلل موثر، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، تنوع ژنی نئی در جدول ۲ ارایه شده است. در مجموع نتایج نشان داد که نشانگرهای استفاده شده در این مطالعه دارای الگوهای باندی واضح با کیفیت تفکیکی بالا و همچنین چند شکلی مناسب در لاین‌های مورد مطالعه ذرت بودند. نمونه‌ای از الگوی باندی تشکیل شده توسط نشانگر ریزماهواره Phi001 در شکل ۱ ارایه شده است.

نتایج نشان داد که در مجموع ۸۱ آلل توسط ۲۰ نشانگر SSR در ۱۸ لاین ذرت مورد مطالعه تشکیل شد که از ۶-۲ آلل با میانگین ۴/۰۵ آلل متغییر بود. نشانگرهای Phi096 و Phi038 با فقط ۲ آلل و نشانگرهای Phi076 و Phi001 با ۶ آلل به‌ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین تعداد آلل را نشان دادند. از بین کل آلل‌های مشاهده شده، ۷۶ آلل (۹۲/۶۸ درصد) چندشکل بودند. نشانگرهای Phi038، Phi076 و Phi001 با ۶ آلل، نشانگرهای Phi036 و Phi084 با ۵ آلل و نشانگرهای Phi089 و Phi096 با دو آلل کم‌ترین آلل چندشکل را در بین نشانگرهای استفاده شده در این پژوهش نشان دادند (جدول ۲). بالا بودن چندشکلی به‌دست آمده در این پژوهش (۹۲/۶۸ درصد) را می‌توان به کارآیی بالای نشانگرهای مورد استفاده نسبت داد. از آن‌جایی که نشانگرهای ریزماهواره در سرتاسر ژنوم بیش‌تر موجودات، پراکنده و بسیار متنوع هستند، بنابراین استفاده از این نشانگرها می‌تواند سطح بالایی از چند شکلی را آشکار سازد (Shafiei-Astani *et al*., 2015).

جدول ۲- شاخص‌های تنوع محاسبه شده برای نشانگرهای ریزماهواره (SSR) در لاین‌های ذرت مورد مطالعه

Table 2. Diversity indices calculated for microsatellite (SSR) markers in the studied maize lines

Marker	Motif	Chromosome number	Number of observed alleles	Number of polymorph alleles	Number of effective alleles	Polymorphic information content	Nei's genetic diversity	Band size (bp)
Phi001	AG	1	5	5	2.66	0.59	0.49	69-150
Phi015	AAAC	1	3	3	1.28	0.38	0.24	125-140
Phi024	CCT	2	3	3	1.25	0.28	0.19	66-121
Phi026	CT	2	4	4	2.53	0.89	0.79	80-130
Phi032	AAAG	3	4	4	1.82	0.78	0.68	162-168
Phi034	CCT	4	4	4	2.32	0.75	0.69	105-118
Phi036	AG	4	5	5	2.55	0.48	0.39	113-137
Phi038	GAAA	4	6	6	2.57	0.91	0.83	76-100
Phi041	AGCC	5	3	3	1.31	0.85	0.69	65-80
Phi062	AGG	5	4	4	1.79	0.80	0.77	150-178
Phi063	TATC	6	3	3	1.33	0.75	0.69	145-188
Phi076	AGCGG	6	6	6	3.92	0.93	0.85	143-185
Phi084	AGCT	7	6	5	3.37	0.80	0.76	111-135
Phi087	ACC	7	5	4	2.53	0.46	0.35	116-148
Phi089	CCG	7	3	2	1.24	0.82	0.72	110-150
Phi091	TCG	8	3	3	1.36	0.82	0.78	96-110
Phi092	ATCC	8	5	4	2.88	0.86	0.76	98-112
Phi095	AAAG	9	3	3	1.46	0.81	0.73	148-187
Phi096	CACTT	10	2	2	1.36	0.75	0.68	153-180
Phi098	AGATG	10	4	3	1.54	0.53	0.42	160-186
Mean	-	-	4.05	3.8	2.05	0.71	0.625	-



شکل۱- الگوی باندی نشانگر ریزماهواره Phi001 در تعدادی از لاین‌های ذرت مورد مطالعه. ستون L_1 نشانگر اندازه را نشان می‌دهد.
Figure 1. Banding pattern of the microsatellite marker, Phi001, in a number of the studied maize lines. L1 column shows size marker.

