

تعیین روابط ژنتیکی در اینبردلاین های ذرت با استفاده از نشانگر ریزوماهواره

فاطمه دهقان نیری^۱، سیروس عبدمیثانی^۲، علی محمد شکیب^۳، سید بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی^۴
و احمد بانکه ساز^۵

۱، ۲، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

۳، عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ۴، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

۵، عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۲/۹

خلاصه

ریزوماهواره‌ها یا توالی‌های تکراری ساده از نشانگرهای مولکولی دی‌ان‌ا بوده و دارای واحدهای تکراری ۶-۲ جفت بازی می‌باشند. حفظ تنوع ژنتیکی به منظور اصلاح گیاهان زراعی و ارتقاء سطح مدیریت منابع ژنتیکی از اهمیت زیادی در برنامه‌های اصلاحی ذرت برخوردار است. در این مطالعه شباهت ژنتیکی ۴۶ اینبردلاین مورد استفاده در برنامه‌های اصلاحی ذرت با استفاده از نشانگرهای ریزوماهواره مورد بررسی قرار گرفت. استخراج دی‌ان‌ا از برگ‌های جوان ذرت با روش دلاپورتا و همکاران انجام شد و سپس تکثیر با ده جفت آغازگر ریزوماهواره صورت گرفت. محصولات تکثیر شده با استفاده از ژل پلی‌آکرلامید ۶٪ دارای اوره ۷ مولار و تحت شرایط واسرشتگی تفکیک شده و با رنگ آمیزی نترات نقره قابل رویت گردید. الگوی بانندی براساس حضور باند (یک) یا عدم حضور باند (صفر) نمره‌دهی شده و محتوای اطلاعات چندشکلی برای هر جفت نشانگر محاسبه گردید و میانگین چندشکلی ۰/۷۳ برآورد شد. تعداد آلل‌ها در جایگاه از ۱۴-۳ متغیر بوده و در مجموع ۶۹ آلل شناسایی شد. با استفاده از نرم‌افزار NTSYS فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها براساس ضریب تشابه جاکارد محاسبه و روش تجزیه خوشه‌ای دورترین همسایه برای گروه‌بندی استفاده شد. بر اساس دندروگرام حاصله، ۴۶ لاین مورد مطالعه در سه گروه قرار گرفتند. وجود دو اینبردلاین تجاری B73 و MO17 از دو گروه هتروتیکی مخالف و همچنین تیپ آندوسپرمی اینبردلاین‌ها به تفسیر دندروگرام بدست آمده کمک نمود. نتایج حاصل نشان داد که نشانگرهای ریزوماهواره قادرند چندشکلی بالایی را بین لاین‌ها نشان دهند و از اینرو ابزار مفیدی برای انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌ها و دسته‌بندی آنها در گروه‌های مختلف بشمار می‌روند. از این ویژگی می‌توان در تعیین گروه‌های هتروتیک و پیش‌بینی هتروزیس در تولید هیبرید ذرت استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: ریزوماهواره، ذرت، تنوع ژنتیکی

مقدمه

ذرت از گیاهان زراعی مهم است که سطح وسیعی از اراضی زراعی قابل کشت را به خود اختصاص داده است. سطح زیرکشت، میزان تولید و عملکرد در واحد سطح ذرت در جهان پس از گندم و برنج مقام سوم را دارا می‌باشد. افزایش تولید با استفاده بهینه از منابع ژنتیکی و تنوع موجود در آنها میسر می‌گردد. در این راستا و به منظور رسیدن به این هدف

روش‌های کلاسیک به تنهایی کافی نبوده و به نشانگرهای مولکولی به عنوان مکمل نیاز دارند. کاربرد نشانگرها موجب تسریع پروژه‌های اصلاحی شده و در افزایش تولید محصولات زراعی و دامی سهم اساسی خواهد داشت (۱۷).

