"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد هشتم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۸
(ص ۲۴۰-۲۲۹)
مقاله پژوهشی

Iranian Journal of
Seed Science and Technology
Vol.: 8, No.: 2, Autumn and Winter 2020
(pp: 229-240)
DOI: 10.22034/ijsst.2019.123777.1234
Research Article

ارزیابی خلوص ژنتیکی بذر ارقام ذرت تجاری ایران با استفاده از صفات DUS و نشانگرهای ریزماهواره

محمدرضا جزایری نوش‌آبادی[۱و۵]، جعفر اصغری[۲*]، حبیب الله سمیع زاده لاهیجی[۳] و آیدین حمیدی[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۴- دانشیار پژوهش، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۵- مربی پژوهش، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۲۵؛ تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۰۱/۱۷)

چکیده

خلوص ژنتیکی یکی از مهمترین معیارهای کیفی مورد نیاز برای موفقیت در تولید بذر هیبرید ذرت می‌باشد. به منظور جلوگیری از کاهش عملکرد ناشی از وجود بذرهای حاصل از خودگشنی و دگرگشنی ناخواسته و یا اختلاط در بذر هیبرید، توسعه یک روش ساده، سریع و دقیق برای ارزیابی خلوص ژنتیکی از اهمیت زیادی برخوردار است. بر این اساس خلوص ژنتیکی شش رقم مهم تجاری ذرت ایرانی (KSC703، KSC704، KSC705، KSC706، کارون و مبین) با دو روش آزمون رشد مزرعه‌ای (GOT) و نشانگرهای مولکولی ارزیابی شد. نتایج GOT نشان داد کمترین و بیشترین میزان خلوص ژنتیکی به ترتیب به هیبریدهای مبین(۶۷/۹٪) و KSC704(۹۲/۹٪) متعلق است. از میان ۱۱ نشانگر ریزماهواره، شش جفت آغازگر به دلیل تولید باندهای چندشکلی واضح، بدون ابهام و قابل امتیازدهی بین والدین انتخاب شدند به طوری‌که قادر به شناسایی تمام هیبریدها از بذرهای خودگشن شده و خارج از تیپ بودند. با توجه به همبستگی بالای (۰/۹۸) نتایج GOT و مولکولی می‌توان از نشانگرهای ریزماهواره به دلیل ساده بودن، دقت بیشتر و عدم تاثیر پذیری از محیط برای ارزیابی خلوص ژنتیکی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: ذرت، آزمون خلوص ژنتیکی بذر، نشانگر ریزماهواره

Assessment of genetic purity of Iranian commercial maize hybrid seeds using DUS characteristics and microsatellite markers (SSR)

M.R. Jazayeri Noushabadi[1,5], J. Asghari[2*], H. Samizadeh Lahiji[3], A. Hamidi[4]

1. Ph. D. Student, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran
4. Research Assoc. Prof., Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
5. Research Instructor, Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
(Received: Oct. 17, 2018 – Accepted: Apr. 06, 2019)

Abstract

Genetic purity is one of the most important qualitative criteria for success in hybrid seeds production. In order to avoid reduction in yield caused by using presence of seeds resulting from self-pollinating and unwanted crossing or seed mixing, development of a simple, rapid, and accurate method for genetic purity assessment is of great importance. Accordingly, the genetic purity of 6 important Iranian commercial maize hybrid cultivars (KSC703, KSC704, KSC705, KSC706, Karun and Mobin) was evaluated by GOT and molecular markers. The results of GOT showed that the lowest and highest genetic purity belonged to Mobin (67.9%) and KSC704 (92.9%) hybrids, respectively. Out of the 11 SSR markers, 6 primers were selected since they have produced clear, scorable and unambiguous polymorphic bands among the parents, so that they could identify all hybrids from self-pollinated seeds and off-types. Due to the high correlation (0.98) between GOT and molecular marker results, Hence, it is proposed that these SSR markers can be used in efficient analysis of hybrid seed purity since this technique is simple to use, more accurate and not affected by environment when compared with GOT.

Keywords: Maize hybrid, Genetic purity test, Microsatellite markers

* Email: jafasghr@guilan.ac.ir

مقدمه

ذرت با بیش از یک میلیارد و ۳۷ میلیون تن تولید، اولین غله مهم دنیا است که جایگاه مهمی را در اقتصاد جهان به عنوان غذا، علوفه و کاربرد در صنعت دارد (FAO, 2017). وجود هتروزیس بالا در این گیاه باعث ایجاد پتانسیل بالایی در عملکرد، کیفیت بذر و مقاومت به بیماری‌ها شده است (Dou, *et al*., 2012). اهمیت کیفیت بذر در گیاه ذرت با توجه به وضعیت خاص دگرگشنی آن دو چندان می‌شود. در ایران اساس زراعت ذرت بر مبنای استفاده از ارقام هیبرید بنا نهاده شده است و به موازات آن با تقویت امکانات بالقوه داخل کشور، زمینه تولید بذر نیز در داخل فراهم گردیده است به طوری‌که از سال ۱۳۶۱ در زمینه تولید بذر والدین هیبریدهای تجارتی مورد کشت خود کفائی حاصل شده است (Choukan, 2012).

