بررسی اثر ژن‌های *Ehd1* و *Ehd3* بر زمان خوشه‌دهی در ارقام برنج

Assessment of Impact of *Ehd1* and *Ehd3* Genes on Heading Date in Rice Cultivars

لیلا نیری‌پسند[۱] و اسدالله احمدی‌خواه[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۰۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۳

چکیده

کنترل زمان گل‌دهی یکی از مهم‌ترین اجزای اثر متقابل بین گیاهان و محیط رشد آن‌ها می‌باشد که نه تنها برای میزان محصول تولیدی بلکه برای کیفیت دانه برنج نیز عامل مهمی به‌حساب می‌آید. در این تحقیق مطالعات فنوتیپی و مولکولی بر روی ۴۵ رقم برنج محلی و اصلاح شده انجام شد. ابتدا چندشکلی ژن‌های *Ehd1* و *Ehd3* در بین ارقام و سپس ارتباط این دو ژن با زمان خوشه‌دهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعات فنوتیپی حاکی از وجود تنوع بیشتر در ارقام محلی نسبت به ارقام اصلاح شده بود. ارقام محلی به‌طور متوسط ۸ روز زودرس‌تر از ارقام اصلاح شده بودند و تفاوت زمان خوشه‌دهی آن‌ها معنی‌دار بود. آغازگرهای اختصاصی طراحی شده براساس هم‌ردیف‌سازی چندگانه، توانست چندشکلی مورد انتظار را بین ارقام مختلف آشکار سازد. تجزیه ارتباط در جمعیت مورد مطالعه نشان داد که ژن *Ehd1* نسبت به ژن *Ehd3* تأثیر بیشتری بر زمان خوشه‌دهی داشت (۱۲/۱ در مقابل ۵/۴ درصد) و اثر افزایشی آن‌ها به‌ترتیب ۳/۴ و ۲/۲ روز برآورد شد. با توجه به کمّی بودن صفت مورد مطالعه و اثر کم دو ژن فوق بر زمان خوشه‌دهی، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که به‌نژادگر هنگام اصلاح ارقام زودرس باید به نقش سایر ژن‌ها و اثرات متقابل آن‌ها نیز توجه نماید.

واژه‌های کلیدی: ارتباط، برنج، خوشه‌دهی، ژن‌های کاندید

۱. دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
۲. استادیار گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران
*: نویسنده مسوول Email: a_ahmadikhah@sbu.ac.ir

