

مقاله پژوهشی

تعیین کارایی نشانگر درون ژن ZmGLP به عنوان شاخص مناسب ارزیابی بنیه بذر ذرت

عنایت رضوانی خورشیدی^۱، محمدرضا جزائری^۱، لیلا صادقی^۲، محمد رحمانی^۲، فرشید حسنی^۱، بیتا اسکویی^۱، سید حسین جمالی^۱، امیرعلی کریمی^۲

چکیده مبسوط

مقدمه: تولید بذر مرغوب جهت تثبیت عملکرد محصول برای به‌نژادگران یک چالش مهم بشمار می‌رود و یکی از پاسخ‌های مهم این چالش، شفاف‌سازی سازوکارهای مولکولی مرتبط با صفات بنیه بذر می‌تواند باشد. پروتئین‌های عملکردی خانواده بزرگ کوپین یکی از مولکول‌های مسیر انتقال پیام می‌باشد. در تحقیقات قبلی مشخص شده بود که در ذرت، پروتئین ذخیره‌ای مشابه پروتئین عملکردی سوپر خانواده کوپین با نام ZmGLP در جوانه‌زنی بذر مؤثر است. اما در آزمایش‌های انجام گرفته قبلی، از شاخص‌های مناسبی برای ارزیابی قدرت بذر و نیز ارتباط آن با استقرار در مزرعه استفاده نشده بود و برای تکمیل تحقیقات قبلی، نیاز بود که کارایی نشانگر ZmGLP در پیش‌بینی سبز شدن بذر در مزرعه نیز بررسی شود.

مواد و روش‌ها: آزمایش روی ۱۴ نمونه لاین خالص تجاری ذرت انجام شد. در این آزمایش علاوه بر ارزیابی آزمایشگاهی جوانه‌زنی بذر، شاخص‌های مزرعه‌ای کیفیت فیزیولوژیک بذر شامل درصد ظهور گیاهچه در مزرعه، زمان تا ۵۰ درصد ظهور گیاهچه، زمان تا ۹۰ درصد ظهور گیاهچه، وزن خشک گیاهچه ظاهر شده، ارتفاع گیاهچه و ضریب تغییرات ارتفاع گیاهچه نیز ارزیابی شد. در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از دو جفت آغازگر (آغازگرهای CF/CR و IDF/IDR) برای شناسایی توالی DNA پروتئین کوپین استفاده گردید.

یافته‌ها: بذرها از نظر کیفیت فیزیولوژیک در آزمایشگاه و بنیه بذر در مزرعه متفاوت بوده‌اند. کمترین درصد جوانه زنی آزمایشگاه مربوط به لاین K1264/1 بود در حالیکه کمترین کیفیت فیزیولوژیک بذر در شاخص‌های مزرعه‌ای در لاین K1263/17 مشاهده شد. آزمون مولکولی، وجود آلل مطلوب در سایت InDel9 ژن مرتبط با بنیه را در نمونه‌های سه لاین B73، K1264/1 و K1264/5-1 تأیید نمود، اما در تمام نمونه بذرها لاین K1263/17 باند تکثیری سایت InDel9 مشاهده نگردید. با توجه به اینکه لاین K1264/1 که کمترین درصد جوانه‌زنی در آزمایشگاه را دارا بود در سایت مرتبط با بنیه دارای باند تکثیری بود بنابراین اکتفا به نتایج جوانه‌زنی آزمایشگاهی در بررسی رابطه این ژن با بنیه بذر قابل اطمینان نخواهد بود و ضرورت استفاده از آزمون‌های بنیه بذر که پیش‌بینی خوبی از سبز شدن با مزرعه دارند، وجود دارد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مطالعه حاضر، برای ارزیابی بنیه بخصوص زمانی که به‌نژادگر اقدام به به‌نژادی لاین یا هیبرید جدیدی می‌نماید نشانگرهای مولکولی عملکردی براساس سایت InDel9 می‌تواند کارآمد باشد و به روند پیش‌بینی سبز شدن بذر در مزرعه و غربالگری لاین‌ها سرعت بخشد تا بنیه ژنتیکی جوانه‌زنی لاین‌ها به خصوص ژرم‌پلاسماهای معتدله ذرت اطمینان حاصل شود. در نهایت لازم است آستانه بنیه پایین در بررسی کیفیت بذر در ارقام مختلف مشخص شود و ارتباط با وجود یا عدم وجود سایت InDel9 در تحقیقات بعدی لحاظ گردد.

واژه‌های کلیدی: بنیه، سبز شدن، ذرت، عملکرد، لاین، کوپین، نشانگر مولکولی

جنبه‌های نوآوری:

- ۱- استفاده از نشانگر مولکولی برای تعیین بنیه بذر لاین‌های ذرت در مزرعه برای اولین بار امکان‌سنجی و بهینه‌سازی شد.
- ۲- از نتایج ارزیابی کیفیت فیزیولوژیک بذر در مزرعه برای مطالعات رابطه نشانگرهای مولکولی با بنیه بذر برای اولین بار استفاده گردید.
- ۳- سایت InDel9 و نشانگرهای مولکولی مرتبط با بنیه بذر در مزرعه معرفی شد.

^۱ عضو هیئت علمی و استادیار سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، کرج
^۲ محقق و کارشناس سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، کرج



مقدمه

استفاده از بذرهای قوی در کشاورزی منجر به جوانه‌زنی زود، سریع و یکنواخت و کامل بذر و رسیدن به تراکم گیاهی مطلوب گردیده و این امر به نوبه خود موجب رشد سریع گیاهی خواهد شد و از طرفی رشد سریع گیاهچه به نوبه خود باعث دریافت بیشتر تشعشع خورشیدی و افزایش عملکرد می‌گردد (تکرونی و ایگلی^۱، ۱۹۹۷؛ لوپز^۲ و همکاران، ۱۹۹۷؛ سلطانی^۳ و همکاران، ۲۰۰۲). هنگامی که تراکم گیاهی از حد عادی کمتر باشد اثر قدرت بذر بر عملکرد در گیاهی مثل ذرت اهمیت می‌یابد زیرا بوته‌های باقی‌مانده قادر به جبران تراکم نیستند (خواه^۴ و همکاران، ۱۹۸۶). اصطلاح کیفیت بذر در عمل به توصیف ارزش کلی یک توده بذر برای هدف مطلوب استفاده می‌شود و شامل اجزاء خلوص گونه و رقم، اندازه بذر، خلوص فیزیکی، جوانه‌زنی، قدرت بذر، محتوی رطوبتی بذر و سلامت بذر است (همپتون^۵ و همکاران، ۲۰۰۴). جزء مهم کیفیت بذر یعنی قدرت بذر توسط انجمن بین‌المللی آزمون بذر بصورت "مجموع ویژگی‌هایی که فعالیت بالقوه بذر یا توده بذری را در حین ظاهر شدن گیاهچه مشخص می‌کند" (ایستا^۶، ۲۰۱۷) و توسط انجمن تجزیه گران رسمی بذر بصورت "خصوصیاتی از بذر که که پتانسیل ظهور سریع و یکنواخت و نمو طبیعی گیاهچه را در دامنه وسیعی از شرایط مزرعه تعیین می‌کند" (آ او سا^۷، ۲۰۰۹) تعریف شده است.