سالانه حدود ۱۳۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ تن بذر ذرت در داخل کشور تولید می‌شود که بیش از ۹۵ درصد آن متعلق به رقم هیبرید سینگل کراس ۷۰۴ است (Assareh, 2016). تولید بذر هیبرید سینگل کراس ذرت شامل تلاقی دو اینبرد لاین خالص متفاوت با آرایش کاشت دو ردیف والد پدری و چهار ردیف والد مادری می‌شود. در مزارعی که از لاین مادری نربارور استفاده می‌شود باید عملیات تاسل‌کشی (حذف گل آذین نر) با ظهور اولین تاسل روی خطوط مادری در مزرعه شروع و تا زمانی که هیچ تاسلی بر روی بوته‌های مادری وجود نداشته باشد، ادامه یابد. عملیات تاسل‌کشی با دست انجام می‌گیرد و به هیچ وجه نباید فرصت ظهور کامل تاسل و گرده افشانی به هیچ بوته مادری داده شود. همچنین حذف بوته‌های خارج از تیپ که ظاهر آنها کاملاً متفاوت از سایر بوته‌ها هستند، امری ضروری در تولید بذر ذرت هیبرید است (Choukan, 2012). در طول فرایند تولید بذر هیبرید ذرت همواره تلاش زیادی در جهت تضمین بیشترین دانه‌بندی و حصول بالاترین خلوص ژنتیکی شده است (Daniel *et al*., 2012). در ایران نظارت دقیق و مستمر بر مزارع تولید بذر در مراحل مختلف رشدی گیاه، کنترل و صدور گواهی اصالت و خلوص ژنتیکی به عهده موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال است. به منظور حفظ استانداردهای خلوص ژنتیکی مورد نیاز در مزارع تولید بذر، بازرسی مزرعه از مرحله انتخاب زمین تا مرحله فراوری و بسته‌بندی بذر الزامی است. بر این اساس نظارت بر فرایند تولید بذر ذرت هیبرید در کشور با توجه به سطح زیر کشت آن (حدود ۸۵۰۰ هکتار) نیازمند کار بسیار فشرده و کنترل طاقت فرسای روزانه است (Assareh, 2016). اما این سیستم نظارتی تولید بذر ذرت هیبرید همیشه به طور کامل در جلوگیری از خود گرده‌افشانی و تلقیح با گرده‌های خارجی موفق نیست و به دلیل خودگشنی یا دگر گرده‌افشانی ناخواسته، منجر به تولید بذرهای غیر هیبرید (خودگشن) در اینبرد لاین‌های مادری یا هیبریدهای ناخالص می‌گردد. خود گرده‌افشانی در والد مادری به دلیل کاهش بذرهای هیبرید و نیز درصد جوانه‌زنی پایین‌تر بذرهای خودگشن شده در مزرعه باعث کاهش عملکرد و ارزش اقتصادی می‌گردد (Taixing *et al*., 1998). مائو و همکاران (Mao *et al*., 1998) گزارش کردند که به ازای هر یک درصد ناخالصی در بذرهای هیبرید، مقدار کاهش عملکرد در حدود ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار می‌باشد. بر این اساس بذری که در اختیار کشاورزان و تکثیرکنندگان بذر قرار داده می‌شود باید از لحاظ کیفیت تضمین گردد.

مرسوم‌ترین روش در بررسی خلوص، روش کلاسیک آزمون رشدی (GOT[1]) است. این آزمون که یکی از روش‌های موثر کنترل کیفیت فرایند تولید بذر است، شامل کشت یک نمونه از بذر در مزرعه یا گلخانه (ارقام گلخانه‌ای) برای ارزیابی صفات گیاه در مقایسه با شناسنامه مورفولوژیکی[2] آن رقم می‌باشد. در این آزمون خلوص ژنتیکی به‌صورت مشاهده‌ای ارزیابی می‌گردد و استفاده از

1 Grow-Out Test
2 Descriptor

تظاهر صفات مورفولوژیکی در گیاهان زراعی به تنهایی برای تعیین خلوص ژنتیکی مرسوم است (Moorthy *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2004; Komori and Nitta, 2004). جدیدترین روش در بررسی خلوص ژنتیکی و شناسایی و تمایز ارقام، استفاده از نشانگرهای مولکولی DNA است. این نشانگرها نقش عمده‌ای در توصیف رقم داشته و به کمترین بافت گیاهی برای بررسی نیاز دارد (Rana *et al.*, 2007). این روش جدید خلوص ژنتیکی بذر را در سطح نوکلئوتید بررسی می‌کند. نشانگرهای مولکولی بر خلاف نشانگرهای مورفولوژیکی با تنوع در توالی DNA ارقام، نقش عمده‌ای در شناسایی ارقام و ارزیابی خلوص ژنتیکی در مدت زمان کوتاهی ارائه می‌دهند. این نشانگرها تنها منتج از ژنوتیپ هستند و به اثر متقابل محیط وابستگی ندارند (Silvanacristae *et al.*, 2005). از مهمترین مزایای دیگر این نشانگرها می‌توان به غیر وابسته بودن به مرحله رشدی گیاه و قابلیت ارزیابی در هر مرحله در آزمایشگاه اشاره نمود. اتحادیه بین‌المللی حمایت از ارقام جدید گیاهی دستورالعمل استفاده از تکنیک‌های بیوشیمیایی و مولکولی (BMT)[1] را در آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری و ثبت ارقام به عنوان صفات تکمیلی تدوین کرده است (UPOV, 2002). در این دستورالعمل ریزماهواره‌ها به عنوان نشانگرهای اصلی مورد تأکید قرار گرفته‌اند. نشانگرهای ریز ماهواره (SSR)[1] که مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است اولین بار در شناسایی و تشخیص ارقام گیاهی به کاررفت (Blair *et al.*, 2002). این نشانگرها به دلیل دارا بودن مزایایی چون مقدار تنوع آللی و چند شکلی بسیار بالا و مشخص بودن محل کروموزومی و امتیازدهی نسبتاً آسان به عنوان ابزار تکمیلی در آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری (DUS)[3] ارقام ذرت (Gunjaca *et al.*, 2008)، برنج (Bonow *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2004)، فلفل (Kwon *et al.*, 2005)، کلزا (Tommasini *et al.*, 2003) و زیتون (Rotondi *et al.*, 2003) مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است. با توجه به اینکه نشانگرهای ریز ماهواره به طور اختصاصی یک جایگاه را تکثیر می‌کنند جزو نشانگرهای همبارز[4] به شمار می‌روند. یعنی امکان تشخیص هر یک از افراد خالص (اینبرد لاین) را از افراد ناخالص (هیبرید) فراهم می‌کنند و این خصوصیت باعث کاربرد این نشانگر در انگشت‌نگاری[5] و تشخیص ارقام شده است. یک آزمون خلوص ژنتیکی مطلوب باید کم هزینه بوده، انجام آن نیاز به زمان کوتاهی داشته، ساده باشد تا متخصصان بتوانند به طور موفقیت‌آمیز در حداقل زمان آموزش دهند و نتایج آن در آزمایشگاه‌های مختلف تکرار پذیر باشد (McDonald, 1998). هدف از این تحقیق بررسی کارایی دو روش آزمون رشدی در مزرعه و نشانگرهای مولکولی در بررسی خلوص و شناسایی ارقام ذرت و یافتن روشی سریع و قابل اطمینان جهت تمایز بین ارقام و ارزیابی خلوص نمونه‌های بذری است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در دو مرحله اجرا شد که عبارت بودند از: الف- انجام آزمون رشدی GOT ارقام هیبرید و لاین‌های والدینی؛ ب- انتخاب نشانگرهای ریزماهواره اختصاصی برای والدین پدری و مادری و سپس بررسی خلوص ژنتیکی بذرهای هیبرید ذرت. آزمایش‌ها به ترتیب در مزرعه پژوهشی و آزمایشگاه نشانگرهای مولکولی موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال اجرا گردید.