نشانگرهای ریزوماهواره از جمله نشانگرهای دی‌ان‌ا هستند که اختلاف ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها را در سطح مولکول دی‌ان‌ا نشان می‌دهند و بدلیل چندشکلی بالا، ابزار مناسبی برای

مطالعه تنوع ژنتیکی در ذرت به چند دلیل دارای اهمیت می باشد: ۱- مطالعه تنوع ژنتیکی جهت حفظ و گسترش تنوع در منابع ژرم پلاسما. ۲- با توجه به سطح زیر کشت وسیعی که ذرت به خود اختصاص داده است، ارزیابی لاین ها و شناسایی ترکیب های برتر بسیار با اهمیت می باشد. ۳- تهیه و استخراج لاین از منابع ژنتیکی موجود یکی از مهم ترین و اساسی ترین پایه های تحقیقاتی مؤسسات تولید کننده بذر بوده و به تعیین تنوع ژنتیکی نیاز دارد. ۴- بررسی تنوع نه تنها برای بهبود ژنتیکی ذرت بلکه جهت کاهش حساسیت به تنش های زنده و غیرزنده محیطی اهمیت دارد. ریزماهورها از جمله نشانگرهای ژنتیکی هستند که به علت ویژگی های منحصر بفرد مورد استقبال فراوان محققین قرار گرفته اند (۳، ۶). در این مطالعه تنوع ژنتیکی در اینبردلاین های ذرت مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد گیاهی این بررسی شامل ۴۴ اینبرد لاین ذرت از دو تیپ آندوسپرمی دندان آسیبی و سخت به همراه دو اینبرد تجارتهای MO17 و B73 (که به عنوان پایه پدری و مادری در تهیه بذر هیبرید به کار می روند) بود. بذور از بخش ذرت و گیاهان علوفه ای مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه گردید. نمونه های بذر درگلدان هایی به قطر ۲۰cm در گلخانه مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کاشته شد. نمونه گیری از برگ های جوان ذرت در مرحله ۵-۴ برگی انجام شد و بلافاصله به فریزر ۸۰- انتقال یافت و در طی چند روز استخراج دی ان ا با روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) صورت گرفت. با بررسی مطالعات انجام شده در ارتباط با تعیین تنوع ژنتیکی در ذرت و همچنین با جستجو در بانک اطلاعاتی www.agron.missouri.edu تعداد ۱۰ جفت آغازگر ریزماهوره ای از ده کروموزوم ذرت انتخاب شد. آغازگرهای دو نوکلئوتیدی به دلیل چندشکلی بالا و آغازگرهای چهار نوکلئوتیدی جهت مشاهده مقدار تنوع آلی در مقایسه با دو نوکلئوتیدیها انتخاب گردیدند. تکثیر با ده جفت آغازگر ریزماهوره و با استفاده از برنامه touchdown صورت گرفت. این برنامه جهت اختصاصی کردن محصولات پی سی آر بوده و دارای دو چرخه دمایی مختلف می باشد. چرخه اول شامل یک دقیقه دمای ۹۵ °C، یک دقیقه ۶۵ °C و دو دقیقه ۷۲ °C بود

ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان مختلف از جمله ذرت می باشند (۴). ریزماهورها، توالی های تکراری کوتاه ۶-۲ جفت بازی هستند که بخش هایی به طول ۱۰۰-۲۰ جفت باز را تشکیل می دهند (۲، ۹). توالی های احاطه کننده جایگاه های ریزماهوره ای، در داخل یک گونه یا در گونه های داخل یک جنس و ندرتاً در جنس های خویشاوند حفاظت شده می باشند و از آنها می توان برای طراحی آغازگر به منظور تکثیر جایگاه های ریزماهوره ای استفاده نمود (۵، ۶).