بررسی تعداد آلل‌های مؤثر در نشانگرهای بررسی شده نشان داد که تعداد آلل موثر از ۱/۲۴ (در نشانگر Phi089) تا ۳/۹۲ (در نشانگر Phi076) آلل متغیر بود و میانگین آن در تمامی نشانگرها ۲/۰۵ آلل محاسبه شد (جدول ۲). از آن‌جایی که یکی از معیارهای مهم در انتخاب نشانگرهای مناسب و سودمند، تعداد آلل مؤثر است (Zhu *et al.*, 1998)، بنابراین می‌توان از نشانگرهای با تعداد آلل مؤثر بیش‌تر مانند Phi076 و Phi084 (هر دو با بیش از سه آلل موثر) برای بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های ذرت در مطالعات مختلف و برنامه‌های به‌نژادی آینده استفاده کرد (Rossini Pinto *et al.*, 2003; Hinze *et al.*, 2005; Romay *et al.*, 2012).

میزان اطلاعات چندشکلی یکی از معیارهای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها می‌باشد. در واقع PIC قدرت تفکیک یک نشانگر را بر اساس تعداد آلل‌ها و فراوانی نسبی آن‌ها در جمعیت نشان می‌دهد (Liu *et al.*, 2009). بررسی شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نشان داد که نشانگرهای استفاده شده در این پژوهش دارای PIC متغیر از ۰/۲۸ (نشانگر Phi024) تا ۰/۹۱ (نشانگر Phi038) با میانگین ۰/۷۱ بودند (جدول ۲). در مجموع مقدار PIC برای بیش‌تر نشانگرها مقدار بالایی بود که انتخاب درست نشانگرها و کارایی بالای آنها را در این پژوهش نشان می‌دهد. پژوهشگران دیگر نیز از شاخص PIC استفاده و آن را جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ذرت مفید گزارش کرده‌اند (Amaral Júnior *et al.*, 2011; Akinwale *et al.*, 2014).

شاخص تنوع ژنی Nei نیز به‌عنوان یکی دیگر از شاخص‌های ارزیابی تنوع ژنی در این مطالعه بررسی شد (جدول ۲). نتایج نشان داد که متوسط شاخص تنوع ژنی نئی در جمعیت مورد مطالعه ۶۲/۵ درصد بود و نشانگرهای Phi076 و Phi024 به‌ترتیب با مقدار ۰/۸۵ و ۰/۱۹ بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار شاخص تنوع ژنی نئی را در بین نشانگرهای استفاده شده در این پژوهش نشان دادند. بالا بودن مقادیر اندازه‌گیری شده در این پژوهش (جدول ۲) نشان‌دهنده قدرت بالای نشانگرهای استفاده شده در تشخیص تنوع موجود بین لاین‌ها و تفکیک دقیق آن‌ها می‌باشد. با مقایسه بین میزان اطلاعات چندشکل و تنوع ژنی نئی مشخص شد که نشانگرهای دارای PIC بالاتر دارای تنوع ژنی بیش‌تری نیز می‌باشند که این نتایج حاکی از ارتباط قوی و محکم بین این دو شاخص می‌باشد که می‌توان با کمک آن‌ها، جایگاه‌های با کارآیی بالا را برای مطالعات بعدی انتخاب کرد. در مجموع با توجه به شاخص‌های اندازه‌گیری شده می‌توان نشانگرهای Phi026، Phi034، Phi038 ، Phi076، Phi084 و Phi092 را به‌عنوان نشانگرهای مفید و آگاهی‌بخش جهت استفاده در مطالعات بعدی شناسایی و معرفی کرد. سماگن و همکاران (Semagn *et al.*, 2014) نیز به مطالعه تنوع ژنتیکی ۴۱ اینبرد لاین ذرت با استفاده از ۲۵ نشانگر ریزماهواره پرداختند. در آزمایش آنها در مجموع ۱۸۴ آلل توسط ۲۵ نشانگر تولید شد و تعداد آلل‌ها برای نشانگرهای مختلف بین ۱۹-۲ آلل متغیر بود. همچنین این محققین گزارش کردند که نشانگرهای با توالی‌های تکراری دو و سه نوکلئوتیدی، تعداد آلل‌های بیش‌تری را تولید کردند و نشانگرهای با توالی‌های تکراری چهارتایی، محتوای اطلاعات چندشکلی خوبی نداشتند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت نداشت.