آزمون رشدی GOT: در این مطالعه شش رقم هیبرید تجاری سینگل کراس ذرت به همراه هشت لاین والدینی در اول خرداد سال ۱۳۹۴در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه پژوهشی موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کرج ارزیابی شدند (جدول ۱). سپس خطوط کاشت به فاصله ۷۵ سانتی‌متر ایجاد و نقشه

1 Biochemical and molecular techniques
2 Simple Sequence Repeat
3 Distinctness, Uniformity and Stability
4 Codominant markers
5 Fingerprinting

کاشت آزمایش اجرا شد. بذرها به صورت دستی کشت گردید. هر کرت شامل چهار ردیف شش متری بود و فاصله بین بوته‌ها ۱۸ سانتی‌متر در نظر گرفته شد به طوری‌که ارزیابی هر رقم بر روی حدود ۴۰۰ بوته انجام گرفت.

جدول ۱- نام ارقام و لاین‌های مورد استفاده

Table 1- Name of used varieties and lines

شماره رقم No. of variety	نام رقم هیبرید Hybrid Variety name	شجره Pedigree
1	KSC703	K47/2-2-1-3-3-1-1-1× MO17
2	KSC704	B73 × MO17
3	KSC705	K364 × MO17
4	KSC706	K3547 × MO17
5	Karoon701(کارون)	SLD45/1/2-1/1× MO17
6	Mobin(مبین)	SLD45/1/2-1× SLH/2/29/14/2-4

در این پژوهش به منظور شناسایی بوته‌هایی که از نظر ژنتیکی ناخالص بودند (بوته‌های خودگشن شده و یا خارج از تیپ) از ۲۲ صفت مورفولوژیک که توسط اتحادیه بین المللی حمایت از ارقام جدید گیاهی (UPOV, 2009) پیشنهاد شده است در مراحل مختلف رشدی از چهاربرگی تا رسیدگی استفاده شد (جدول ۲). براین اساس در هر مرحله رشدی بوته‌های خارج از تیپ علامت گذاری شده و شمارش گردیدند و در نهایت درصد خلوص ژنتیکی با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد.

رابطه (۱) $\text{خلوص ژنتیکی بذر (\%)} = (1-\frac{n}{N}) \times 100$

در این رابطه n تعداد بوته‌های خارج از تیپ و N تعداد کل بوته‌های مورد ارزیابی است.

انتخاب نشانگرهای اختصاصی والدین پدری و مادری: ۲۰ بوته از هر لاین والدینی کشت شده در مزرعه به طور تصادفی انتخاب شد و استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان هر بوته به طور جداگانه با اعمال تغییراتی در روش ارائه شده توسط روش سقایی معروف و همکاران (Saghai Maroof *et al.*, 1984) انجام گرفت. این تغییرات شامل دو برابر کردن غلظت مواد استفاده شده در بافر استخراج و جایگزینی دی‌تیوتریتول (DTT) با غلظت ۳۰ میلی‌مولار به جای مرکاپتواتانول به مقدار ۰/۲ درصد بود. کمیت و کیفیت نمونه‌ها به ترتیب توسط اسپکتروفتومتر نانودراپ (ThermoScientific, USA) و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد و غلظت نهایی DNA بعد از رقیق سازی به ۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر رسید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر DNA ژنومی، یک میکرولیتر بافر استخراج، ۰/۲ میکرولیتر dNTPs ۲۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای مستقیم و معکوس، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلی‌مراز (۵۰ واحد در میکرولیتر)، ۰/۳ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار همراه با ۵/۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام گردید. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه، ۳۰ چرخه با واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی گراد (بسته به آغازگر) به مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. محصولات نهایی PCR با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید هشت درصد

جدول ۲- صفات و مرحله ارزیابی

Table 2- Characteristics and stage of assessment

شماره صفت Char. No	صفت Characteristic	مرحله ارزیابی Stage for the assessment*
5	برگ: زاویه بین پهنک و ساقه Leaf: angle between blade and stem	اواسط تا تکمیل گلدهی Anthesis halfway to completed
6	برگ: انحنای پهنک Leaf: curvature of blade	اواسط تا تکمیل گلدهی Anthesis halfway to completed
9	گل تاجی: رنگیزه آنتوسیانین در پایه پوشه Tassel: anthocyanin coloration at base of glume	اواسط تا تکمیل گلدهی Anthesis halfway to completed
10	گل تاجی: رنگیزه آنتوسیانین پوشه به جز پایه Tassel: anthocyanin coloration of glumes excluding base	اواسط تا تکمیل گلدهی Anthesis halfway to completed
11	گل تاجی: رنگیزه آنتوسیانین بساک Tassel: anthocyanin coloration of anthers	اواسط تا تکمیل گلدهی Anthesis halfway to completed
12	گل تاجی: زاویه بین محور اصلی و شاخه‌های جانبی Tassel: angle between main axis and lateral branches	اواسط تا تکمیل گلدهی Anthesis halfway to completed
13	گل تاجی: طرز قرار گرفتن شاخه‌های جانبی Tassel: curvature of lateral branches	تکمیل گلدهی Anthesis complete
14	گل تاجی: تعداد شاخه‌های جانبی اولیه Tassel: number of primary lateral branches	اواسط گلدهی تا تا اواسط شیری شدن دانه Anthesis halfway to to medium milk
16	بلال: رنگیزه آنتوسیانین کاکل Ear: anthocyanin coloration of silks	اواسط گلدهی Anthesis halfway
17	ساقه: رنگیزه آنتوسیانین کاکل Stem: anthocyanin coloration of brace roots	اواسط گلدهی تا اواسط شیری شدن دانه Anthesis halfway to medium milk
18	گل تاجی: تراکم سنبلچه‌ها Tassel: density of spikelets	شروع گلدهی تا زمان تشکیل دانه آبکی Beginning of anthesis to caryopsis watery ripe
19	برگ: رنگیزه آنتوسیانین غلاف Leaf: anthocyanin coloration of sheath	تشکیل دانه آبکی تا شیری متوسط Caryopsis watery ripe to medium milk
20	ساقه: رنگیزه آنتوسیانین میانگره‌ها Stem: anthocyanin coloration of internodes	تشکیل دانه آبکی تا شیری متوسط Caryopsis watery ripe to medium milk
21	گل تاجی: طول محور اصلی از بالای پایین‌ترین شاخه جانبی Tassel: length of main axis above lowest lateral branch	تشکیل دانه آبکی تا شیری متوسط Caryopsis watery ripe to medium milk
22	گل تاجی: طول محور اصلی از بالای بالاترین شاخه جانبی Tassel: length of main axis above highest lateral branch	تشکیل دانه آبکی تا شیری متوسط Caryopsis watery ripe to medium milk
23	گل تاجی: طول دومین شاخه جانبی Tassel: length of on the second lateral branch	تشکیل دانه آبکی تا شیری متوسط Caryopsis watery ripe to medium milk
24	بوته: ارتفاع Plant: length	شیری متوسط تا خمیری نرم Medium milk to Soft dough
26	برگ: عرض پهنک Leaf: width of blade	شیری متوسط تا خمیری نرم Medium milk to Soft dough
30	بلال: شکل Ear: shape	رسیدگی Ripening
38	بلال: رنگ قسمت بالای دانه Ear: color of top of grain	رسیدگی Ripening
39	بلال: رنگ قسمت شکمی‌دانه Ear: color of dorsal side of grain	رسیدگی Ripening
41	بلال: رنگیزه آنتوسیانین پوشه چوب Ear: anthocyanin coloration of glumes of cob	رسیدگی Ripening