در زمینه پیش‌بینی قدرت بذر مطالعات زیادی انجام گرفته است. لواتو^۸ و همکاران (۲۰۰۵) در ارزیابی قدرت بذر ذرت گزارش کردند آزمون جوانه‌زنی استاندارد همبستگی ضعیفی با درصد سبز شدن در مزرعه داشت. آن‌ها اعلام کردند آزمون تسریع پیری همانند آزمون سرما درمای ۱۰ درجه سلسیوس برای ارزیابی قدرت بذر ذرت مؤثر است. اما برای ارقام مقاوم به سرما برای

ردیابی تفاوت‌های بین محموله‌های بذری استفاده از آزمون سرما در دمای ۵ و ۷/۵ درجه سلسیوس ممکن است ضروری باشد. رضوانی^۹ و همکاران (۲۰۱۷) برای ارزیابی کیفیت بذر ذرت، علاوه بر آزمون‌های آزمایشگاهی، سه آزمون درصد ظهور گیاهچه در مزرعه، متوسط زمان ظهور و وزن خشک گیاهچه ظاهر شده برای بررسی کارکرد و استقرار بذر در مزرعه استفاده کردند. اما مطالعات دیگری نیز با استفاده از تجزیه پروتئینی انجام گرفته که بذر را با تیمارهای تسریع پیری و پیش‌تیمار (وو^{۱۰} و همکاران، ۲۰۱۰؛ ژین^{۱۱} و همکاران، ۲۰۱۱) و یا سطوح فراوانی گروه‌های پروتئینی را در پاسخ به تنش‌ها (وانگ^{۱۲} و همکاران، ۲۰۱۵) ارزیابی می‌کنند. تولید بذر مرغوب جهت تثبیت عملکرد محصول برای به‌نژادگران یک چالش مهم بشمار می‌رود و یکی از مهمترین پاسخ‌های این چالش شفاف‌سازی سازوکارهای مولکولی مرتبط با صفات بنیه بذر می‌باشد (هان^{۱۳} و همکاران، ۲۰۱۴). نشانگرهای مبتنی بر DNA برای ارزیابی رابطه ژن با فنوتیپ تنوع ژنتیکی استفاده شده است (یانگ^{۱۴} و همکاران، ۲۰۱۰). پروتئین‌های عملکردی سوپر خانواده کوپین ۱۵ یکی از مولکول‌های مسیر انتقال پیام می‌باشد. اثبات شده است که این پروتئین‌ها در اولین تنظیمات آبشار انتقال پیام در جوانه‌زنی آراییدوپسیس دخالت دارد (لاپیک^{۱۵}، ۲۰۰۳). در ذرت نیز پروتئین مشابه کوپین با نام ZmGLP در جوانه‌زنی بذر مؤثر نشان داده شده است. این پروتئین از پروتئین‌های ذخیره‌ای بوده و در قابلیت جوانه‌زنی مؤثر می‌باشد (فو^{۱۶} و همکاران، ۲۰۱۱). ساختار ژنی و چندشکلی ژن ZmGLP مرتبط با جوانه‌زنی بذر ذرت در لاین اینبرد B73 توسط فو و همکاران (۲۰۱۶) شناسایی گردید. براساس نتایج بدست آمده این ژن ۵ اگزون دارد که ۵۲۲ اسید آمینه را رمز می‌کند و دارای

⁹ Rezvani¹⁰ Wu¹¹ Xin¹² Wang¹³ Han¹⁴ Yang¹⁵ Cupin¹⁶ Lapik¹⁷ Fu¹ Tekrony and Egli² Lopez³ Soltani⁴ Khah⁵ Hampton⁶ ISTA=International Seed Testing Association⁷ AOSA=Association of Official Seed Analysts⁸ Lovato

تیمار با استفاده از برنامه جرمین^۳ اصلاح شده محاسبه گردید (سلطانی و مداح^۴، ۲۰۱۰).

درصد و سرعت سبزشدگی در مزرعه: با توجه

به دستورکار ایستا یکی از اهداف آزمون درصد جوانه‌زنی تخمینی از ارزش کاشت در مزرعه می‌باشد برای اندازه‌گیری شاخص‌های ظهور بذر در مزرعه، تعداد ۴۰۰ عدد بذر برداشت شده در سال ۱۳۹۷ در مزرعه تحقیقاتی موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کشت شدند. درصد روزانه خروج کولتوپتیل با حداقل ۳ سانتی‌متر از سطح خاک ثبت شد و درصد نهایی ظهور در مزرعه محاسبه شد. با استفاده از شمارش روزانه، مدت زمان لازم برای ظهور ۵۰ و ۹۰ درصد گیاهچه‌ها برای هر تیمار با استفاده از برنامه جرمین اصلاح شده محاسبه شد. ۲۰ روز پس از کاشت به طور تصادفی ده بوته از خطوط کاشت مورد بررسی کفر شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از اندازه‌گیری ارتفاع گیاهچه، ضریب تغییرات ارتفاع ۱۰ بوته محاسبه و به عنوان شاخصی از یکنواختی ظهور بذر یادداشت گردید. همچنین وزن خشک گیاهچه با قرار دادن در آون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۵ درجه سلسیوس و توزین با ترازوی دقیق با دقت ± 0.1 گرم تعیین شد (متیوس و خواجه حسینی^۵، ۲۰۰۶).

استخراج DNA: از هر نمونه بذری ۵۰ بذر در

شرایط استاندارد اتاقلک رشد موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال سبز شدند و از برگ‌های سبز و جوان ۳۰ تا ۳۵ گیاهچه جهت استخراج DNA نمونه برداری شد. هر نمونه بذری بصورت جداگانه و با کدهای مشخص جهت استخراج DNA ژنومی مورد استفاده قرار گرفت. استخراج DNA ژنومی با استفاده از تغییراتی در روش سقایی معروف^۶ و همکاران (۱۹۹۴) انجام گرفت. این تغییرات شامل دو برابر نمودن غلظت مواد مورد استفاده در بافر استخراج و جایگزینی DDT با غلظت ۳۰ میلی‌مولار به جای مرکاپتواتانول به میزان ۰/۲ درصد می‌باشد. مراحل استخراج DNA به شرح زیر بود:

یک دومین^۱ پپتیدی سیگنال از ۷ تا ۲۲ اسیدآمینه می‌باشد و یک دومین تیپیک کوپین از ۳۳۲ تا ۴۷۷ اسید آمینه در آن شناسایی شده است.