مقدمه

زمان گل‌دهی از اجزای کلیدی گذار به مرحله زایشی در گیاهان گلدار می‌باشد که گیاهان را قادر به استفاده بهینه از منابع قابل دسترس در محیط رشد می‌کند *لائوری* (Laurie, 1997). برنج یک گیاه روز کوتاه است که گل‌دهی آن تحت شرایط روز کوتاه تسریع می‌شود. البته این گیاه تحت شرایط روزبلندی هم گل می‌دهد، ولی زمان خوشه‌دهی آن بسیار به تأخیر می‌افتد. تاریخ خوشه‌دهی یک صفت پیچیده است که به‌وسیله فاکتورهای محیطی، ژنتیکی و اپی‌ژنیک کنترل می‌شود. تعداد ژن‌های کنترل‌کننده این صفت زیاد بوده و هر کدام اثر کمی در بروز این خصوصیت دارند که در تعامل نزدیک با فاکتورهای محیطی مانند طول روز و دما بیان شده و یا سرکوب می‌شوند *لیو* و همکاران (Liu *et al.*, 2006). گل‌دهی وابسته به فتوپریود در برنج به‌وسیله دو مسیر ژنی مستقل کنترل می‌شود. مسیر سیگنال‌دهی *OsGI-Hd1-Hd3a* از نظر تکاملی در برنج حفاظت شده است. این مسیر به‌وسیله دریافت نور و سیستم ساعت شبانه‌روزی تنظیم می‌شود *سیرل و کوپلند* (Searle and Coupland, 2004). در این مسیر، *Hd1* بیان *Hd3a* را تنظیم می‌نماید، به‌طوری‌که در شرایط روزکوتاهی بیان آن را تحریک نموده ولی در شرایط روزبلندی از بیان آن ممانعت می‌کند *ایزاوا؛ هایاما و کوپلند* (Izawa, 2007; Hayama and Coupland, 2004). مسیر دوم شامل ژن‌های *Ghd7* و *Ehd1* می‌باشد که زمان گل‌دهی را به‌وسیله تنظیم رونویسی از ژن‌های *Hd3a* و *RFT1* و یا هر دو کنترل می‌کند *زو* و همکاران (Xue *et al.*, 2008). *Ehd1* در چندین ترکیب آمیزشی به‌عنوان یک QTL موثر بر زمان خوشه‌دهی شناسایی شد و با استفاده از تلاقی بین رقم نیپون‌بار و تایچونگ ۶۵ (رقمی با حساسیت به فتوپریود) جداسازی شد. آللِ تایچونگ ۶۵ این ژن در هر دو شرایط روز کوتاهی و روز بلندی موجب تأخیر در گل‌دهی می‌شود و غیرعملکردی می‌باشد *دوئی* و همکاران (Doi *et al.*, 2004). پروتئین *Ehd1* نوعی تنظیم‌کننده پاسخ نوع B را رمز نموده و دارای خاصیت اتصال به DNA می‌باشد؛ بنابراین، این پروتئین رونویسی از ژن‌های هدف را که برای گل‌دهی ضروری هستند، تنظیم می‌کند. در ضمن، تجزیه بیان ژن نشان داده که هر دو ژن *Hd3a* و *RFT1* در موتانت *ehd1* رونویسی نمی‌شوند *دوئی* و همکاران (2004). بیان دو ژن *Ghd7* و *Ehd1* به‌وسیله سیستم ساعت شبانه‌روزی کنترل‌کننده پاسخ به نور از طریق فیتوکروم‌ها (نور قرمز) و سیتوکروم‌ها (نور آبی) تنظیم می‌شود *ایتو* و همکاران (Itoh *et al.*, 2010). سیگنال‌های فتوپریودی در برگ‌ها دریافت شده و از آنجا یک سیگنال جدید (به‌عنوان فلوریژن) متشکل از پروتئین *Hd3a*، به مریستم رأس ساقه انتقال می‌یابد که باعث تحریک نمو زایشی می‌گردد *تاماکی* و همکاران؛ *کومیا* و همکاران (Tamaki *et al.*, 2007; Komiya *et al.*, 2009). اخیراً مشخص شده که بیان *Ehd1* به‌طور مستقل به‌وسیله *Ehd2* و *Ehd3* در هر دو شرایط روزکوتاه و روزبلند افزایش می‌یابد *ماتسوبارا* و همکاران؛ *پارک* و همکاران؛ *وو* و همکاران (Matsubara *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008). ژن *Ehd3* یک پروتئین حاوی دو موتیف PHD-فینگر بالقوه را رمز می‌نماید. این موتیف‌ها در بسیاری از تنظیم‌کننده‌های رونویسی یافت شده و در تنظیم وابسته به کروماتینِ بیان ژن دخالت دارند *شی* و همکاران؛ *ویسوکا* و همکاران (Shi *et al.*, 2006; Wysocka *et al.*, 2006). غیرکارکردی بودن ژن‌های *OsMADS50*، *Ehd2* و *Ehd3* در شرایط روزبلند موجب عدم گل‌دهی دائمی می‌شود. بنابراین، به نظر می‌رسد که این سه ژن به همراه *Ehd1* مسیر مستقلی را در شرایط روزبلند تشکیل می‌دهند (*ماتسوبارا* و همکاران، 2008؛ *کومیا* و همکاران، 2009؛ *وو* و همکاران، 2008؛ *ماتسوبارا* و همکاران،2011). تاکنون پنج تنظیم‌کننده مثبت (*Ehd2*، *Ehd3*، *OsMADS50*، *OsG1* و *OsMADS51*) و هفت تنظیم‌کننده منفی (*SE5*، *OsphyB*، *OsCOL4*، *OsLFL1*، *DTH8*، *OsMADS56* و *Ghd7*) برای *Ehd1* شناخته شده است *گائو* و همکاران (Gao *et al.*, 2013). هم‌چنین، هیچ یک از پروتئین‌های EHD2 و EHD3 به‌طور مستقیم به ناحیه پروموتر *Ehd1* متصل نمی‌شوند. با توجه به این نتایج، می‌توان گفت که *Ehd2*، *Ehd3* و *Ehd4* احتمالاً از مسیرهای جداگانه‌ای موجب تحریک رونویسی و بیان *Ehd1* می‌شوند. اکثر تنظیم‌کننده‌های شناخته شده *Ehd1*، جزو پروتئین‌های هسته‌ای بوده و بسیاری از آن‌ها به‌عنوان تنظیم‌کننده رونویسی عمل می‌کنند *زو* و همکاران، 2008؛ *ماتسوبارا* و همکاران، 2008, 2011؛ *لی* و همکاران؛ *پنگ* و همکاران؛ *ریو* و همکاران (Lee *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2006; Ryu *et al.*, 2009).