* (Zadoks *et al*., 1974)

رنگ آمیزی شده با ژل رد (GelRed®) شرکت Biotium تفکیک شدند و تحت اشعه ماوراء بنفش با دستگاه ژل اسکن ۳۰۰۰ (Gel-Scan 3000™) شرکت Corbett Robotics تصویربرداری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. باندهای تولید شده توسط هر نشانگر از بالا به پایین ژل به عنوان یک آلل در نظر گرفته شده و شمارش گردیدند. برای پوشش ژنومی مناسب، در مجموع ۱۱ نشانگر SSR (جدول ۳) برای شناسایی نشانگرهای پلی مورفیک در میان والدین استفاده شد. نشانگرهای ارزیابی شده از وب سایت https://www.maizegdb.org انتخاب شده و اطلاعات اولیه در جدول ۳ ارائه شده است. پس از بررسی نشانگرها در بین والدین، شش نشانگر که تولید باندهای چند شکل تکرار پذیر نمودند برای بررسی خلوص ژنتیکی بذر هیبرید انتخاب شد.

جدول ۳- نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی

Table 3- Primer sequences of tested microsatellite

نشانگر Marker	شماره کروموزوم Chromosome No.	پیشرونده Forward	عقب رونده Reverse	دمای اتصال Annealing Temp.
UMC1031	4	TTGGGTTCATACCTCCTAGGAACA	ACGTGGACAACCAGTCTATCAACA	59
UMC1130	8	TTGGGACTCATTACTTCCGGACT	GCTAGGGGAAAGCTCGTACTATGG	60
UMC1065	2	ACAAGGCCATCATGAAGAGCAGTA	CACGGTCTGGCACACTAACCTTAT	60
UMC1264	5	AGATAGCTGCACATGGAAACACTT	GACACTAGCCTGGAATCAGTTTCA	58
BNLG1046	5	TGAGCCGAAGCTAACCTCTC	GATGCAAAGGAGGTTCAGGA	56
BNLG1057	1	TTCACCGCCTCACATGAC	GCAACGCTAGCTAGCTTTG	55
BNLG1605	3	TCCTGCCCCCTTTGTTTTC	CACCTCTGAACCCCTGTGTT	57
MMC0241	6	TATATCCGTGCATTTACGTTT	CATCGCTTGTCTGTCGA	50
PHI116	7	TCCCTGCCGGGACTCCTG	GCATACGGCCATGGATGGGA	57
BNLG1884	9	TTCGGATGCATGTGTAACGT	CGGAAGTCCCATCTGTTTGT	51
UMC1038	10	CGTCACACTCCTCTGCCACTT	GAGGATTCAGAACTCGACTCGG	54

آزمون خلوص ژنتیکی بذرهای هیبرید ذرت: ۱۰۰ بوته از هر یک از شش رقم هیبرید به صورت تصادفی انتخاب شد و استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان هر بوته به طور جداگانه انجام شد و خلوص ژنتیکی هر رقم با استفاده از نشانگرهای SSR منتخب بر اساس الگوی باندی DNA به دست آمده از تک تک نمونه‌ها با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید.

نتایج و بحث

در آزمون رشدی حدود ۴۰۰ بوته به صورت تک تک به دقت ارزیابی شدند و تعداد بوته‌های خارج از تیپ هر هیبرید بر اساس توصیف نامه (Description) موجود هر رقم و ارزیابی صفات مورفولوژیک مذکور (جدول۲) شمارش و ثبت گردید. جزئیات تعداد بوته‌های خارج از تیپ و محاسبه میزان خلوص ژنتیکی با استفاده از نتایج آزمون GOT در جدول ۴ آمده است. براساس آمار داده‌های آزمون GOT نشان کمترین و بیشترین میزان خلوص ژنتیکی به ترتیب به هیبریدهای مبین با۶۷/۹ درصد و KSC704 با ۹۲/۹ درصد متعلق است.

تعیین نشانگرهای ریزماهواره اختصاصی والدین پدری و مادری: چند شکلی مشاهده شده بین والدین هر هیبرید به عنوان نشانگر شناسایی آن رقم مورد استفاده قرار گرفت. معیار انتخاب نشانگر به این صورت بود که باند ایجاد شده در لاین پدری و مادری به صورت واضح چند شکل باشند و عمدتا به صورت تک باند ظهور کنند تا در هیبرید حاصل الگوی دو باندی مشاهده شود. از ۱۱ نشانگر

آزمایش شده (جدول ۳)، شش نشانگر به دلیل تولید باندهای چندشکلی واضح، بدون ابهام و قابل امتیازدهی بین والدین برای آزمون خلوص ژنتیکی بذرهای هیبرید انتخاب شدند (جدول ۴). دو هیبرید KSC703 و KSC704 توسط پنج نشانگر ریزماهواره، UMC1031، UMC1130، UMC1264، BLNG1046 و BLNG1057 قابل تشخیص بودند. رقم هیبرید KSC705 نیز با پنج نشانگرریزماهواره قابل ردیابی بوده به طوری که نشانگر UMC1065 اختصاصی این رقم بود. هیبرید KSC706 با چهار نشانگر، رقم هیبرید Karoon701 با سه نشانگر و نهایتا خلوص ژنتیکی رقم مبین تنها با دو نشانگر UMC1031 و BLNG1046 قابل بررسی بود (جدول ۴).