این ژن با ۱۱۸ مکان چندشکلی در تجزیه جمعیت تنوع ژنتیکی بسیار بالایی نشان داد. وجود یک توالی ۱۸ جفت بازی (InDel9) در اگزون پنجم از دومین دوم کوپین که شش اسیدآمینه را کد می‌کند بطور معنی‌داری مرتبط با توانایی جوانه‌زنی بذرهای ذرت تشخیص داده شد. وجود توالی ۱۸ جفت باز به عنوان آل خوب در InDel9 در لاین‌های ذرت، ارتباط معنی‌داری بالایی با صفت توان جوانه‌زنی نشان داد (فو و همکاران، ۲۰۱۶). نشانگرهای عملکردی مبتنی بر PCR مرتبط با قدرت جوانه‌زنی بذر می‌تواند کمک شایانی به شناسایی قابلیت جوانه‌زنی بذر ها و انتخاب هیبریدهای با قدرت جوانه‌زنی بالا فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش روی ۱۴ نمونه لاین ذرت موجود در برنامه تکثیر بذر ذرت ایران انجام شد. بذر لاین‌ها در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و شرکت ملی کشت و صنعت و دامپروری پارس به شرح جدول ۱ تهیه گردید. ارزیابی جوانه‌زنی استاندارد بذر و شاخص‌های مزرعه‌ای کیفیت بذر و نیز ارزیابی مولکولی آن به شرح ذیل انجام شد.

آزمون جوانه‌زنی استاندارد: براساس روش انجمن

بین المللی بذر (ایستا^۲، ۲۰۱۷) در چهار تکرار با روش کاشت بین کاغذ (نوع ساندویچی با حوله کاغذی) انجام شد. ظرف‌های کشت شده درون ژرمیناتور به مدت هفت روز تحت دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس تعداد گیاهچه‌های عادی، غیرعادی و جوانه نزده با استفاده از دستورکار ارزیابی گیاهچه انجمن بین المللی بذر (ایستا، ۲۰۱۳) شمارش شد. به‌طور روزانه ظرف‌های کشت شده مورد بازدید قرار گرفته و تعداد بذرهای جوانه‌زده یادداشت شد. با استفاده از شمارش روزانه، مدت زمان لازم برای جوانه‌زنی ۵۰ درصد گیاهچه‌ها و نیز یکنواختی در ظهور گیاهچه برای هر

³ Germin

⁴ Soltani

⁵ Matthews & Khajeh Hoseini

⁶ Saghai Maroof

¹ Domain

² ISTA handbook on seedling evaluation

غلظت DNA ژنومی، نمونه‌ها با آب دیونیزه به غلظت ۵۰ نانو گرم/میکرولیتر رقیق شدند.

برای شناسایی ژن پروتئین کوپین از آغازگر اختصاصی IDF/IDR (توالی حفاظت شده ژن ZmGLP) و آغازگر CF/CR به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد (جدول ۳) (فو و همکاران، ۲۰۱۶).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با مستر میکس^۲ آماده (شرکت سینازن) انجام شد. برای تهیه حجم ۲۰ میکرولیتر واکنش PCR به میزان ۱۰ میکرولیتر مستر میکس آماده (غلظت 2X، حاوی ۰/۰۸ واحد آنزیم Taq پلیمرز، ۳ میلی‌مولار MgCl₂ و ۰/۴ میلی‌مولار dNTPs)، ۰/۵ میکرولیتر از جفت آغازگر اختصاصی بینه IDF/IDR (۱۰ پیکومول)، ۰/۴ میکرولیتر از جفت آغازگر کنترل داخلی CF/CR و ۲ میکرولیتر DNA الگو (۵۰ نانوگرم) استفاده شد. دمای بهینه اتصال هر آغازگر با تنظیم شیب دمایی مشخص گردید.

برای انجام این واکنش از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) استفاده شد. چرخه‌های حرارتی برای تکثیر با آغازگرهای مورد استفاده با تغییراتی شامل مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای بهینه شده ۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه، سپس یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C درجه به مدت ۵ دقیقه بود.

الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط ژل آگارز ۱/۵ درصد تحت ولتاژ ۷۵ به مدت یک ساعت انجام شد. محلول رنگی Gel Red (Biotium) در رنگ‌آمیزی استفاده گردید و عکس مناسبی بوسیله دستگاه ژل داک تحت نور ماوراء بنفش (UV) ثبت و ذخیره شد.

داده‌های مربوط به آزمایش‌های مختلف با استفاده از نرم افزار آماری SAS (نسخه ۹) مورد تجزیه قرار گرفت و مقایسه میانگین تیمارها نیز با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت.

۰/۵ گرم بافت برگ از هر نمونه و رقم در رک‌های سرد مخصوص در دستگاه تیشولایزر در مدت ۱۲۰ ثانیه با فرکانس ۲۸ کاملاً خرد شدند. بلافاصله ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج حاوی (100 mM Tris pH 8، 2% CTAB، 1.4 M NaCl، 30 mM DTT) به تیوب‌ها اضافه گردید (مواد استفاده شده در بافر استخراج از کمپانی مرک^۱ می‌باشد).

میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. به منظور همگن شدن دمای محتویات میکروتیوب‌ها و تأثیر بهینه بافر استخراج، دو تا سه مرتبه میکروتیوب‌ها سرو ته گردیدند. به منظور ته‌نشین شدن کامل پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها، ۳۵۰ میکرولیتر از محلول کلروفرم-ایزواکامیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) به میکروتیوب‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار (Eppendorf مدل 5810R) سانتریفیوژ گردیدند. فاز بالایی به میکروتیوب‌های جدید و سترون منتقل و به اندازه دو سوم حجم فاز رویی ایزوپروپانول سرد و ۰/۱ حجم استات سدیم ۲/۵ مولار با اسیدیته ۵ اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه به فریزر ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شدند. به منظور رسوب DNA، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام گردید. در این مرحله فاز بالایی دور ریخته شد و محتویات اسید نوکلئیک در ته میکروتیوب بصورت پلیت شفاف ته‌نشین گردید. ۶۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ اضافه و ۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ و فاز رویی دور ریخته شد. رسوب DNA در مجاورت هوا خشک و ۷۰ میکرولیتر آب دیونیزه سترون به رسوب DNA اضافه و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

برای اطمینان از موفقیت عمل استخراج DNA نمونه‌ها به دو روش کمی و کیفی DNA بدست آمده مورد بررسی گرفت. بررسی کیفی DNA ژنومی، به روش الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام شد و بررسی کمی و تعیین غلظت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (نانودراپ مدل ND-1000) استفاده شد. پس از تعیین

² Master Mix

¹ Merck

نتایج و بحث

میانگین جوانه‌زنی استاندارد (بذرهای با گیاهچه‌های عادی) حدود ۸۹ درصد و میانگین حداکثر درصد ظهور گیاهچه در مزرعه حدود ۶۸/۶ درصد است. بذرهای بطور میانگین در ۱۴۰ ساعت پس از شروع جذب آب به ۵۰ درصد ظرفیت ظهور مزرعه رسیدند. این زمان برای رسیدن به ۹۰ درصد ظرفیت جوانه‌زنی ۱۷۶ ساعت بود. همچنین میانگین وزن خشک گیاهچه‌های حاصله در مزرعه حدود ۱/۳۹ گرم بوده و دارای میانگین ارتفاع ۳۵/۴ سانتی‌متر بعد از ۲۰ روز از کشت بود. میانگین ارتفاع گیاهچه‌ها ۱۷/۱ بوده است. (جدول ۳).