فراوانی ریزماهوره ها در ژنوم، سطح بالای تنوع آلی در جایگاه های ریزماهوره ای و سهولت بکارگیری این نشانگرها، آنها را از نشانگرهای ژنتیکی مشهور ساخته است. ویژگی دیگر ریزماهوره ها، هم بارز بودن آنها و امکان تشخیص افراد هتروزیگوت از هموزیگوت می باشد (۱۳، ۱۴). سنیور و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که نشانگرهای ریزماهوره سطح بالایی از چندشکلی را در ذرت نشان می دهند و از آنها می توان برای بررسی تنوع ژنتیکی در این گیاه استفاده نمود. ماتسوکا و همکاران (۲۰۰۲) از نشانگر ریزماهوره برای مطالعه روابط تکاملی در ذرت استفاده کردند. با تعیین توالی آلل های بدست آمده مشخص گردید که الگوی پیچیده ای از موتاسیون در مناطق مجاور تکرارهای ریزماهوره وجود دارد. تنوع ژنتیکی در اینبردها کمتر از ۰/۱ بوده و این طبیعت خودباروری آنها را نشان می دهد. همچنین مشخص گردید که در ذرت در مقایسه با خویشاوندان وحشی نزدیک آن تنوع ژنتیکی کم شده که در اثر اهلی شدن ذرت می باشد. لو و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از نشانگر ریزماهوره، تنوع ژنتیکی در اینبردلاین های ذرت را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که تنوع ژنتیکی در اینبردلاین های ذرت کاهش یافته و اصلاح شجره ای سبب تولید اینبردلاین های برگزیده ای گردیده است که پایه ژنتیکی در آنها بسیار باریک شده است. چین و همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند که در بین ترتیب های دو و سه نوکلئوتیدی ریزماهوره ها، ترتیب های سه نوکلئوتیدی دارای بیشترین فراوانی در ژنوم ذرت می باشند. همچنین در مطالعه دیگری که بوسیله کانتی و همکاران (۱۹۹۵) روی ذرت انجام شد بیشترین چندشکلی به ترتیب در تکرارهای دو و سه نوکلئوتیدی بدست آمد.

جفت آغازگر ریزماهوره تکثیر شد. تعداد آلل‌ها بین ۱۴-۳ متغیر بوده و بیشترین تعداد آلل مربوط به آغازگرهای Phi026 و Phi001 به ترتیب با ۱۴ و ۱۳ آلل بود (جدول ۱).

PIC^۱ معادل تنوع ژنتیکی بوده و قدرت تفکیک یک نشانگر را به واسطه تعداد آلل‌های مکان ژنی نشانگر و فراوانی نسبی این آلل‌ها در جمعیت تحت مطالعه نشان می‌دهد (۱)، (۱۵). این پارامتر تنوع آللی در هر مکان ژنی را اندازه‌گیری کرده و معادل: $1 - \sum f_i^2$ می‌باشد. در این فرمول f_i فراوانی آلل i ام در یک مکان ژنی است. در این مطالعه PIC برای جایگاه‌های ریزماهوره‌ای بین ۰/۹۱-۰/۵۴ متغیر بوده و میانگینی برابر ۰/۷۳ داشت. در میان سه نوع ردیف تکرار بکار رفته، بالاترین میانگین PIC مربوط به تکرارهای دو نوکلئوتیدی با مقدار ۰/۸۷ بود

(جدول ۱ و شکل ۳).

۱۳ اینبردلاین برای جایگاه دارای تکرارهای CT هتروزیگوستی نشان دادند که احتمالاً بدلیل تکثیر توالی‌های مشابه در دو ناحیه ژنومی جداگانه و یا آلودگی پی‌سی‌آر است. تمام اینبردلاین‌ها الگوی بانندی هموزیگوس برای نشانگرهای Phi036, Phi034, Phi063 نشان دادند. در ۴۶ اینبردلاین ۶۹/۵٪ از مجموع ۶۹ آلل فراوانی ۰/۰۲ و یا کمتر داشتند که نشان‌دهنده تنوع آللی بالا در این مجموعه از آغازگرها می‌باشد. تنها ۸/۶٪ آلل‌ها فراوانی بالاتر از ۰/۱ داشتند و حدود ۲۰٪ آلل‌ها فراوانی کمتر از ۰/۰۱ نشان دادند.