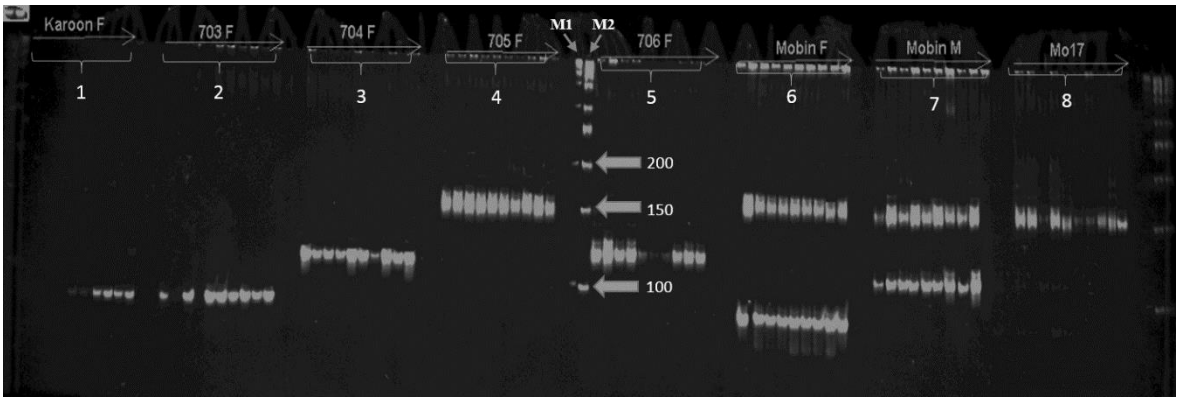
جدول ۴- نتایج آزمون خلوص ژنتیکی هیبریدهای ذرت (آزمون رشدی مزرعه‌ای و نشانگرهای ریز ماهواره)

Table 4- Results of testing genetic purity of maize hybrids (GOT and SSR markers).

Hybrid	Primers	Total seeds tested	Number of off types	Genetic purity (%)
KSC703	UMC1031	93	8	91.4
	UMC1130	96	9	90.6
	UMC1264	94	8	91.5
	BLNG1046	100	10	90.0
	BLNG1057	99	9	90.9
	GOT	389	32	91.8
KSC704	UMC1031	99	6	93.9
	UMC1130	94	5	94.7
	UMC1264	96	5	94.8
	BLNG1046	96	7	92.7
	BLNG1057	100	6	94.0
	GOT	326	23	92.9
KSC705	UMC1065	98	6	93.9
	UMC1130	93	6	93.5
	UMC1264	96	7	92.7
	BLNG1046	95	9	90.5
	BLNG1057	94	8	91.5
	GOT	399	33	91.7
KSC706	UMC1031	97	25	74.2
	UMC1264	97	24	75.3
	BLNG1046	95	26	72.6
	BLNG1057	99	27	72.7
	GOT	306	42	86.3
Karoon701	UMC1031	95	30	68.4
	BLNG1046	94	28	70.2
	BLNG1057	97	29	70.1
	GOT	389	97	75.1
Mobin	UMC1031	95	56	41.1
	BLNG1046	98	54	44.9
	GOT	392	126	67.9

نشانگر UMC1031، در چهار هیبرید Karoon701 ، KSC703، KSC704 و KSC706 دو آلل قابل تشخیص را تولید کرد که آلل یک خاص والد پدری و آلل دو اختصاصی والد مادری بود. این نشانگر در هیبرید مبین

باعث تولید سه آلل گردید که آلل شماره یک در هر دو والد مشترک بود، آلل دو به والد پدری و آلل سه به والد مادری اختصاصی داشت. این نشانگر بین لاین‌های والدینی هیبرید KSC705 چند شکلی نشان نداد و برای بررسی خلوص این رقم استفاده نشد (شکل ۱). درصد خلوص این چهار رقم هیبرید با استفاده از این نشانگر به ترتیب معادل ۶۸/۴، ۹۱/۴، ۹۳/۹ و ۷۴/۲ درصد بود (جدول ۴). دانیل و همکاران (Daniel, *et al*, 2012) با کاربرد شش جفت نشانگر ریز ماهواره به منظور بررسی خلوص ژنتیکی چهار رقم هیبرید ذرت تجاری و چهار اینبرد لاین در نیجریه، میانگین تنوع ژنتیکی و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) را به ترتیب ۰/۵۹۲ و ۰/۵۱۲ اعلام نمودند. میزان خلوص ژنتیکی اینبرد لاین‌ها بین ۹۱/۳ درصد تا ۹۸/۷ درصد و چهار هیبرید بین ۸۱/۳ درصد تا ۹۵ درصد گزارش گردید.

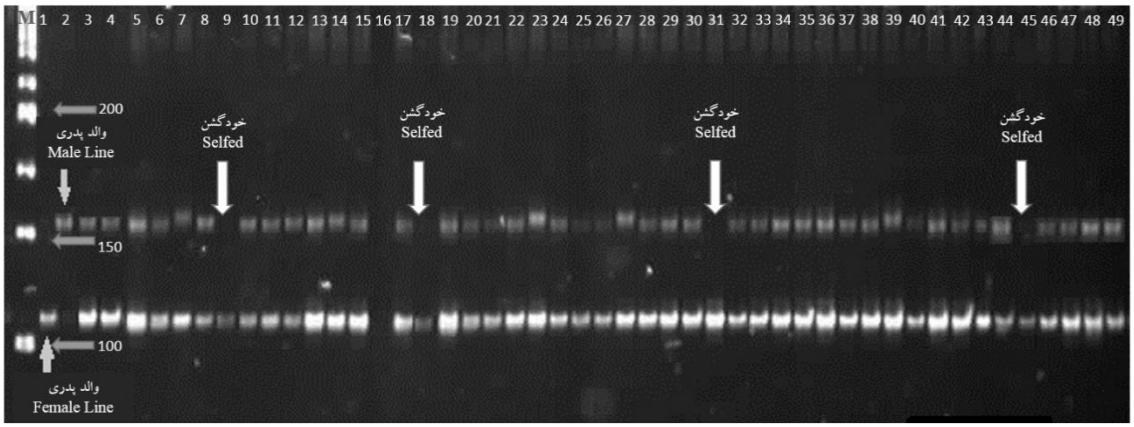


شکل ۱- پروفایل اثر انگشت قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از آغازگر UMC1031. M1: لدر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز)، M2: لدر ۵۰ جفت بازی (فرمنتاز). اعداد یک تا هشت به ترتیب لاینهای مادری کارون، ۷۰۳، ۷۰۴، ۷۰۵، ۷۰۶، مبین، لاین پدری مبین و Mo17.