نتایج تجزیه واریانس آزمون‌های آزمایشگاهی و مزرعه‌ای کیفیت بذر (جدول ۴ و ۵)، اثر تیمار نمونه بذر بر درصد جوانه‌زنی استاندارد، درصد ظهور بذر در مزرعه، زمان تا ۵۰ درصد ظهور گیاهچه، وزن خشک گیاهچه و ضریب تغییرات ارتفاع را در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار نشان داد. بنابراین می‌توان اظهار نمود کیفیت فیزیولوژیک بذرهای متفاوت بوده و در نمونه‌های لاین‌های والدینی بنیه بذر بطور معنی‌داری متفاوت است.

نتایج مقایسه میانگین اثر نمونه بذر بر شاخص‌های آزمایشگاهی و مزرعه‌ای کیفیت بذر نشان داد که نمونه‌های شماره یک، سه و سیزده بیشترین و نمونه شماره ۱۴ کمترین درصد ظهور بذر در مزرعه را داشتند (جدول ۶). با توجه به اختلاف بیش از ۱۳ درصد می‌توان نتیجه گرفت اختلاف معنی‌داری در درصد ظهور گیاهچه در مزرعه بین نمونه‌ها وجود دارد. اختلاف موجود در ظهور گیاهچه نشان‌دهنده تفاوت بنیه بذر در لاین‌های مختلف است.

نمونه‌های ۱۲ و ۱۴ به ترتیب لاین‌های K1264/1 و K1263/4 کمترین بنیه بذر را داشتند. همچنین نمونه‌های یک و سه در دو شاخص وزن خشک و ارتفاع گیاهچه در مزرعه از شاخص‌های مهم بنیه بذر، بیشترین مقادیر را داشتند در حالیکه نمونه‌های شماره ۱۲ و ۱۴ بطور معنی‌داری دارای وزن خشک و ارتفاع گیاهچه کمتری بودند (جدول ۶). در مجموع، نمونه شماره ۱۴ ضعیف‌ترین نمونه از نظر بنیه جوانه‌زنی و سبز شدن در نظر گرفته شد و به عنوان مهم‌ترین نمونه هدف برای

بررسی وجود یا عدم وجود آلل مطلوب سایت InDel9 در ژن کوپین مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج بررسی وجود یا عدم وجود سایت InDel9 ژن ZmGlp در ۱۴ نمونه بذر با آغازگرهای کنترل داخلی قطعه ۴۰۴ جفت بازی از ژن پروتئین کوپین را تکثیر نمودند کنترل داخلی به عنوان صحت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در تمام نمونه‌ها و وجود ژن ZmGlp می‌باشد (شکل ۱).

از ۱۴ نمونه بذر، ۱۳ نمونه بذر قطعه ۱۴۰ جفت بازی اختصاصی ناحیه را تکثیر نمودند (شکل ۱، A). تکثیر قطعه ۱۴۰ بازی ناحیه اختصاصی InDel9 (اختصاصی ویگور) به عنوان یک آلل مطلوب مرتبط با ویژگی بنیه بذر محسوب می‌شود و در صورت عدم تکثیر به عنوان آلل نامطلوب در ارتباط با بنیه یا قدرت جوانه‌زنی بشمار می‌آید. با این توصیف همه نمونه‌های بذر لاین B73 مورد ارزیابی دارای آلل مطلوب سایت InDel9 بودند که نشان‌دهنده بنیه مطلوب در نمونه‌های بذر موجود می‌باشد.

نمونه شماره ۱۲ یا رقم K1264/1 علی‌رغم درصد ظهور به نسبت پایین (۵۹/۶) تمام ۲۹ نمونه با تکثیر قطعه ۱۴۰ جفت بازی نشان داد آلل مطلوب (سایت InDel9) در توالی ژن در لاین ۱۲ وجود دارد، اما در نمونه شماره ۱۳ (رقم K1264/5-1) فقط یک بذر (در بذر شماره ۲۱) و در نمونه شماره ۱۴ (رقم K1263/17) تمام ۲۹ نمونه بذر قطعه ۱۴۰ جفت باز تکثیر نشد که نشان‌دهنده عدم وجود آلل مطلوب بنیه جوانه‌زنی می‌باشد (شکل ۱، B).

نتایج تحقیق حاضر بیان می‌کند از طریق روش‌های مولکولی و پایش ژن رهگیری بذرهای با قدرت فیزیولوژیک پایین امکانپذیر می‌شود. هان و همکاران (۲۰۱۴) اعلام کرده بودند یکی از مهم‌ترین پاسخ‌های چالش غربالگری بذرهای با بنیه ضعیف، آشکار نمودن سازوکارهای مولکولی مرتبط با صفات بنیه بذر می‌باشد. اگر چه پروتئین کوپین عملکرد مشخص و شناخته شده‌ای دارد ولی جنبه‌های ژنومی این پروتئین ناشناخته مانده است و ضرورت دارد تحقیقات بیشتر در این زمینه انجام شود.

جدول ۱. مشخصات نمونه لاین‌های ذرت در آزمایش

Table 1. Characteristics of maize line samples in the experiment

کد نمونه Sample Code	نام رقم Variety Name	منشاء نمونه Sample origin	کد نمونه Sample Code	نام رقم Variety Name	منشاء نمونه Sample origin
1	B73	Pars Agro-industrial and Livestock Co.	8	B73	Seed and Plant improvement Institute
2	B73	Pars Agro-industrial and Livestock Co.	9	B73	Seed and Plant improvement Institute
3	B73	Pars Agro-industrial and Livestock Co.	10	B73	Pars Agro-industrial and Livestock Co.
4	B73	Pars Agro-industrial and Livestock Co.	11	B73	Pars Agro-industrial and Livestock Co.
5	B73	Pars Agro-industrial and Livestock Co.	12	K1264/1	Seed and Plant improvement Institute
6	B73	Pars Agro-industrial and Livestock Co.	13	K1264/5-1	Seed and Plant improvement Institute
7	B73	Seed and Plant improvement Institute	14	K1263/17	Seed and Plant improvement Institute