تجزیه خوشه‌ای

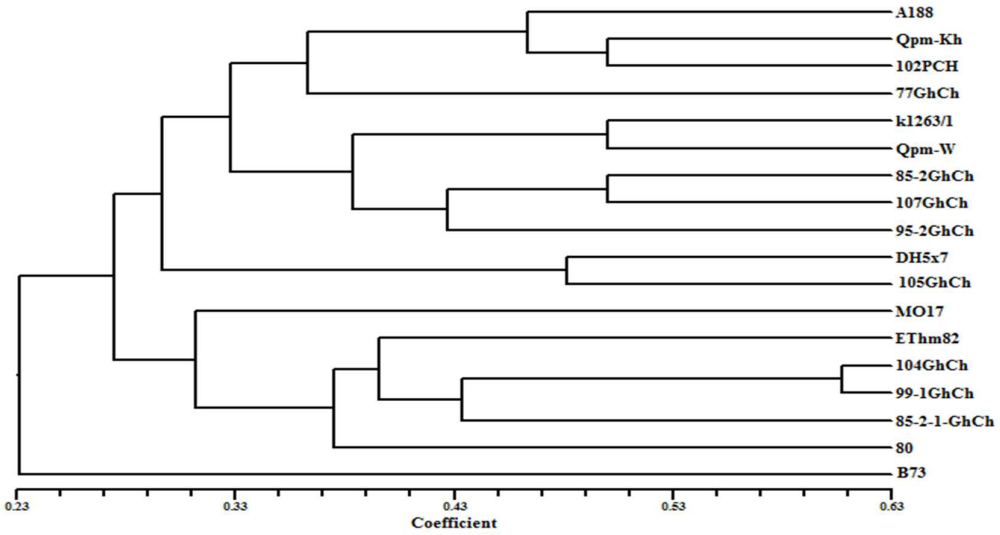
به‌منظور گروه‌بندی لاین‌های اینبرد ذرت با استفاده از اطلاعات حاصل از نشانگرهای ریزماهواره، ابتدا میزان تشابه بین لاین‌ها بر اساس ضرایب تشابه مختلف محاسبه و سپس روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای انجام شد و در انتها علاوه بر رسم دندروگرام هر روش، ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس تشابه و ماتریس کوفنتیک حاصل از دندروگرام برآورد شد (جدول ۳). از آنجایی که بالاترین ضریب همبستگی بین روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد (۰/۷۵) محاسبه شد و علاوه بر این، حالت پله‌ای شدن (Chaining) در دندروگرام این روش مشاهده نشد (شکل ۲)، از این‌رو این روش کارآیی نسبی بیش‌تری نسبت به روش‌های دیگر داشت.