Figure 1- Fingerprinting of DNA fragments using UMC1031 Primer. M1, 100bp DNA ladder (Fermentas). M2, 50bp DNA ladder (Fermentas). Number 1 to 8 respectively female lines of Karoon, 703,704,705,706, Mobin, Mobin male line and Mo17.

شکل ۲ درصد خلوص رقم هیبرید سینگل کراس 704 را با استفاده از نشانگر ریزماهواره UMC1031 نشان می‌دهد. مطابق شکل والد مادری دارای یک باند اختصاصی bp۱۲۰ و والد پدری دارای باند bp۱۶۰ م می‌باشند که در افراد هیبرید هر دو باند بالا و پایین به صورت همزمان دیده می‌شود. چهار فرد تنها دارای الگوی باند لاین مادری می‌باشند که نشان دهنده خودگشنی این بوته‌هاست که به علت عدم حذف گل تاجی (تاسل) اتفاق افتاده است. از ۹۹ فرد ارزیابی شده با این نشانگر شش فرد الگوی هیبرید را نداشتند و خلوص این رقم با این نشانگر ۹۳/۹ درصد تعیین گردید (جدول ۴). وجود الگوی باندی پدری نشان دهنده اختلاط فیزیکی بذرها هنگام برداشت است اما با توجه به اینکه بلال‌های ردیف‌های پدری جداگانه و قبل از برداشت بلال‌های بوته‌های مادری از مزرعه خارج می‌شوند احتمال وجود بذری با ژنوتیپ والد پدری بسیار کم است اما با این روش کاملا قابل تشخیص است. در آزمون مزرعه‌ای نیز از بین تعداد ۳۲۶ بوته ارزیابی شده ۲۳ بوته به عنوان خارج از تیپ شناخته شدند و درصد خلوص ۹۲/۹ درصد محاسبه گردید. بوته‌های خارج از تیپ اغلب دارای ریشه‌های لنگر و غلاف ساقه با آنتوسیانین بسیار زیاد بودند درحالی که طبق شناسنامه مورفولوژیک هیبرید KSC704 غلاف ساقه بدون رنگیزه آنتوسیانین بوده و ریشه‌های لنگر دارای کمترین شدت این رنگیزه می‌باشند. در برخی موارد الگوی باندی ایجاد شده

با الگوی والدینی هیچ تطابقی نداشت. دلیل این امر می‌تواند آلودگی با گرده‌های ناخواسته خارجی و یا ناخالصی لاین‌های والدین باشد. سالگادو و همکاران (Salgado *et al*., 2006) به منظور تعیین صحت و سقم ارزیابی خلوص ژنتیکی دو هیبرید سینگل کراس ذرت و لاین‌های والدینی آنها، از دو روش بیوشیمیایی و نشانگرهای ریزماهواره استفاده کردند. بر اساس نتایج آنها الگوی باندی آنزیمی تنها توانستند هیبریدها را از لاین‌های والدینی متمایز کنند. ولی نشانگرهای ریز ماهواره قادر به تمایز دو رقم هیبرید و والدین آنها شدند، به علاوه اینکه این روش سریع، دقیق و بدون اثرات محیطی بود. نتایج این تحقیق نشان داد که الگوی باندی حاصل از DNA استخراج شده از برگ‌های جوان و بذر یکسان بود. بنابراین استفاده از بذر به عنوان منبع DNA در آزمون خلوص ژنتیکی سریع‌تر و آسان‌تر است. نشانگر ریزماهواره UMC1065 تنها در هیبرید KSC705 بین لاین‌های پدر و مادر با تولید سه آلل چندشکلی نشان داد که در آن آلل شماره یک به والد مادری تعلق گرفت، آلل دو در هر دووالد مشترک و آلل شماره سه به لاین پدری مربوط بود. میزان خلوص ارزیابی شده با این نشانگر در این هیبرید ۹۳/۹ درصد بود. در پنج رقم هیبرید دیگر آلل‌های ایجاد شده بین لاین‌های پدری و مادری یکسان بودند و بر اساس آن تفاوت بین لاین و هیبرید مشخص نبود.



شکل۲- بررسی خلوص ژنتیکی هیبرید KSC704 با استفاده از آغازگر UMC1031. M: لدر ۵۰ جفت بازی (فرمنتاز)

Figure 2- Genetic purity analysis of KSC704 using SSR primer UMC1031. M: 50bp DNA ladder (Fermentas).

نشانگر UMC1130، در ارقام KSC703، KSC704 و KSC705 دو آلل تولید کرد. به طوری‌که در دو هیبرید اول آلل شماره یک مربوط به لاین مادری و آلل دو مربوط به لاین پدری بود اما در رقم KSC705 برعکس آلل شماره یک به والد پدری و آلل شماره دو به والد مادری متعلق بود. طول قطعه تکثیر شده در لاین مادری رقم کمتر از ۲۰۰ جفت باز بود در حالی که طول بقیه قطعات بیشتر از ۲۰۰ جفت باز بود. درصد خلوص این چهار هیبرید با این نشانگر به ترتیب ۹۰/۶، ۹۴/۷ و ۹۳/۵ درصد تعیین شد. نشانگر UMC1264، در چهار رقم KSC703، KSC704، KSC705 و KSC706 دو آلل چند شکل تولید کرد. در کلیه ارقام مذکورآلل شماره یک مربوط به لاین مادری و آلل دو مربوط به لاین پدری بود. کمترین میزان خلوص ژنتیکی بر اساس این نشانگر به رقم هیبرید KSC706 با ۷۵/۳ درصد تعلق گرفت.