جدول ۲. مشخصات و توالی آغازگرهای مورد استفاده

Table 2. The characteristics and sequence of the primers used

Annealing Site	Primer	Sequence (5'-3')	Annealing Temperature	Reference
Conserved sequence of ZmGLP gen	CF CR	GGGGAAGCGAAGGTTGGGTAT CGTTGAAGGCACGGGTAAGC	60	Fu et al. 2016
Specific primer/Indel9	ID-F ID-R	TGTTCCCGAACGGGTCCC CGAGGTGGTGAAGCCGAAGAA		

جدول ۳. خلاصه برخی آماره‌های توصیفی شاخص‌های کیفیت بذر در ۱۴ نمونه لاین خالص ذرت

Table 3. Summary of some descriptive statistics for seed quality index in 14 maize inbred-line samples

آماره Statistics	درصد جوانه‌زنی استاندارد Standard Germination %	درصد ظهور گیاهچه Field Emergence%	زمان تا ۵۰ درصد ظهور گیاهچه (ساعت) Time to 50% of Emergence (hour)	زمان تا ۹۰ درصد ظهور گیاهچه (ساعت) Time to 90% of Emergence (hour)	وزن خشک گیاهچه (گرم) Dry weight of Emerged Seedling (g)	ارتفاع گیاهچه (سانتی‌متر) Height of Seedling (cm)	ضریب تغییرات ارتفاع CV of Seedling Height
میانگین Mean	89	68.6	140.3	175.9	1.39	35.4	17.1
SD	3.6	10.0	11.9	10.9	3.1	0.4	4.6
درصد ضریب تغییرات CV (%)	4.1	11.2	7.9	6.1	15.8	10.3	9.4

جدول ۴. میانگین مربعات در تجزیه واریانس کیفیت آزمایشگاهی بذر ۱۴ نمونه لاین ذرت

Table 4. Mean squares in the variance analysis for the laboratory seed quality in 14 maize inbred-line samples

منابع تغییر S.O.V	df	درصد جوانه‌زنی استاندارد Standard Germination%
نمونه بذر Seed sample	13	69.8 **
خطا Error	42	3.9

** معنی دار در سطح ۰.۰۱، * معنی دار در سطح ۰.۰۵ و ns غیر معنی دار

*:singnificant at $P \leq 0.05$; **: singnificant at $P \leq 0.01$; "ns" not significant

براساس نتایج حاصل، در هیچکدام از لاین‌های رقم B73 حذف آلل مطلوب در سایت InDel9 مشاهده نشد. این لاین‌ها در مزرعه نیز دارای شاخص‌های مطلوب سبز شدن از جمله درصد بالای ظهور گیاهچه در مزرعه، وزن خشک بالای در گیاهچه ظاهر شده و گیاهچه با ارتفاع زیاد برخوردار بودند. این لاین را از نظر بنیه جوانه‌زنی و سبز شدن می‌توان یک لاین مناسب برای استفاده به عنوان والد هیبرید در برنامه‌های اصلاحی ذکر کرد.

عدم وجود باند آلل مطلوب بنیه بذر در بذر شماره ۲۱ (لاین 1-k1264/5) می‌تواند به دلیل عدم خالص سازی مطلوب و وجود ناخالصی ژنتیکی در این رقم باشد زیرا همه شاخص‌های مثبت جوانه‌زنی و ظهور بذر در مزرعه را دارا می‌باشد و در ۲۸ بذر دیگر دارای باند آلل مطلوب سایت InDel9 می‌باشد.

در لاین شماره ۱۴ (رقم K1263/17) تمام ۲۹ نمونه حذف‌شدگی در ناحیه InDel9 داشتند و آلل مطلوب بنیه جوانه‌زنی را نداشتند. با مراجعه به نتایج آزمون مزرعه‌ای بنیه بذر، مشخص گردید که لاین شماره ۱۴ در شاخص‌های جوانه‌زنی کمترین درصد سبز شدن در مزرعه (۴۸ درصد) و نیز کمترین وزن و ارتفاع گیاهچه را در میان سایر نمونه‌ها داشت و از شاخص‌های مطلوب برای سبز شدن برخوردار نیست. این لاین به عنوان لاین مادری در یک رقم جدید معرفی شده داخلی استفاده شده است و در صورتی که مراقبت لازم در زمان سبز شدن صورت نگیرد موجب کاهش شدید تراکم بوته مادری در مزرعه تولید بذر هیبرید تا زیر ۵۰ درصد خواهد شد که خسارت‌زا خواهد بود.

در تحقیقی که فو و همکاران (۲۰۱۶) انجام داده بودند سایت InDel9 در اگزون پنجم از نواحی موتیف‌های داخلی^۱ علی‌رغم ارتباط معنی‌داری که با توان جوانه‌زنی در بذره‌ای ذرت داشت ولی شاخص‌های مناسب برای بنیه بذر در نظر گرفته نشده بود. در تحقیق فوق ظهور بذر در مزرعه و شاخص‌های مرتبط با آن که نشان دهنده بنیه بذر برای جوانه‌زنی در شرایط محیطی است استفاده نشده بود و مشخص نبود که وجود یا عدم وجود آلل مطلوب در سایت InDel9 منجر به چه واکنشی در مزرعه می‌گردد. در پژوهش فعلی سعی بر آن بود که شاخص‌ها بر اساس نتایج مزرعه‌ای مقایسه شوند و ارتباط وجود آلل مطلوب با ظهور گیاهچه در مزرعه بررسی شود.

براساس نتایج فو و همکاران (۲۰۱۶) بین محیط‌های مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود ولی اثر ژنوتیپ بر اساس تعامل با محیط برای صفات تست شده معنی‌دار نبود. بنابراین بررسی عملکرد وجود یا عدم وجود آلل مطلوب با وجود اثر ژنتیکی، باید در محیط‌های مختلف و شرایط متنوع آزمون گردد تا طبق نظر ایشان، شناسایی فاکتورهای ژنتیکی و عوامل بهبود ژنتیکی برای صفات مرتبط با جوانه‌زنی بذر در ژرم‌پلاسما معتدل از نظر زیستی امکانپذیر باشد. هر چند براساس نتایج یانگ و همکاران (۲۰۱۴) آلل نامطلوب تنها در ژرم پلاسماهای معتدله (۹۷ لاین خویش آمیخته) ردیابی گردید و هیچ کدام از لاین‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری آلل نامطلوب را نداشتند. ولی براساس بررسی‌های نگارنده، هر چند هیبریدهای اصلاح شده در ایران بیشتر از نوع نیمه گرمسیری است ولی بطور غالب حاصل تلاقی لاین‌های مناطق معتدله با مناطق گرمسیری می‌باشند. بنابراین بررسی لاین‌های والدینی در برنامه اصلاحی در ایران از نظر وجود یا عدم وجود آلل مطلوب، اجتناب ناپذیر است و طراحی نشانگرهای درون ژنی مرتبط با بنیه جوانه‌زنی می‌تواند کمک شایانی به شناسایی قابلیت جوانه‌زنی بذور و انتخاب هیبریدهای با جوانه‌زنی بالا از طریق اطمینان از انتخاب لاین‌های دارای آلل مطلوب فراهم آورد.