بر این اساس، ۱۸ لاین اینبرد ذرت مورد مطالعه در سه گروه قرار گرفت (شکل ۲). لاین B73 به‌تنهایی در گروه اول قرار گرفت که به لحاظ ویژگی‌های منحصر به‌فرد خود سازگاری وسیعی دارد و در سطح دنیا شناخته شده است. لاین B73 یک لاین اینبرد تجاری می‌باشد که متعلق به گروه هتروتیک ریدیلودنت است. از این‌رو این لاین می‌تواند به‌عنوان کاندید مناسبی (به‌دلیل فاصله ژنتیکی زیاد با سایر لاین‌ها) برای تلاقی با لاین‌های این مرکز جهت ایجاد هیبریدهای موفق باشد. در گروه دوم، شش ژنوتیپ شامل چهار لاین نسل S_5 که در نسل‌های پیشرفته خودبارور هستند، به‌همراه لاین‌های دابل هاپلویید ETH-M82 و MO17 قرار گرفت. یازده ژنوتیپ باقیمانده نیز که شامل شش لاین S_5، دو لاین QPM، دو لاین دابل‌هاپلویید DH5X7 و A188 و نهایتاً لاین تجاری زودرس K1263/1 بودند، در گروه سوم قرار گرفتند. همچنین بر اساس نتایج این آزمایش، دو لاین تجاری MO17 و B73 که به‌ترتیب والدین پدری و مادری هیبرید سینگل‌کراس تجاری ۷۰۴ هستند، در خوشه‌های متفاوت قرار گرفتند که این نتیجه خود می‌تواند به‌نوعی دلیلی بر صحت گروه‌بندی حاصل باشد. در کل با توجه به نتایج این آزمایش انتظار می‌رود با تلاقی بین لاین‌های متعلق به خوشه‌های مختلف بتوان هتروزیس بیش‌تری ایجاد و هیبریدهای با عملکرد بالاتری تولید کرد.

جدول ۳- ضریب همبستگی کوفنتیک بین روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای و ضرایب تشابه مختلف

Table 3. Cophenetic correlation coefficient between different cluster analysis methods and different similarity coefficients

Cluster analysis method	Similarity coefficient		
	Simple matching	Jacquard	Dice
UPGMA	0.53	0.75	0.57
Complete linkage	0.41	0.69	0.63



شکل **Error! No text of specified style in document.**۲- گروه‌بندی لاین‌های ذرت مورد مطالعه با روش UPGMA بر اساس اطلاعات نشانگرهای ریزماهواره

Figure 2. Cluster analysis of the studied maize lines using UPGMA method based on microsatellite markers

پینه‌دا هیدالگو و همکاران (Pineda-Hidalgo *et al.*, 2013) با مطالعه ۲۸ توده بومی ذرت از مناطق مختلف مکزیک با استفاده از ۲۰ نشانگر ریزماهواره، در مجموع ۱۲۱ آلل با متوسط ۶/۱ برای هر جایگاه به‌دست آوردند. آنها با تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، ۲۸ توده مورد بررسی را در سه گروه مجزا قرار دادند. غفاری آذر و همکاران (Ghafari Azar *et al.*, 2019) در پژوهشی به ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ۱۰۰ لاین اینبرد ذرت با استفاده از نشانگر ISSR پرداختند. آن‌ها نیز با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش پیوستگی کامل (Complete Linkage)، لاین‌های مورد بررسی را در سه گروه اصلی قرار دادند. گروه‌بندی افراد در خوشه‌های مختلف می‌تواند ضمن جلوگیری از تولید هیبریدهای بیهوده، گروه‌های هتروتیک احتمالی (با فاصله ژنتیکی مناسب) را شناسایی و احتمال موفقیت در تلاقی‌ها را افزایش دهد (Hallauer and Miranda, 1988).

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)