قابلیت تکثیر توالی‌های خاصی از DNA به‌وسیله PCR باعث تشخیص سریع و دقیق آلل تیپ وحشی از تیپ موتانت می‌شود *سایکی* و همکاران (Saiki *et al.*, 1985). برای این منظور، از الیگونوکلئوتیدها یا آغازگرهای اختصاصی آلل (ASO یا ASP) برای آشکارسازی موتاسیون‌ها استفاده می‌شود. در این روش، فقط الیگونوکلئوتید کاملاً جفت شونده با توالی الگو می‌تواند به‌عنوان آغازگر برای تکثیر موفق آللِ هدف عمل نماید و به این روشِ آشکارسازی موتاسیون، PCR با الیگونوکلئوتید اختصاصی آلل (ASO-PCR) گفته می‌شود *گرین* و همکاران (Green, 2002). مزیت این سیستم آشکارسازی، سرعت، سادگی و عدم

نیاز به الیگونوکلئوتیدهای رادیواکتیو می‌باشد و از آن تاکنون در مطالعه تعداد زیادی ژن مرتبط با عارضه‌های ژنتیکی در انسان مانند سیستس فیبروزیس *نیوتن* و همکاران (Newton *et al.*, 1989)، چندشکلی‌های ژن آپولیپوپروتئین E *گرین* و همکاران؛ *ماین* و همکاران (Green *et al.*, 1991; Main *et al.*, 1991) و موتاسیون‌های نقطه‌ای در انکوژن *ras* *اهلن و دوبیو* (Ehlen and Dubeau, 1989) استفاده شده است. برای تکثیر آلل هدف، آغازگرها طوری طراحی می‌شوند که دارای ناجورجفتی در انتهای `۳ (یا نزدیکی آن) باشند، آنگاه بسته به اینکه آن تک نوکلئوتید در توالی هدف وجود داشته باشد یا نداشته باشد، آغازگر قادر به بسط سنتز خواهد بود یا نخواهد بود. بنابراین، تحت شرایط سخت دمایی در PCR، فقط آن آللی که به‌طور کامل با آغازگر مکمل باشد تکثیر خواهد شد.

هدف از تحقیق حاضر بررسی چندشکلی ژن‌های *Ehd1* و *Ehd3* در بین ارقام محلی و اصلاح شده برنج و مطالعه اثر این ژن‌ها بر زمان خوشه‌دهی در برنج بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

تعداد ۴۵ رقم برنج شامل ۱۹ رقم اصلاح شده و ۲۶ رقم محلی (جدول ۱) در اردیبهشت ۱۳۹۱ خزانه‌گیری و گیاهچه‌های ۳۰ روزه در زمین اصلی (از هر رقم ۲۰ بوته در دو ردیف به فواصل ۲۵×۲۵ سانتی‌متر) نشاء شدند. زمان شروع خوشه‌دهی به‌صورت تعداد روز از زمان بذرپاشی تا زمان خروج اولین خوشه در هر رقم یادداشت گردید.