و در چرخه دوم به ازای هر دو چرخه دمایی، دما یک درجه سانتیگراد کاهش یافت و به ۵۵ °C رسید. پس از تکثیر دی‌ان‌ا هدف، از دستگاه الکتروفورز عمودی و ژل ۶٪ پلی‌آکریلامید و اسرشته‌ساز دارای اوره ۷ مولار برای جداسازی محصولات پی‌سی‌آر استفاده گردید. در نهایت پس از پایان الکتروفورز، رنگ‌آمیزی ژل با روش نیترات نقره انجام شد (۷). الگوهای بانندی بر اساس وجود (یک) یا عدم وجود (صفر) باندها نمره‌دهی شدند (۱۵). داده‌های حاصل به صورت یک ماتریس ۶۹×۴۶ وارد نرم‌افزار Excel شد که در آن ۴۶ تعداد اینبردلاین‌ها و ۶۹ تعداد باندهای مشاهده شده بود. گروه‌بندی اینبردلاین‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS و به کمک روش‌های تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای براساس الگوریتم دورترین همسایه و ضریب تشابه جاکارد انجام شد.

نتایج و بحث

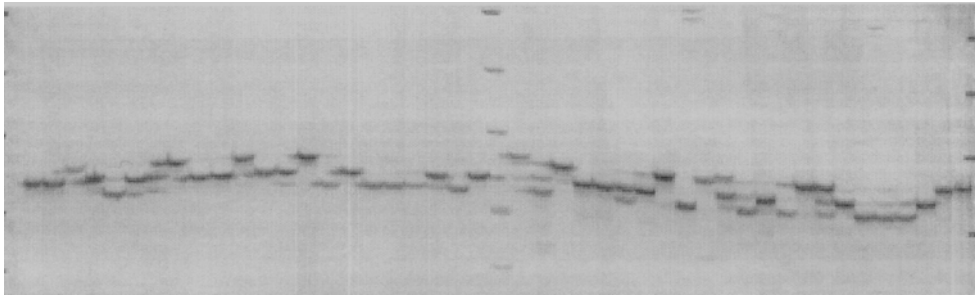
در این تحقیق از نشانگرهای ریزماهوره جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۴۶ اینبردلاین تقریباً خالص ذرت استفاده گردید. به این منظور ۱۰ جفت آغازگر ریزماهوره که در بررسی منابع موجود دارای چندشکلی نسبتاً بالایی بودند بکار رفت. این آغازگرها از ۱۰ کروموزوم ذرت انتخاب شدند بطوریکه هر آغازگر نماینده یک کروموزوم بود. با استفاده از جفت آغازگرها دی‌ان‌ا ژنومی تکثیر و چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد (شکل ۱ و ۲).

در ۴۶ اینبردلاین مورد مطالعه ۶۹ باند با استفاده از ۱۰

1. Polymorphism Information Content

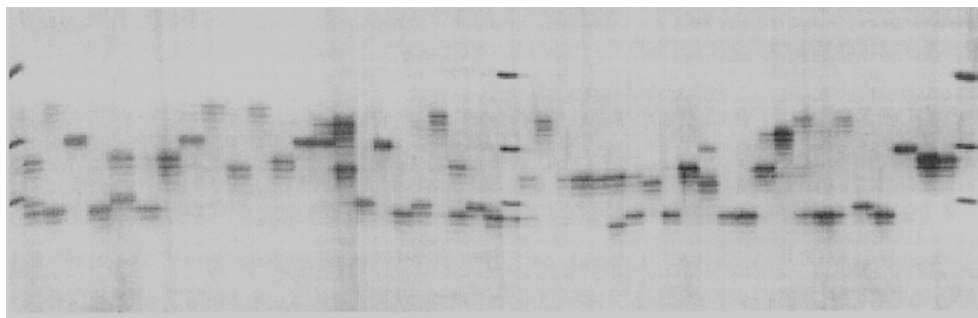
جدول ۱- مشخصات و اطلاعات آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق

نام پرایمر	نوع موتیف	شماره کروموزوم	تعداد آلل	PIC	اندازه قطعات (bp)	Tm(° C)
Phi001	AG	۱	۱۳	۰/۹۱	۶۶-۱۵۴	۶۷
Phi083	AGCT	۲	۳	۰/۵۴	۱۲۲-۱۳۸	۶۷
Phi036	AG	۳	۱۰	۰/۸۵	۶۳-۱۱۹	۶۷
Phi026	CT	۴	۱۴	۰/۸۶	۷۶-۱۲۶	۶۹
Phi024	CCT	۵	۵	۰/۷۸	۱۵۹-۱۶۵	۶۶
Nc013	AG	۶	۸	۰/۸۴	۱۰۲-۱۲۲	۶۶
Phi034	CCT	۷	۶	۰/۷۶	۱۱۰-۱۴۱	۶۶
Phi015	AAAC	۸	۴	۰/۵۸	۷۸-۱۰۲	۶۶
Phi028	GAA	۹	۳	۰/۵۶	۶۳-۷۸	۶۹
Phi063	TATC	۱۰	۳	۰/۶۶	۱۵۲-۱۷۹	۶۶



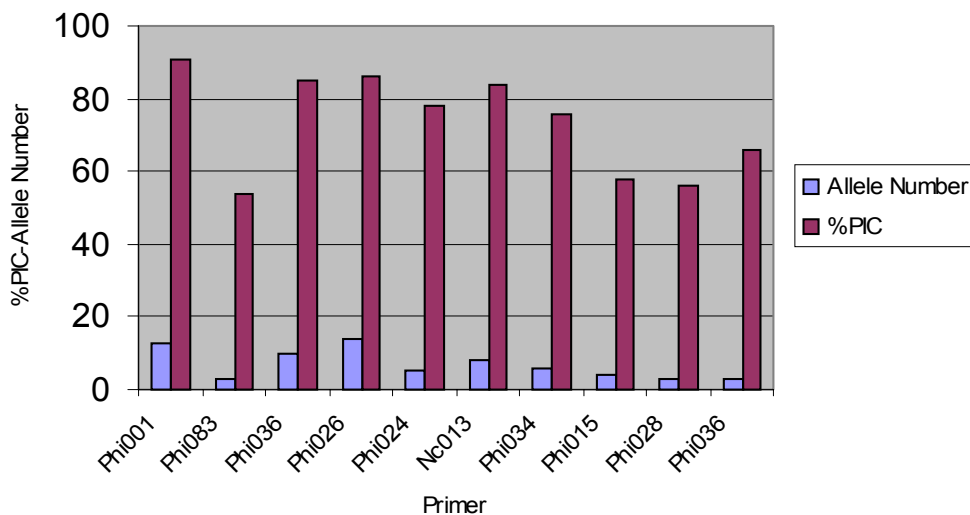
شکل ۱- الگوی بانندی اینبردلاین های مورد مطالعه با استفاده از آغازگر Phi063

از سمت چپ به راست به ترتیب نمونه‌های ۱ تا ۴۶ قرار دارند. سه چاهک اول، وسط و آخر متعلق به مارکر وزن مولکولی می‌باشد. تعداد کم آلل و چندشکلی پایین از خصوصیات ریزماهوره‌هایی است که دارای واحدهای تکرارشونده چهار نوکلئوتیدی (TATC) هستند.



شکل ۲- الگوی بانندی اینبردلاین های مورد مطالعه با استفاده از آغازگر Phi034

از سمت چپ به راست به ترتیب نمونه‌های ۱ تا ۴۶ قرار دارند. سه چاهک اول، وسط و آخر متعلق به مارکر وزن مولکولی می‌باشد. باندهای پهن و متعددی که در شکل مشاهده می‌شود مربوط به فعالیت آنزیم *Taq* پلیمرز است که یک باز اضافی به انتهای ۳' محصولات پی‌سی‌آر اضافه می‌کند.