به‌منظور شناخت بهتر جمعیت مورد مطالعه، میزان تنوع بین و درون گروه‌ها و نسبت هر یک از آنها از تنوع کل موجود بین لاین‌های ذرت مورد مطالعه بر اساس روش تجزیه واریانس مولکولی و با استفاده از نتایج گروه-بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای انجام و نتایج آن در جدول ۴ ارایه شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، فقط ۱۱ درصد از تنوع کل جمعیت در بین گروه‌ها وجود داشت و ۸۹ درصد باقیمانده متعلق به تنوع درون گروه‌ها بود. به این ترتیب می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اگرچه تجزیه خوشه‌ای بر اساس تفاوت بین لاین‌ها آنها را در گروه‌های متفاوت دسته‌بندی کرد، اما تنوع درون گروهی بالا می-تواند حاکی از جریان ژنی بالا در بین آنها و نیز وجود روش گزینشی متفاوت در هر لاین (متعلق به مکان‌های متفاوت) باشد. از طرفی، تنوع بین گروهی کم‌تر نسبت به تنوع درون گروه‌ها نشان‌دهنده عدم وجود ساختار ژنتیکی روشن در بین گروه‌های مختلف است (Pinera *et al.*, 2007). در آزمایش‌های قبلی نیز تنوع درون گروهی بالا در ذرت گزارش شده است (Mahato *et al*, 2018; Laosatit *et al*, 2023)، که نتایج پژوهش حاضر نیز تا حدود زیادی با آنها مطابقت داشت.

جدول ۴ - تجزیه واریانس مولکولی لاین‌های ذرت بر اساس گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشانگرهای ریزماهواره (SSR)

Table 4. Molecular analysis of variance of maize lines based on grouping of cluster analysis of the SSR markers

Source of variation	df	Sum of square	Mean square	Variance percentage
Between population	2	65.23	32.61	11
Within population	15	563.21	37.54	89
Total	17	628.44	-	100

تجزیه به مختصات اصلی

برای انجام تجزیه به مختصات اصلی از ماتریس شباهت به روش ضریب تطابق ساده استفاده شد. نتایج حاصل از این تجزیه برای پنج بردار اول در جدول ۵ ارایه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، پنج بردار اول در مجموع ۴۱/۷ درصد از واریانس کل را توجیه کردند که سهم دو بردار اول (PCO1) و دوم (PCO2) از تنوع کل جمعیت به‌ترتیب ۱۱/۵ و ۹/۵ درصد بود (جدول ۵). تجزیه به مختصات اصلی در تفسیر تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها بر اساس صفات کیفی کاربرد زیادی دارد، به‌طوری که با به‌کارگیری آن می‌توان الگوهای تنوع و میزان ارتباط بین افراد جمعیت را به صورت چندبعدی نمایش داد و بنابراین تفسیر بهتر نتایج را فراهم کرد. علت این امر، ساده بودن استفاده از این روش است که می‌تواند اطلاعات مهم و مورد نیاز را از بین انبوهی از داده‌های پیچیده استخراج کند. در واقع توسط این روش گروه‌های مرکب به تعداد کم‌تر و محدودتری کاهش می‌یابند و ساختارهای اصلی اثرگذار که از اهمیت بیش‌تری برخوردار هستند به نمایش گذاشته می‌شوند. در تجزیه به مختصات اصلی، چناچه تغییرات کم‌تری توسط مؤلفه‌های اصلی مهم‌تر توجیه شود، به معنی توزیع مناسب‌تر نشانگرها در سطح ژنوم است. هرچند این نتایج ممکن است از نقطه