PCR و الکتروفورز

استخراج DNA از گیاهچه‌های ۷ روزه هر یک از ارقام به روش CTAB با اندکی تغییرات *احمدی خواه* (Ahmadikhah, 2009) انجام شد. کیفیت DNA به‌وسیله الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیین شد. کمّیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت هر نمونه در حد ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر تنظیم گردید. سپس نمونه‌ها تا زمان استفاده در واکنش PCR در فریزر ۲۰- ذخیره شدند.

برای تهیه مخلوط واکنش‌های PCR از کیت شرکت سیناکلون (PCR master mix kit) استفاده شد. مواد مورد استفاده در یک واکنش PCR شامل ۶ میکرولیتر PCR Master Mix، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای مستقیم و معکوس (۱۰ نانومولار) و ۴/۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود که پس از تقسیط به هر تیوب، ۱ میکرولیتر DNA الگو (۱۰ نانوگرم) اضافه گردید. واکنش‌های تکثیر در دستگاه ترمال سایکلر (شرکت BioRad) و با چرخه‌های دمایی شامل ۹۴°C به‌مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه در ۹۴°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵°C یا ۵۶°C (بسته به دمای ذوب آغازگرهای ژن‌های مورد مطالعه) به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲°C به‌مدت ۷۵ ثانیه، و سرانجام ۷۲°C به‌مدت ۷ دقیقه انجام گردید. پس از تکثیر، فرآورده‌های PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۱۱۰ الکتروفورز گردید. پس از پایان الکتروفورز عکس‌برداری از ژل‌ها با دستگاه UV trans-illuminator انجام شد.

هم‌ردیف‌سازی و طراحی آغازگرهای اختصاصی

اکسشن‌های حامل توالی ژن‌های *Ehd1* و *Ehd3* از وبگاه بانک ژن (www.ncbi.nlm.nih.gov) بارگذاری شده و سپس با برنامه ClustalW در محیط نرم‌افزار Bioedit2007 برای شناسایی تفاوت در توالی (شامل جایگزینی‌ها و حذف/ اضافه شدگی‌ها؛ InDelها) هم‌ردیف‌سازی شدند. بعد از شناسایی SNPها، انتهای یکی از آغازگرها بر روی نوکلئوتید متفاوت قرار داده شد و آغازگر دوم (آغازگر مشترک) در فاصله مناسبی از آن در نظر گرفته شد (آغازگرهای ASO-PCR). طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer3.0 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3.0) انجام شد. جزئیات نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیک و طراحی آغازگرها در قسمت مطالعات بیوانفورماتیک در بخش نتایج و بحث ارائه شده است. نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده برای این سه ژن در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱: ارقام مورد استفاده در این تحقیق که در دو گروه اصلاح شده و محلی قرار گرفته‌اند

Table 1: The cultivars used in this research which located in two groups of improved and local cultivars