شکل ۳- درصد چندشکلی مربوط به هر آغازگر

خاصی از ذرت وجود دارد باشند (۱۵). گروه‌بندی اینبردلاین‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS و به کمک روش‌های تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای براساس الگوریتم دورترین همسایه و ضریب تشابه جاکارد انجام شد. ضریب همبستگی

۷ آلل منحصرآ در یک اینبردلاین مشاهده گردید که حضور چنین آللهایی نشان‌دهنده شدت بالای موتاسیون در جایگاه‌های ریزماهوره‌ای می‌باشد. این آلل‌ها ممکن است نمایانگر اینبردلاین خاص و یا قسمت‌هایی از ژنوم که در نوع

اینبردلاین‌های این گروه متوسط‌ترس بوده و زمان رسیدن آنها سریع‌تر از گروه اول می‌باشد. اینبردلاین‌های گروه سوم فرم‌های انشعابی و یا لاین‌های خوهری MO17 می‌باشند و همراه با آن گروه‌بندی شدند.

جدول ۲- ضریب همبستگی کوفنتیک برای روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضرایب تشابه مختلف

روش تجزیه	ضریب تشابه		
	انطباق ساده	جاکارد	دایس
UPGMA	۰/۵۶	۰/۶۶	۰/۵۹
COMPLETE	۰/۵۱	۰/۷۶*	۰/۶۶

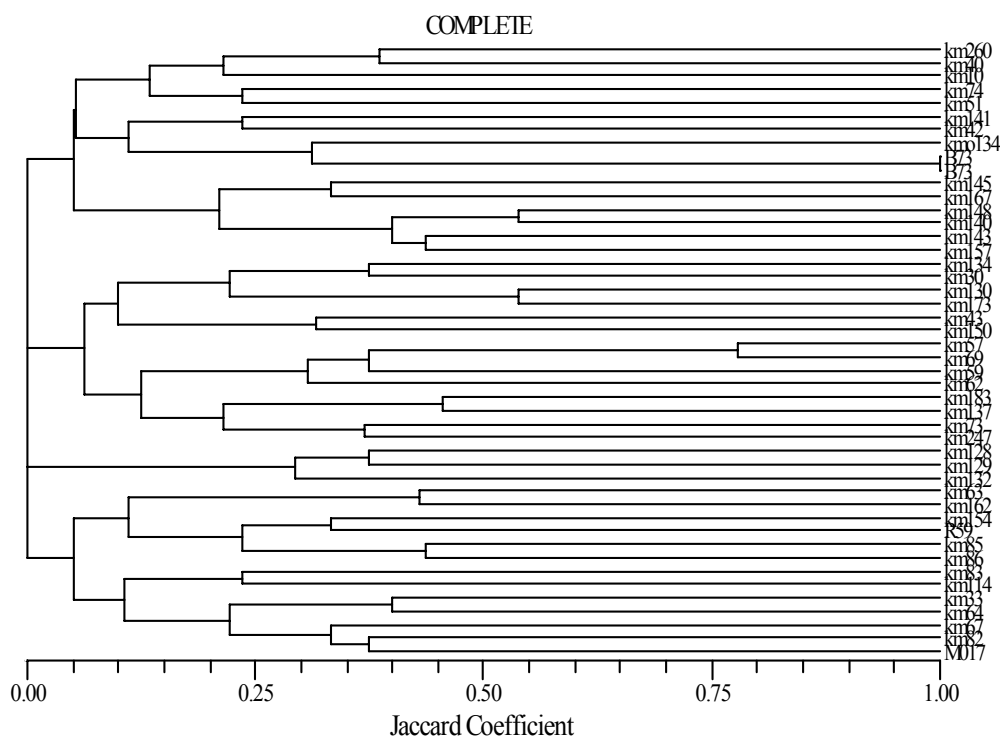
* ضریب همبستگی کوفنتیک بین ضریب تشابه جاکارد و روش تجزیه خوشه‌ای Complete بالاترین مقدار است.