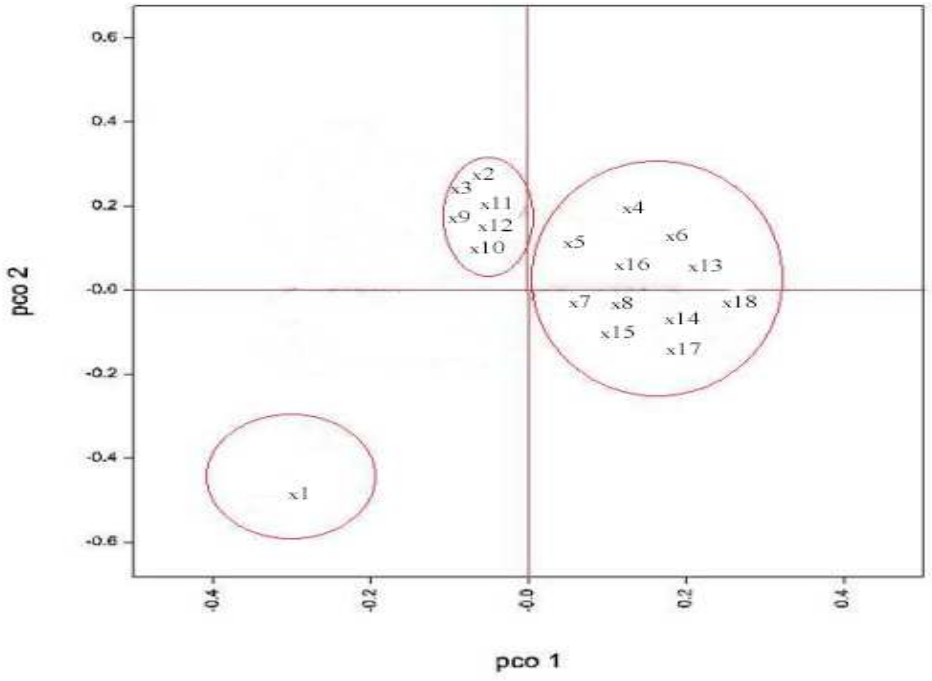
نظر آماری برای تجزیه به مختصات و نمایش گرافیکی آن مناسب نباشد، اما از نظر ژنتیکی نشان دهنده نمونه‌برداری مطلوب از کل ژنوم توسط نشانگرهای مورد استفاده می‌باشد. به این ترتیب که هر یک از نشانگرهای مورد استفاده از بخش‌های متفاوت ژنوم بوده و بنابراین دارای پیوستگی و لینکاژ کم‌تری هستند (Abdollahi Mandoulakani and Azizi, 2018).

الگوی پراکنش لاین‌های ذرت مورد مطالعه بر اساس دو بردار اول در شکل ۳ ارایه شده است. مطابق با این نمودار، لاین‌هایی که در یک نقطه متمرکز شده‌اند، در یک گروه قرار می‌گیرند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، پراکنش لاین‌ها بر اساس دو بردار اول تجزیه به مختصات اصلی با گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای مطابقت دارد و لاین‌ها در سه گروه دسته‌بندی شدند. به‌عنوان نمونه لاین B73 که در تجزیه خوشه‌ای به تنهایی در یک گروه قرار گرفته بود، در نمودار الگوی پراکنش مختصات اصلی نیز به تنهایی در گروه جداگانه‌ای قرار گرفت و یا لاین‌های ۲، ۳، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ که در تجزیه خوشه‌ای در گروه دوم قرارگرفتند، در نمودار تجزیه به مختصات اصلی نیز در کنار هم قرار گرفتند.

جدول ۵- مقدار ویژه، واریانس نسبی و واریانس تجمعی ۵ مؤلفه اول حاصل از تجزیه به مختصات اصلی بر اساس نشانگرهای ریزماهواره

Table 5. Eigen value, relative variance and cumulative variance of the first five components of principal coordinate analysis based on microsatellite markers

Component	Eigen value	Relative variance (%)	Cumulative variance (%)
1	8.11	11.5	11.5
2	6.16	9.5	21.0
3	4.91	7.5	28.5
4	4.45	6.9	35.4
5	4.11	6.3	41.7



شکل۳- پراکنش لاین‌های ذرت مورد مطالعه بر اساس اولین و دومین مولفه حاصل از تجزیه به مختصات اصلی

Figure 4. Scatter plot of the studied maize lines based on 1st and 2nd components of principal coordinate analysis

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل توجهی در بین لاین‌های ذرت مورد مطالعه وجود داشت که از این تنوع می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی، لاین‌های مورد مطالعه را در سه گروه متمایز دسته‌بندی کردند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه نیز نشان داد که در حدود ۱۱ درصد از تنوع کل لاین‌ها در بین سه گروه فوق وجود داشت و ۸۹ درصد از تنوع متعلق به داخل گروه‌ها بود. ارزیابی شاخص‌های مختلف تنوع برای نشانگرهای مطالعه شده در این تحقیق نشان داد که نشانگرهای Phi034، Phi038، Phi076، Phi084 و Phi092 نشانگرهای بهتری برای تعیین تنوع بودند و می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای آگاهی‌بخش جهت تعیین تنوع و شناسایی گروه‌های هتروتیک در برنامه‌های به‌نژادی ذرت مورد استفاده قرار گیرند.