ردیف Row	نام رقم Cultivar name	گروه Group	ردیف Row	نام رقم Cultivar name	گروه Group
1	ندا Neda	اصلاح شده Improved	24	سفیدرود Sefidrood	اصلاح شده Improved
2	یوسن Yosen	اصلاح شده Improved	25	درنگ Darang	محلی Local
3	آبجی بوجی Abji-boji	محلی Local	26	غریب Gharib	محلی Local
4	بینام Binam	محلی Local	27	IR60966	اصلاح شده Improved
5	IR62030	اصلاح شده Improved	28	IR56	اصلاح شده Improved
6	IR60	اصلاح شده Improved	29	IR24	اصلاح شده Improved
7	IR68	اصلاح شده Improved	30	IR28	اصلاح شده Improved
8	IR36	اصلاح شده Improved	31	چمپا Champa	محلی Local
9	صدری Sadri	محلی Local	32	IR58025	اصلاح شده Improved
10	IR66232	اصلاح شده Improved	33	بجار Bejar	محلی Local
11	سنگ طارم Sange-tarom	محلی Local	34	اوندا Unda	محلی Local
12	آمل۱ Amol1	اصلاح شده Improved	35	گرده Gerdeh	محلی Local
13	آمل۳ Amol3	اصلاح شده Improved	36	رشتی Rashti	محلی Local
14	کادوس Kadus	اصلاح شده Improved	37	دشت Dasht	محلی Local
15	خزر Khazar	اصلاح شده Improved	38	قشنگه Ghashangeh	محلی Local
16	سنگ جو Sange-jo	محلی Local	39	سالاری Salari	محلی Local
17	نعمت Nemat	اصلاح شده Improved	40	دیلمانی Deilamani	محلی Local
18	دم زرد Dom-zard	محلی Local	41	طارم محلی Trom-mahali	محلی Local
19	حسنی Hasani	محلی Local	42	عنبربوی ایلام Ilam Anbarboo	محلی Local
20	هاشمی Hashemi	محلی Local	43	اهلمی طارم Ahlami-tarom	محلی Local
21	محمدی چپرسر Mohamadi-chaparsar	محلی Local	44	میر طارم Mirtarom	محلی Local
22	صالح Saleh	اصلاح شده Improved	45	دمسیاه Domsiah	محلی Local
23	عنبربو Anbarboo	محلی Local			

جدول ۲: آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این تحقیق

Table 2: Specific primer pairs used in this research

نام ژن Gene name	کروموزوم Chromosome	موقعیت (میلیون جفت باز) Position (Mbp)	نام آغازگر Primer name	توالی (۳' ..... ۵') Sequence (3'……5')
Ehd1	10	17.1	Ehd1-F	ATGATTGTGTGTATATTCTCGCTT
			Ehd1-R	ATGTTCTTCATGCATATATCCTTG
Ehd3	8	0.3	Ehd3-F	ATGAGAAATGGAGACTATGCC
			Ehd3-R	TGGGACTTGCTTAATATCAGG

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای داده‌های فنوتیپی مقادیر آماره‌های مختلف از قبیل میانگین، انحراف معیار (SD)، حداقل و حداکثر و تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS v.16 (*کینیر* و *کولین*، 2000) محاسبه گردید. برای آزمون معنی‌دار بودن تفاوت میانگین ارقام اصلاح شده و محلی از آزمون t استفاده شد. تجزیه همبستگی و رگرسیون با نرم‌افزار SAS انجام شد. برای گروه‌بندی ارقام مورد مطالعه براساس زمان خوشه‌دهی از روش UPGMA در نرم‌افزار SPSS استفاده شد. مقادیر پارامترهایی مانند اثرات افزایشی و ضرایب تبیین با استفاده از نرم‌افزار QTL Cartographer v.2.5 (*وانگ* و همکاران، 2005) محاسبه گردید. تجزیه ارتباط اثرات ژن‌ها با روش مکان‌یابی فاصله‌ای (IM) انجام شد.

نتایج

مطالعات فنوتیپی

تجزیه واریانس نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تفاوت بسیار معنی‌داری از نظر زمان خوشه‌دهی با یکدیگر داشتند (جدول ۳).

جدول ۳: تجزیه واریانس برای زمان خوشه‌دهی ارقام مورد مطالعه

Table 3: Analysis of variance for heading date of the studied cultivars

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square	F	P>F
تکرار Replicate	1	2.84^{ns}	3.37	0.073
ژنوتیپ Genotype	44	171.99^{**}	202.50	0.000
خطا Error	44	0.84		

ns و **: به‌ترتیب نشان‌دهنده غیرمعنی‌داری و معنی‌داری در سطح ۱٪ می‌باشد

ns and **: Indicating non-significant and significant differences at 1% level

جدول ۴: آماره‌های مرتبط با زمان خوشه‌دهی در کل جمعیت و ارقام اصلاح شده و محلی برنج

Table 4: Statistics related to heading date in pooled population and improved and local rice cultivars