^۱ Intermotif region

جدول ۵. میانگین مربعات در تجزیه واریانس شاخص‌های کیفیت مزرعه‌ای بذر ۱۴ نمونه لاین ذرت

Table 5. Mean squares in the variance analysis for the seed quality indices in 14 maize inbred-line samples

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	درصد ظهور گیاهچه Field Emergence %	زمان تا ۵۰ درصد ظهور گیاهچه (ساعت) Time to 50% of Emergence (hour)	زمان تا ۹۰ درصد ظهور گیاهچه (ساعت) Time to 90% of Emergence (hour)	وزن خشک گیاهچه (گرم) Dry Weight of Emerged Seedling (g)	ارتفاع گیاهچه (سانتی‌متر) Height of Seedling (cm)	ضریب تغییرات ارتفاع CV of Seedling Height
تکرار Block	2	13.6 ^{ns}	0.39 ^{**}	75.0 ^{ns}	10.7 ^{ns}	5.8 ^{ns}	5.3 ^{ns}
نمونه بذر Seed sample	13	212.1 ^{**}	260.6 ^{**}	150.0 ^{ns}	19.6 ^{**}	19.0 ^{ns}	60.6 ^{**}
خطا Error	26	50.8	123.4	116.0	4.8	13.2	20.6

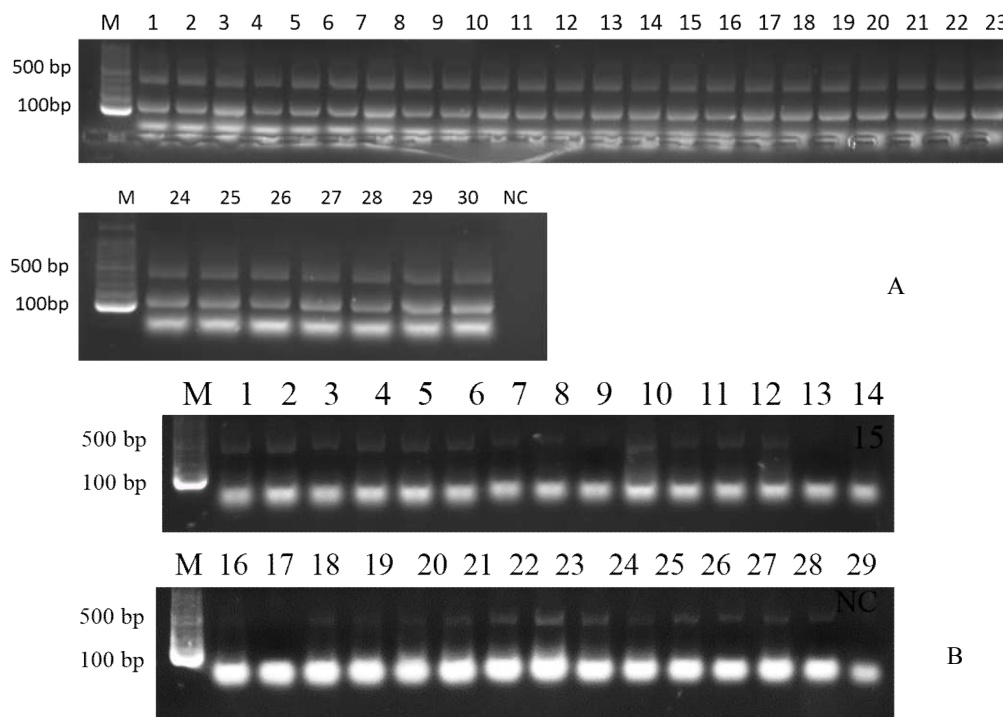
** معنی دار در سطح ۰.۰۱، * معنی دار در سطح ۰.۰۵ و ns غیر معنی دار

*:singnificant at $P \leq 0.05$; **: singnificant at $P \leq 0.01$; "ns" not significant

جدول ۶. مقایسه میانگین شاخص‌های ظهور بذر در ۱۴ نمونه لاین ذرت

Table 6. Mean comparison for seed quality indices in 14 maize inbred-line samples

نمونه بذر Sample Code	درصد جوانه‌زنی استاندارد Standard Germination%	درصد ظهور گیاهچه Field Emergence%	زمان تا ۵۰ درصد ظهور گیاهچه (ساعت) Time to 50% of Emergence (hour)	زمان تا ۹۰ درصد ظهور گیاهچه (ساعت) Time to 90% of Emergence (hour)	وزن خشک گیاهچه (گرم) Dry Weight of Emerged Seedling (g)	ارتفاع گیاهچه (سانتی‌متر) Height of Seedling (cm)	ضریب تغییرات ارتفاع CV of Seedling Height
1	94.0	80.0	143.3	171.4	1.7	36.1	13.3
2	89.0	71.3	148.6	179.2	1.2	31.9	18.5
3	95.0	80.0	122.0	174.7	1.8	40.2	11.5
4	93.0	78.0	128.0	181.9	1.3	36.2	13.8
5	86.0	65.3	148.3	181.5	1.1	31.8	21.3
6	90.0	70.7	142.1	174.5	1.4	36.7	15.1
7	89.0	66.7	138.3	171.9	1.4	34.6	15.7
8	82.0	63.3	132.5	170.7	1.3	33.9	17.1
9	91.0	71.3	144.1	173.2	1.5	35.2	24.7
10	88.0	70.0	145.0	181.7	1.2	38.6	21.2
11	89.0	73.3	139.0	168.9	1.5	36.8	13.2
12	82.0	59.7	139.1	170.4	1.2	31.1	16.8
13	94.0	80.0	143.3	171.4	1.7	36.1	13.3
14	86.0	48.1	156.2	189.6	0.9	26.6	16.8
LSD	5.1	13.3	18.8	18.2	0.37	6.16	2.75



شکل ۱. نیم رخ تکثیر ژن ZmGLP در ناحیه کنترل داخلی و سایت InDel9 مرتبط با صفت بنیه در دو رقم ذرت A- لاین B73 (نمونه شماره ۵) B- رقم K1263/17 (نمونه شماره ۱۴). ۱ تا ۳۰: محصول PCR تکثیر شده توسط دو جفت آغازگر CF/R (کنترل داخلی) با قطعه ۴۰۴ جفت بازی و جفت آغازگرهای IDF/R از سایت چندشکل InDel9. در شکل A تکثیر سایت InDel9 قطعه ۱۴۰ جفت بازی و در شکل B عدم تکثیر سایت InDel9. M: خط کش ژنومی ۱۰۰ جفت بازی. NC: کنترل منفی