تضاد منافع

نویسنده (گان) تایید می‌کنند که این تحقیق در غیاب هر گونه روابط تجاری یا مالی که می‌تواند به‌عنوان تضاد منافع بالقوه تعبیر شود، انجام شده است.

رعایت اخلاق در نشر

نویسنده (گان) اعلام می‌کنند که در نگارش این مقاله به‌طور کامل از اخلاق نشر از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پیروی کرده‌اند. همچنین این مقاله حاصل یک کار تحقیقاتی اصیل بوده و تا کنون به‌طور کامل به هیچ زبانی و در هیچ نشریه یا همایشی چاپ و منتشر نشده و هیچ اقدامی نیز برای انتشار آن در هیچ نشریه یا همایشی صورت نگرفته و نخواهد گرفت.

اجازه انتشار مقاله

نویسنده (گان) با چاپ این مقاله به صورت دسترسی باز موافقت کرده و کلیه حقوق استفاده از محتوا، جدول‌ها، شکل‌ها، تصویرها و غیره را به ناشر واگذار می‌کنند.

References

Abdollahi Mandoulakani, B. and Azizi, H. 2018. Identification of ISSR markers associated with morphological traits in cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 27(2), pp. 260-268. [In Persian]. https://dorl.net/dor/20.1001.1.23832738.1393.27.2.10.0.

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, pp. 48-62. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.10.015.

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), pp. 15462-15469. https://doi.org/10.5897/AJB10.2624.

Bernardo, R. 2001. Breeding potential of intra- and inter- heterotic group crosses in maize. *Crop Science*, 41(1), pp. 68-71. https://doi.org/10.2135/cropsci2001.41168x.

Dehghan Naieri, F., Abd-Mishani, S., Shakib, A.M., Seyede Tabatabaii S.B.E. and Bankesaz, A. Lu. 2005. Utilization of microsatellite markers for determining genetic relationships in maize inbred lines. *Iranian Journal of Agriculture Science*, 36(1), pp. 43-49. [In Persian].

FAO. 2015. World Food and Agriculture. Statistical Yearbook 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Ghafari Azar, A., Darvishzadeh, R., Aghaali, Z., Kahrizi, D. and Darvishi, B. 2019. Assessment of genetic diversity and grouping of maize lines (*Zea mays* L.) using ISSR markers. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 32(2), pp. 230-241. [In Persian]. https://dorl.net/dor/20.1001.1.23832738.1398.32.2.5.0.

Hallauer, A.R. and Miranda, J.B. 1998. Quantitive Genetics in Maize Breeding. (2th Ed.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0766-0.

Hinze, L.L., Kresovich, S., Nason, J.D. and Lamkey, K.R. 2005. Population genetic diversity in a maize reciprocal recurrent selection program. *Crop Science*, 45(6), pp. 2435-2442. https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0662.

Hoxha, S., Shariflou, M.R. and Sharp, P. 2004. Evaluation of genetic diversity in Albanian maize using SSR markers. *Maydica*, 49(2), pp. 97-103.

Idris, A.E., Hamza, N.B., Yagoub, S.O., Ibrahim, A.I. and El-Amin, H.K. 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), pp. 42-47.

Laosatit, K., Amkul, K., Somta, P., Kerdsri, C., Mongkol, W., Jitlaka, C., Suriharn, K. and Jompuk, C. 2023. Genetic diversity of sweet corn inbred lines of public sectors in Thailand revealed by SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 22(4), e431322410, pp. 1-8. https://doi.org/10.1590/1984-70332022v22n4a45.