دو اینبردلاین B73 در یک جایگاه در دندروگرام قرار گرفتند. تفاوت این اینبرد لاین‌ها تنها در سیتوپلاسم آنها است، بطوریکه یکی از آنها نربارور بوده و دیگری نرعقیم می‌باشد. تفکیک این دو اینبردلاین احتمالاً با استفاده از ریزماهوره‌های کلروپلاست مقدور است.

کوفنتیک بالای بدست آمده به کمک روش تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه جاکارد (۰/۷۶) نشان دهنده کارایی نسبی این روش برای گروه بندی ژنوتیپ‌ها بود (جدول ۲). همچنین قرارگرفتن دو اینبردلاین km134 و B73 در یک گروه، در دندروگرام حاصل از این روش، دلیل دیگری برای کارایی روش دورترین همسایه بود. براساس اطلاعات موجود این دو اینبردلاین دارای شباهت‌های ژنتیکی زیادی بوده و تنها در تعداد ردیف‌های دور بلال از یکدیگر متمایز می‌شوند.

اینبردلاین‌های مورد مطالعه در این تحقیق به سه گروه تقسیم شدند (شکل ۴). در تفسیر دندروگرام بدست آمده از تیپ آندوسپرمی و رنگ چوب‌بلال اینبردلاین‌ها و همچنین از وجود دو اینبردلاین تجارتي MO17 و B73 استفاده گردید.

اینبردلاین‌های قرار گرفته در گروه اول از لحاظ خصوصیات مشترک با B73 گزینش شده‌اند و تنها در یک یا چند صفت با آن تفاوت دارند. اینبردلاین‌های موجود در گروه دوم از هیبریدهای ذرت کشور یوگسلاوی استخراج شده‌اند و احتمالاً در ترکیب آنها اینبردلاین تجارتي MO17 حضور داشته است. در گروه سوم اینبردلاین MO17 قرار گرفت،



شکل ۴- گروه‌بندی اینبرد لاین‌های ذرت بر اساس داده‌های نشانگرهای ریزماهوره با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای دورترین همسایه و ضریب تشابه جاکارد

سپاسگزاری

این تحقیق در سال ۱۳۸۱ در مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی انجام شد و بجاست از آقای دکتر قره‌یاضی ریاست مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی و

خانم دکتر خوش‌خلق‌سیما قائم مقام این مؤسسه جهت فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام این تحقیق سپاسگزاری نمایم. همچنین از آقای دکتر سید ابوالقاسم محمدی به پاس راهنمایی‌های همه‌جانبه تشکر و قدردانی می‌کنم.