Fig. 1. Amplification profile of ZmGLP gene with the internal control region and InDel9 site related to seed vigor in two maize variety. A: No. 5 of B73 line, B No. 14 of K1263/17. 1- 30 product PCR CF/R primers (internal control) amplified 404 bp and IDF/R primers (InDel9 polymorphic site). A, Amplification of 140 bp in InDel9 and B, Absence of indel9 site. M: Genomic ruler 100 bp. NC: Negative Control

همبستگی بالایی نشان می‌دهد استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

در حال حاضر صدها لاین که تعداد زیادی از آن‌ها از اقلیم معتدله نیز می‌باشند وارد برنامه‌های به‌نژادی ذرت می‌شوند. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، قبل از تعیین گروه‌های هتروژیک و ارزیابی هتروزیس که مستلزم صرف هزینه زیادی است، در مراحل اولیه به‌نژادی جهت سرعت بخشیدن به ارزیابی بنیه و توان سبز شدن در مزرعه می‌توان در ابتدا از تست‌های مولکولی با نشانگرهای درون ژنی براساس InDel9 بهره جست و غربالگری اولیه لاین‌ها را برای کسب اطمینان از وجود آلل مطلوب و بنیه بالای ژنتیکی لاین اصلاح شده جدید انجام داد. این امر می‌تواند کمک قابل توجهی در

نتایج حاصل از ارزیابی مولکولی نمونه‌های بذری ذرت در مطالعه حاضر، وجود آلل مطلوب در سایت InDel9 ژن را در لاین‌های B73، K1264/1 و K1264/5-1 تأیید نمود ولی در رقم K1263/17 که والد مادری یکی از ارقام زودرس معرفی شده کشور است عدم تکثیر سایت InDel9 مشاهده شد که بیان کننده عدم وجود آلل مطلوب در رقم می‌باشد. نتایج حاصل با نتایج آزمایشگاهی کیفیت بذر تطابق کامل نداشت ولی با نتایج کیفیت بذر مزرعه‌ای مطابقت داشت. بنابراین برای ارزیابی ارتباط بین وجود یا عدم وجود آلل مطلوب با بنیه بذر، بهتر است فقط به داده‌های آزمایشگاهی جوانه‌زنی بذر اکتفا نکرده و برای تعیین میزان تأثیر وجود یا عدم آلل مطلوب در کیفیت بذر، از داده‌های کیفیت بذر و یا آزمون‌های بنیه بذر در مزرعه که

بذرهای بسیار مفید، سریع و مؤثر می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر پیشنهاد می‌گردد برای بررسی‌های بیشتر ارتباط سایت InDel9 در ژن مرتبط با بنیه از لاین‌های با درجات متفاوت جوانه‌زنی و بنیه بذر به همراه بررسی‌های فنوتیپی صفت بنیه و تجزیه و تحلیل‌های مرتبط با همبستگی فنوتیپ و ژنوتیپ استفاده گردد. همچنین توصیه می‌شود تمام لاین‌های ذرت موجود در برنامه به‌نژادی ذرت کشور با نشانگر مولکولی مذکور از نظر بنیه ژنتیکی بذر غربال شوند و لاین‌های تجاری موجود نیز برای بررسی ژنتیکی بنیه بذر و پیشگیری از بدسبزی‌های احتمالی، با روش مولکولی آزمون گردد.

سیاسگزاری

بدینوسیله از ریاست و کارکنان محترم موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، محققان محترم موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مدیران شرکت ملی کشت و صنعت و دامپروری پارس و کارشناسان مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل (مغان) برای همکاری در اجرای این پروژه تشکر و قدردانی می‌گردد.

پیشرفت فرایند به‌نژادی رقم با بنیه بالا و ظهور گیاهچه‌های قوی در مزرعه نماید. یکی از ضعف‌های برنامه‌های به‌نژادی ذرت کشور، عدم بررسی مناسب شاخص‌های تکنولوژیک بذر در برنامه اصلاحی است. روش‌های پایش اولیه مولکولی می‌تواند راهی سریع و کم هزینه در بررسی مهمترین شاخص کیفیت بذر یعنی بنیه جوانه‌زنی بذر در مزرعه باشد. همچنین با توجه به معرفی تعداد زیادی رقم هیبرید ذرت داخلی و وارداتی در سال‌های اخیر، می‌توان لاین‌های تجاری ذرت هیبرید کشور را با استفاده از این روش آزمون نمود تا احتمال وقوع بدسبزی در فرایند تولید بذر را مشخص و توصیه‌های لازم را برای پیشگیری از خسارت احتمالی ارائه نمود.

اینکه این روش تا چه کیفیتی از بذر را به عنوان بنیه پایین در نظر می‌گیرد بستگی به استفاده از نمونه‌های متعدد لاین با بنیه‌های پایین در سطوح مختلف دارد که در تحقیقات قبلی هم مشخص نشده است. مشکل اصلی برای ادامه این نوع تحقیقات، داشتن بذرهایی با بنیه پایین در دامنه وسیعی از کیفیت بذر است. حل این مساله نیازمند انجام تحقیقات بعدی در این زمینه می‌باشد. اما آنچه که قطعی به نظر می‌رسد اینست که این روش برای اطمینان از بنیه بالای ژنتیکی

منابع

- Association of Seed Analysts (AOSA). 2009. Seed Vigor Testing Handbook, Contribution No. 32: the Handbook on Seed Testing.
- Fu, Z., Jin, X., Ding, D., Li, Y., Fu, Z. and Tang, J. 2011. Proteomic analysis of heterosis during maize seed germination. *Proteomics*, 11: 1462-1472. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000481>
- Fu, Z., Zhao, Zh., Qin Y., Xu M., Chen, Y. and Tang, J. 2016. Functional marker related to germination vigor of maize seed. *Mol Breeding*, 36: 159. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0581-9>
- Hampton, J.G., Btunton, B.J., Pemberton, G.M. and Rowarth, J.S. 2004. Temperature and time variables for accelerated ageing vigour of pea (*Pisum sativum* L.) seed. *Seed Science and Technology*, 32: 261-264. <https://doi.org/10.15258/sst.2004.32.1.30>
- Han, Z., Ku, L., Zhang, Z., Zhang, J., Guo, S., Liu, H., Zhao, R., Ren, Z., Zhang, L., Su, H., and Dong, L., Chen, Y. 2014. QTLs for seed vigor-related traits identified in maize seeds germinated under artificial aging conditions. *PLoS One*, 9: e92535 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092535>
- International Seed Testing Association. 2013. ISTA handbook on moisture determination. International Seed Testing Association. Basserdorf, Switzerland.