Liu, Z.Z., Gou, R.H., Zhao, J.R., Cai, Y.L., Wang, F.G., Cao, M.J., Wang, R., Shi, Y., Song, Y., Wang, T. and Yu, L.I. 2009. Genetic diversity of tow important groups of maize landraces with the same name in China revealed by M13 tailed-primers SSRs. *Agricultural Sciences in China*, 8, pp. 15-23. https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60004-3.

Lu, H., and Bernardo, R. 2001. Molecular marker diversity among current and Historical maize inbreds. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, pp. 613-617. https://doi.org/10.1007/PL00002917.

Mahato, A., Shahi, J.P., Singh, P.K. and Kumar, M. 2018. Genetic diversity of sweet corn inbreds using agro-morphological traits and microsatellite markers. *3 Biotech*, 8 (332), pp. 1-9. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1353-5.

Mir-Mohammadi Maibody, S.A.M. and Golkar, P. 2019. Application of DNA molecular markers in plant breeding. *Plant Genetic Researches*, 6, pp. 1-30. [In Persian]. https://doi.org/10.29252/pgr.6.1.1.

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), pp. 1-9. https://doi.org/10.4238/gmr16019438.

Murray, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), pp. 4321- 4326. https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321.

Nei, M. and Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76(10), pp. 5269-5273. https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269.

Pineda-Hidalgo, K.V., Méndez-Marroquín, K.P., Alvarez, E.V., Chávez-Ontiveros, J., Sánchez-Peña, P., Garzón-Tiznado, J.A. and López-Valenzuela, J.A. 2013. Microsatellite-based genetic diversity among accessions of maize landraces from Sinaloa in México. *Hereditas*, 150(4-6), pp. 53-59. https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2013.00019.x.

Piñera, 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), pp. 2153-2158. https://doi.org/10.1007/s00227-007-0665-5.

Rezaie, Z., Moshtaghi, N., Khavari Khorasani, S. and Shahriari Ahmadi, F. 2018. Determination of heterotic groups in the super sweet corn inberd lines by microsatellite markers. Proceedings of the 15th National Iranian Crop Science Congress. Sep. 4-6, 2018, Karaj, Iran. [In Persian].

Romay, M.C., Butrón, A., Ordás, A., Revilla, P. and Ordás, B. 2012. Effect of recurrent selection on the genetic structure of two broad-based Spanish maize populations. *Crop Science*, 52(4), pp. 1493-1502. https://doi.org/10.2135/cropsci2011.10.0552.

Rossini Pinto, L., Carneiro Vieira, M.L., Lopes de Souza, C. and Pereira de Souza, A. 2003. Genetic diversity assessed by microsatellites in tropical maize populations submitted to a high-intensity reciprocal recurrent selection. *Euphytica*, 134, pp. 277-286. https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000004946.15260.4a.

Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81(24), pp. 8014-8018. https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014.

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, pp. 938- 946. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.040.

Semagn, K., Bjørnstad, A. and Xu, Y. 2010. The genetic dissection of quantitative traits in crops. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(5), pp. 1-45. https://doi.org/10.2225/vol13-issue5- fulltext-21.

Semagn, K., Magorokosho, C., Ogugo, V., Makumbi, D. and Warburton, M.L. 2014. Genetic relationships and structure among open-pollinated maize varieties adapted to eastern and southern Africa using microsatellite markers. *Molecular Breeding*, 34, pp. 1423-1435. https://doi.org/10.1007/s11032-014-0126-z.

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, pp. 107-116. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.053.

Wang, R., Yu, Y., Zhao, J., Shi, Y., Song, Y., Wang, T. and Li, Y. 2008. Population structure and linkage disequilibrium of a mini core set of maize inbred lines in China. *Theoretical and Applied Genetics*, 117, pp. 1141-1153. https://doi.org/10.1007/s00122-008-0852-x.

Zhu, J., Gale, M.D., Quarrie, S., Jackson, M.T. and Bryan, G.J. 1998. AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, pp. 602-611. https://doi.org/10.1007/s001220050778.