مراجع مورد استفاده

- REFERENCES**
۱. فرشادفر، ع. ۱۳۷۶. کاربرد ژنتیک کمی در اصلاح نباتات. دانشگاه رازی. انتشارات طاق بستان. ۵۲۸ صفحه.
 2. Agrawal, D. C., Sukumar, Saha., & L. May. 1999. Use of cross-species simple sequence repeat (SSR) primers for developing polymorphic DNA markers. *Journal of New Seeds* 1:25-37
 3. Andaya, V.C., D. Tabanao, G. Maramara, & L. S. Sebastian. 1996. Correlation of molecular diversity with heterosis in nine low land rice. *Philippine Journal of Crop Science* 21:4
 4. Barbosa-Neto, J.F., M. E. Sorrells, & G. Cisar. 1996. Prediction of heterosis in wheat using coefficient of parentage and RFLP-based estimates of genetic relationship. *Genome* 39:1142-1149
 5. Barriere, Y., C. Gibelin, O. Argillier, & V. Mechin. 2001. Genetic analysis in inbred lines of early dent forage maize. I-QTL mapping for yield, earliness, starch and crude protein contents from per se value and top cross experiments. *Maydica* 46:253-266
 6. Bernardo, R. 2001. Breeding potential of intra- and inter heterotic group crosses in maize. *Crop Sci* 41:68-71
 7. BIO-RAD, Sequi-Gen Nucleic Acid Electrophoresis Cell Instruction Manual, Catalogue No.165-3860-3.
 8. Chin, E. C. L., Senior, M. L and J. S. C. Smith. 1996. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome* 39:866-873
 9. Goldstein, D. B., and C. Schlotterer. 1998. Microsatellite evolution and applications. 352 P
 10. Kantety, R.V., X. Zeng, J. L. Bennetzen, & E. Zehr. Brent. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding* 1:365-373
 11. Lu, H., & R. Bernardo. 2001. Molecular marker diversity among current and Historical maize inbreds. *Theor. Appl. Genet.* 103: 613-617
 12. Matsuoka, Y., S. E. Mitchell, S. Kresovich, M. Goodman, & J. Doebley. 2002. Microsatellites in *Zea*-variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.* 104:436-450
 13. Narvel, J.M., Chu, Wen-chy., Fehr, W.R., & Randy C. Shoemaker. 2000. Development of multiplex sets of simple sequence repeat DNA markers covering the soybean genome. *Molecular Breeding* 6:175-183
 14. Ovesna, J., K. Polakova, & Leona Leisova. 2002. DNA analyses and their applications in plant breeding. *Czech J. Genet. Plant Breed* 38:29-40
 15. Senior, M. L., J. P. Mutphy, M. M. Goodman, & C. W. Stuber. 1998. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Sci* 38:1088-1098
 16. Vigouroux, Y., S. Jaqueth, J. Matsuoka, Y., & J. Doebley. 2002. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. *Mol Biol Evol* 19:1251-1260
 17. Vuylsteke, M., R. Mank, B. Brugmans, P. Stam, & M. Kuiper. 2000. Further characterization of AFLP data as a tool in genetic diversity assessments among maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Molecular Breeding* 6:256-276

Utilization of Microsatellite Markers for Determining Genetic Relationships in Maize Inbred Lines

F. DEGHAN NAIERI¹, S. ABD-MISHANI², A. M. SHAKIB³,
S. B. E. SEYEDE TABATABAI⁴ AND A. BANKESAZ⁵

1, 2, Former Graduate Student and Professor, Faculty of Agriculture,
University of Tehran, 3, Staff Member, Agricultural Biotechnology Research
Institute, 4, Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Isfahan University of
Technology 5, Staff Member, Seed and Plant Improvement Institute

Accepted April. 28, 2004

SUMMARY

Simple sequence repeats (SSRs) are a relatively new class of DNA markers consisting of short runs of tandemly repeated sequence motifs, 2 to 6 base pair, evenly distributed throughout eukaryotic genomes. Among maize (*Zea mays* L.) breeders, there is a heightened awareness of the necessity for maintaining both genetic diversity for crop improvement as well as improving the quality of genetic resource management. In this study, genetic similarities and relationships among 46 maize inbred lines were estimated based on the allelic variability detected. DNA was extracted from young leaf tissues according to the procedure of Dellaporta et al. (1983). One SSR primer was chosen from each corn chromosome and totally ten primers were assayed using the sample of 46 inbreds. The amplified products were separated using 6% polyacrylamide gel with 7 M urea under denaturing conditions and visualized by staining with silver nitrate. Gels were then scored based on either the presence or absence of bands. Polymorphism information content (PIC) for each SSR marker was determined with $1 - \sum f_i^2$ where f_i is the frequency of the i th allele. The number of alleles per locus ranged from 3 to 14. The 69 alleles identified served as raw data for estimating genetic similarities among these lines using the NTSYS program. Ten primers revealed 73% polymorphism rate. The 46 inbreds were clustered based on the matrix of genetic similarity jaccard using the complete clustering algorithm. Cluster analysis placed the inbred lines in three clusters with elite inbreds B73 and MO17 from two opposite heterotic groups as well as endosperm types helping to interpret them. The results showed that the microsatellite marker has a high degree of polymorphism that allows efficient identification of maize genotypes which could be used in determining heterotic groups as well as in estimation of heterosis in hybrid production.

Key words: Microsatellite, Maize, Genetic diversity