- International Seed Testing Association. 2017. ISTA handbook on moisture determination. International Seed Testing Association. Basserdorf, Switzerland.
- Khah, E.M., Roberts, E.H. and Ellis, R.H. 1989. Effects of seed ageing on growth and yield of spring wheat at different plant population densities. *Field Crops Research*, 20: 175-190. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(89\)90078-6](https://doi.org/10.1016/0378-4290(89)90078-6)
- Lapik, Y.R. 2003. The *Arabidopsis cupin* domain protein AtPirin1 interacts with the G protein α -subunit GPA1 and regulates seed germination and early seedling development. *The Plant Cell*, 15(7): 1578-1590. <https://doi.org/10.1105/tpc.011890>
- Lopez, C.C., Richards, R.A., Farquhar, D.G. and Williamson, R.E. 1996. Seed and seedling characteristics contributing to variation in early vigor among temperate cereals. *Crop Science*, 36: 1257-1266. <https://doi.org/10.2135/cropsci1996.0011183X003600050031x>
- Lovato, A., Noli, E. and Lovato, A.F.S. 2005. The relationship between three cold test temperature, accelerated ageing test and field emergence of maize seed. *Seed Science and Technology*, 33: 249-253. <https://doi.org/10.15258/sst.2005.33.1.26>
- Matthews, S. and Khajeh Hoseini. 2006. Mean germination time as an indicator of emergence performance in soil of seed lots of maize (*Zea mays* L.). *Seed Science and Technology*, 34: 339-347. <https://doi.org/10.15258/sst.2006.34.2.09>
- Rezvani, E., Ghaderi-Far, F., Hamidi, A. and Soltani, E. 2017. Appropriate vigor tests of maize (*Zea mays* L.) Seed for planting in subtropical and tropical areas. *Journal of Seed Technology*, 38:57-67.
- Saghai Maroof, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q. and Allard, R.W. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceeding of the National Academy of Sciences of America*, 91: 5466-5470. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5466>
- Soltani, A. 2007. Application of SAS in Statistical Analysis. MJD Press, Second Edition, Iran, 182p. [In Persain]
- Soltani, A., Galeshi, S., Zeinali, E. and Latifi, N. 2002. Germination, seed reserve utilization and seedling growth of chickpea as affected by salinity and seed size. *Seed Science and Technology*, 30(1): 51-60.
- Soltani, A. and Maddah, V. 2010. Simple, applied programs for education and research in agronomy. Niak Press. P. 80. [In Persain]
- Tekrony, D.M. and Egli, D.B. 1997. Accumulation of seed vigour during development and maturation. In: R.H. Ellis, M. Black, A.J. Murdoch & T.D. Hong (Eds), *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 369-384. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5716-2_41
- Wang, W.Q., Liu, S.J., Song, S.Q., and Moller, I.M. 2015. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. *Plant Physiology and Biochemistry*, 86: 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.11.003>
- Wu, X., Liu, H., Wang, W., Chen, S., Hu, X. and Li, C. 2010. Proteomic analysis of seed viability in maize. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 81-191. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0536-4>
- Xin, X., Lin, X.H., Zhou, Y.C., Chen, X.L., Liu, X. and Lu, X.X. 2011. Proteome analysis of maize seeds: the effect of artificial ageing. *Physiologia Plantarum*, 143(2): 126-138. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01497.x>
- Yang, X.H., Yan, J.B., Shah, T., Warburton, M.L., Li, Q., Li, L., Gao, Y.F., Chai, Y., Fu, Z.Y., Zhou, Y., Xu, S.T., Bai, G.H., Meng, Y.J., Zheng, Y.P. and Li, J.S. 2010. Genetic analysis and characterization of a new maize association mapping panel for quantitative trait loci dissection. *Theoretical Applied Genetics*, 121: 417-431. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1320-y>

Research Article

Determining the performance of *ZmGLP* functional marker as a suitable index to evaluate maize seed vigor

Enayat Rezvani Khorshidi^{1*}, Mohammad Reza Jazayeri¹, Leila Sadefgi², Mohammad Rahmani², Farshid Hassani¹, Bitia Oskoi¹, Seied Hosein Jamali¹, Amir Ali Karimi²

Extended Abstract:

Introduction: Production of high-quality seeds to stabilize crop yield is an important challenge for breeders. One of the most important answers to this challenge is to clarify the molecular mechanisms associated with seed vigor characteristics. Functional proteins of Cupin superfamily are among the molecules in signaling pathway. Previous research has shown that in maize, a storage protein similar to the functional Cupin superfamily protein called *ZmGLP* is effective in seed germination. However, in the previous experiments, suitable indicators were not used to assess seed vigor and its relationship with field establishment. So, it is needed to study the performance of *ZmGLP* in predicting field emergence to complete the previous research.

Materials and Methods: An experiment was performed on 14 samples of commercial inbred maize lines. In this experiment, in addition to the laboratory evaluation of seed germination, field indices of physiological seed quality including the percentage of seedling emergence in the field, time to 50% seedling emergence, time to 90% seedling emergence, seedling dry weight, seedling height and coefficient of variation of seedling height was also assessed. In the polymerase chain reaction, two pairs of primers (CF / CR primers and IDF / IDR primers) were used to identify the DNA sequence of the Cupin.

Results: The results show that the seeds were different in terms of physiological quality. The lowest percentage of germination in laboratory was related to K1264/1, while the lowest physiological quality of seeds in field indices was observed in K1263/17. The molecular test confirmed the presence of the desired allele at the InDel9 site of vigor-related genes in the three samples of B73, K1264/1, and K1264/5-1, but no amplification band of the InDel9 site was observed in all K1263/17 seed samples. Due to the fact that line K1264/1, which had the lowest germination percentage in the laboratory, had an amplification band at this related site to vigor, it is not enough to rely on the results of the laboratory germination test to investigate the relationship between this gene and seed vigor. The field emergence test and seed vigor test that have a good prediction of field emergence must be used in these studies.

Conclusions: According to the results of this experiment, molecular tests with functional markers based on InDel9 can be used to accelerate the evaluation of vigor, especially when the breeder is breeding a new line or hybrid. It is a useful, rapid, and effective molecular method to predict seed emergence in the field and screen the lines to ensure the genetic strength of the germination of the lines, especially in the temperate germplasm of corn. Finally, it is necessary to determine the threshold of low vigor during seed quality investigation in different cultivars, and relationship between the presence or absence InDel9 site should be considered in future research.

Keywords: *Emergence, Functional, Line, Maize, Marker, Vigor*

Highlights:

- 1- The feasibility of using molecular markers to determine the seed vigor of corn lines in the field was studied and optimized for the first time.
- 2- The results of physiological quality assessment of seeds in the field for the studies related to the relationship between molecular markers and seed vigor were exploited for the first time.
- 3- The InDel9 site and molecular markers related to seed vigor in the field were introduced.

¹ Faculty Member, Agricultural Research Education & Extension Organization, Seed and Plant Certification & Registration Institute, Karaj, Iran.

² Researcher, Agricultural Research Education & Extension Organization, Seed and Plant Certification & Registration Institute, Karaj, Iran.