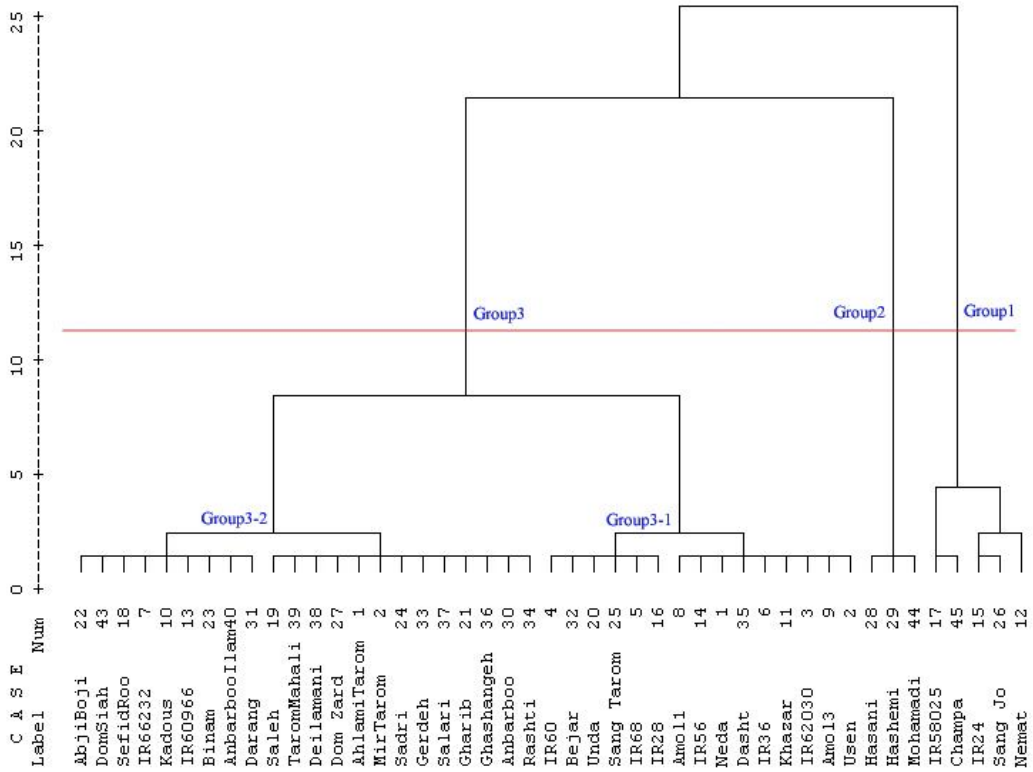
گروه Group	حداقل Minimum	حداکثر Maximum	انحراف معیار S.d	میانگین (روز) Mean (days)
ارقام اصلاح شده Improved cultivars	78	107	6.75	92.37**
ارقام محلی Local cultivars	68	109	8.87	84.04
کل Total	68	109	9.22	86.98

**: نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت میانگین ارقام اصلاح شده با میانگین ارقام محلی با آزمون t در سطح ۱٪ می‌باشد

**: Indicating significant differences between the means of improved and local cultivars using t-student test at 1% level

گروه‌بندی ارقام بر اساس زمان خوشه‌دهی

ارقام مورد مطالعه براساس زمان خوشه‌دهی با روش UPGMA به سه گروه تقسیم شدند (شکل ۱). در گروه ۱ پنج رقم دیررس با متوسط زمان خوشه‌دهی ۱۰۳/۴ روز، در گروه ۲ سه رقم زودرس با متوسط زمان خوشه‌دهی ۶۸/۷ روز و در گروه ۳ بقیه ارقام میان‌رس با متوسط خوشه‌دهی ۸۴/۲ روز قرار گرفتند (جدول ۵). تفاوت میانگین سه گروه یاد شده معنی‌دار بود. البته گروه ۳ را می‌توان به دو زیرگروه دیگر شامل نسبتاً دیررس و نسبتاً زودرس تقسیم نمود که میانگین زمان خوشه‌دهی آن‌ها به‌ترتیب ۹۲/۶ و ۷۸/۴ روز می‌باشد.