نشانگر BLNG1046 بین لاین‌های والدینی هر شش رقم مورد آزمایش چند شکلی ایجاد نمود و از این لحاظ در بین نشانگرها منحصر به فرد بود. آلل‌های تولید شده توسط این نشانگر در هر رقم هیبرید دو عدد بود که در کلیه ارقام آلل اول مربوط به والد مادری و آلل شماره دو مربوط

به والد پدری بود. هیپی و همکاران (Hipi *et al.*, 2013) از پنج نشانگر آزمایش شده در دو هیبرید سینگل کراس ذرت، سه نشانگر phi96100، phi328175 و phi072 را به عنوان نشانگرهای چند شکلی معرفی نمودند که توانستند والدین دو هیبرید ذرت را تشخیص دهند و برای آزمون خلوص ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. در مطالعه دیگری (Wu *et al.* 2010) به منظور ارزیابی خلوص ژنتیکی دو رقم هیبرید F1 ذرت و لاین‌های والدینی از دو روش تجزیه و تحلیل آیزوزایمی و نشانگرهای ریز ماهواره استفاده گردید. از بین ۱۰ جفت نشانگر ریزماهواره چهار جفت از آنها توانستند بین والدین دو رقم هیبرید چند شکلی نشان دهند و بنابر این در تعیین خلوص ژنتیکی استفاده شدند. از بین سه آیزوزایم استراز، پراکسیداز و مالات دهیدروژناز، تنها استراز توانست بین والدین یک هیبرید چند شکلی ایجاد کند و دلیل عدم توانایی در تمایز بین والدین هیبرید دوم را به قرابت آنها نسبت دادند. بنابر نظر آنان نشانگر ریز ماهواره برای تخمین خلوص ژنتیکی ذرت بسیار کاراست، حتی در صورتی که هیبرید حاصل تلاقی دو لاین نزدیک به هم باشد. در این پژوهش مقایسه نتایج میزان خلوص ژنتیکی تخمین زده شده در دو روش آزمون مزرعه‌ای بر اساس صفات مورفولوژیک و استفاده از نشانگرهای ریزماهواره همخوانی و همبستگی بسیار معنی‌داری (۰/۹۸) نشان داد و در اکثر موارد نشانگرهای ریزماهواره ناخالصی بیشتر بذر را شناسایی کردند (جدول ۴). تنکسلی و مک کوچ (Tanksley and McCouch, 1997) گزارش نمودند که نشانگرهای DNA، به دلیل تعداد نامحدود و همچنین عدم تاثیرپذیری از محیط در مراحل مختلف رشدی نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی برترند. ۲۲ صفت مختلف از جمله وجود آنتوسیانین در قسمت‌های مختلف بوته از جمله غلاف برگ، پوشه و پایه پوشه گل تاجی، بساک، کاکل، میانگره و چوب بلال و همچنین صفات مرتبط با گل تاجی مطالعه شد (جدول ۲) تا بوته‌های خارج از تیپ از میان هیبریدها تشخیص داده شود. در ارزیابی مزرعه‌ای رقم مبین تنوع بسیار زیادی بین بوته‌ها داشت. بوته‌ها از لحاظ رنگیزه آنتوسیانین در پوشه گل تاجی به چهار دسته تقسیم می‌شدند. نوک قرمز، پایه قرمز، نوک و پایه قرمز به صورت همزمان و نهایتا بدون رنگیزه. همچنین از لحاظ رنگ بساک و کلاله و زاویه و میزان انحنای محور گل تاجی به شدت متنوع بودند. با توجه به ارتفاع بوته‌ها مشاهده چشمی تک تک افراد جامعه کار بسیار طاقت فرسایی است به طوری‌که شمارش بوته‌های خارج از تیپ خسته‌کننده و بسیار زمان‌بر بود. به همین دلیل تخمین میزان درصد خلوص ژنتیکی این رقم در آزمون مزرعه‌ای (۶۷/۹٪) با روش مولکولی (۴۵ ٪) اختلاف بیشتری نسبت به سایر ارقام داشت (جدول ۴). در پژوهشی مولسانتی (Mulsanti, 2011) تفاوت نتایج در آزمون خلوص ژنتیکی هیبرید برنج بر اساس نشانگرهای ریزماهواره و صفات مورفولوژیکی را نشان داد.

اگر چه به طور معمول آزمون رشدی برای ارزیابی خلوص بذرهای هیبرید با استفاده از صفات مورفولوژیکی مورد استفاده قرار گرفته اما خسته کننده و زمان‌بر بوده و علاوه بر نیاز به فضای بسیار زیاد اغلب به شناسایی کامل ژنوتیپ‌های نامطلوب منجر نخواهد شد. بسیاری از این صفات چند ژنی و یا کمی بوده، درنتیجه تحت تاثیر عوامل محیطی تغییر می‌یابند. ضمن اینکه تعداد صفات مورفولوژیک موجود برای تمایز همه ارقام جدید کافی نمی‌باشد. از این رو، پیشرفت‌های اخیر در نشانگرهای مولکولی باعث پیشنهاد استفاده از آنها برای آزمون خلوص ژنتیکی شده است زیرا این نشانگرها برخلاف نشانگرهای مورفولوژیک که بر اساس فنوتیپ می‌باشند، باعث ارزیابی دقیق ژنوتیپ می‌شوند (Sundaram *et al.*, 2008). مابین انواع نشانگرهای مولکولی، نشانگرهای ریزماهواره برای آزمایش خلوص ژنتیکی بسیار مفید می‌باشند زیرا همبارز هستند و با استفاده از آن افراد هتروزیگوت را می‌توان به راحتی از افراد هموزیگوت تشخیص داد. بنابراین علاوه بر اینکه امکان تشخیص بوته‌های خودگشن وجود دارد، نشانگرهای مولکولی را می‌توان برای جداسازی

هیبریـد از انـواع بوتـه‌هـای خـارج از تیـپ اسـتفاده کـرد (Pendse *et al*., 2001).

تامین اعتبار مالی این تحقیق و از موسسه تحقیقات اصـلاح و تهیه نهال و بذر برای در اختیـار قـراردادن مـواد گیـاهی آزمایشی سپاسگزاری می‌شود.

سپاسگزاری

از موسسه تحقیقات ثبت و گـواهی بـذر و نهـال بـرای

منابع

Reference

Assareh, M.H. 2016. Analytical Report of Seed and Plant Certification and Registration Institute (SPCRI). Publication of Seed and Plant Certification and Registration Institute.

Blair, M.W., V. Hedetale, and S.R. McCouch. 2002. Fluorescent-labeled microsatellite plants useful for detecting allelic diversity in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 105(2-3): 449-457.

Bonow, S., E.V.R. Von Pinho, M.G.C. Vieira, and B. Vosman. 2009. Microsatellite markers in and around rice genes: Applications in variety identification and DUS testing. Crop Sci. 49: 880-886**.**

Choukan, R. 2012. Maize seed production. Publication of Agricultural Research and Education Organization of Tehran.

Daniel, I., J. Adetumbi, O. Oyelakin, S. Olakojo, M. Ajala, and S. Onagbesan. 2012. Application of SSR Markers for Genetic Purity Analysis of Parental Inbred Lines and Some Commercial Hybrid Maize (*Zea mays* L.). Am. J. Exp. Agric. 2: 597-606.

Dou, X.-Y., M. Yan, Y.-F. Xu, K. Hussain, Y.-Z. Liu, and F. Lin. 2012. Identification and purity testing of maize hybrids with one parent in common by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed salt-soluble proteins. Turk J. Agric. For. 36: 267-273.

Food and Agricultore Organization of United Nations.2018. FAOSTAT. [Online] Awailable at http://www.fao.org/faostat.

Gunjaca J., I. Buhinicek, M. Jukic, H. Sarcevic, A. Vragolovic, Z. Kozic, A.Jambrovic, and I. Pejic. 2008. Discriminating maize inbred lines using molecular and DUS data. Euphytica. 161(1-2): 165-172.

Hipi, A., M. Surahman, and S. Ilyas. 2013. Seed Genetic Purity Assessment of Maize Hybrid Using Microsatellite Markers (SSR). Int. J. Appl. 3(5): 66-71.

Komori, T., and N. Nitta. 2004. A simple method to control the seed purity of japonica hybrid rice varieties using PCR-based markers. Plant Breed. 123: 549- 553.

Kwon, Y.S., J.M. Lee, G.B. Yi, S.I. Yi, K.M. Kim, E.H. Soh, K.M. Bae, E.K. Park, I.H. Song, and B.D. Kim. 2005. Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. Mol. Cell. 19: 428-435.

Liu, L.W., X.L. Hou, Y.Q. Gong, Y.M. Zhang, K.R. Wang, and J.F. Zheng. 2004. Application of molecular marker in variety identification and purity testing in vegetable crops. Mol. Plant Breed. 2: 563–568.

Mao, C.X., S.S. Virmani, and I. Kumar. 1998. Technological innovations to lower the cost of hybrid rice seed production. Advances in hybrid rice technology. Int. Rice Res. Inst. (IRRI), Manila.

McDonald, M.B. 1998. Seed quality assessment. Seed Sci. Res. 8: 265-276.

Moorthy, K.K., P. Babu, M. Sreedhar, V.S.A.K. Sama, P.N. Kumar, S.M. Balachandran, and R.M. Sundaram. 2011. Identification of informative EST-SSR markers capable of distinguishing popular Indian rice varieties and their utilization in seed genetic purity assessments. Seed Sci. Technol. 39: 282–292.

Mulsanti, I.W. 2011. Identification and evaluation of genetic purity of hybrid rice seeds using microsatellite markers (Doctoral dissertation, Thesis).

Pendse, R., S. Malhotra, S. Pawar, and T. Krishna. 2001. Use of DNA markers for identifying inbreds and hybrid seeds in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Seed Sci. Technol. 29: 503–508

Rana, M., S. Singh, and K. Bhat. 2007. RAPD, STMS and ISSR markers for genetic diversity and hybrid seed purity testing in cotton. Seed Sci. Technol. 35: 709-721.

Rotondi, A., M. Magli, C. Ricciolini, and L. Baldoni. 2003. Morphological and molecular analyses for the characterization of a group of Italian olive cultivars. Euphytica. 132: 129-137**.**

Saghai-Maroof, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen, and R.W.L. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. 81(24): 8014-8018.

Salgado, K.C.P.D.C., D.G.G.C. Vieira, É.V.D.R. Von Pinho, C.T. Guimarães, R.G. Von Pinho, and L.V.D. Souza. 2006. Genetic purity certificate in seeds of hybrid maize using molecular markers. Rev. Brasileira de Sementes, 28(1): 169-175.

Silvanacristae, S.M., J.F.M. Moistsai, M.A. Valls, A. Marcos, and C.R. Lopes. 2005. Genetic characterization of Brazilian annual Arachis species from selections Arachis and heteranthae using RAPD markers. Genet. Resour. Crop. Ev. 52(8): 1079-1086.

Singh, R.K., R.K. Sharma, A.K. Singh, V.P. Singh, N.K. Singh, S.P. Tiwari, and T. Mohapatra. 2004. Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. Euphytica. 135: 135-143**.**

Sundaram, R., B. Naveenkumar, S. Biradar, S. Balachandran, B. Mishra, M. IlyasAhmed, B. Viraktamath, M. Ramesha, and N. Sarma. 2008. Identification of informative SSR markers capable of distinguishing hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment. Euphytica. 163: 1–10

Taixing, Y., G. Lequn, Z. Zhong, and G. Mingguang. 1998. Comparison between varietal purity and zymogram purity in maize. Chinese Sci. Bull. 43: 930-935.

Tanksley S.D, and S.R. McCouch. 1997. Seed banks and molecular maps: Unlocking Genet. potential from the wild. Sci. 277: 1063 –1066

Tommasini, L., J. Batley, G.M. Arnold, R.J. Cooke, P. Donini, D. Lee, J.R. Law, C. Lowe, C. Moule, M. Trick, and K.J. Edwards. 2003. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. Theor. Appl. Genet. 106: 1091-1101.

UPOV (International Union for the Protection of new Varieties of Plants). 2009. Guidelines for the conduct of tests for Distinctness, Uniformity and Stability In maize. TG/2/7. Geneva, Switzerland.

UPOV-BMT, 2002. BMT/36/10 Progress report of the 36th session of the technical committee, the technical working parties and working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular, Geneva.

Wu, M., X. Jia, L. Tian, and B. Lv. 2010. Rapid and reliable purity identification of F1 hybrids of Maize (*Zea may* L.) using SSR markers. Maize Genomics and Genet. 1: 1-4

Zadoks, J.C., T.T. Chang, and C.F. Konzak. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Res.14 (6): 415-421.