شکل ۱: دندروگرام مربوط به گروه‌بندی ارقام براساس داده‌های فنوتیپی با روش UPGMA

Fig. 1: Dendrogram of clustering cultivars base on phenotypic data using UPGMA method

جدول ۵: میانگین گروه‌های به دست آمده در تجزیه کلاستر و مقایسه آن‌ها

Table 5: Means of the three groups discriminated in cluster analysis and their comparison

میانگین Mean	حداکثر Maximum	حداقل Minimum	گروه Group
103.4[a]	109	98	1
68.7[c]	69	68	2
84.2[b]	96	77	3
92.6	96	89	1-3
78.4	87	77	2-3

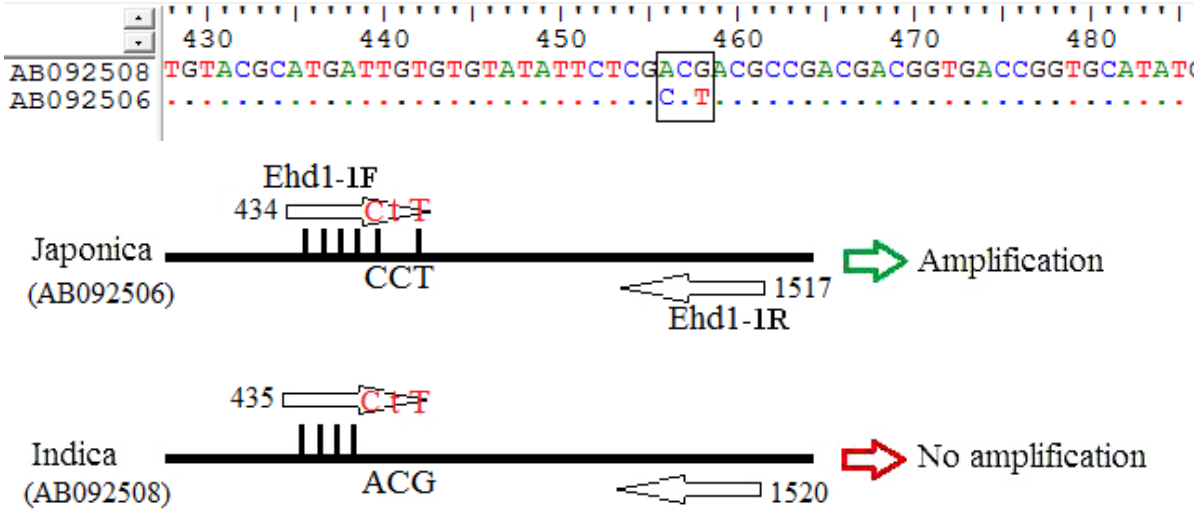
a، b و c: بیانگر معنی‌دار بودن تفاوت میانگین سه گروه در سطح ۱ درصد می‌باشد

a, b and c: Indicating significant differences between three group means at 1% level

مطالعات بیوانفورماتیک

هم‌ردیف‌سازی ژن *Ehd1*

توالی‌های دو رقم نیپون‌بار از زیرگونه ژاپونیکا (AB009506) و کَسَلت از زیرگونه ایندیکا (AB0092508) هم‌ردیف‌سازی شدند که نتیجه آن شناسایی دو SNP مجاور در موقعیت‌های ۴۵۵ و ۴۵۷ (با توجه به اکسشن مرجع نیپون‌بار) بین دو رقم بود (شکل ۲ بالا). یک آغازگر ASO اختصاصی آلل نیپون‌بار با یک ناجورجفتی در انتهای '۳ و یک آغازگر مشترک در پایین دست طراحی شد تا فقط آلل ژاپونیکا (J) به طول حدود ۱۰۸۵ جفت باز تکثیر شود (شکل ۲ پایین) وجود باند نشان‌دهنده آلل نیپون‌بار (J) و عدم وجود باند نشان‌دهنده آلل کسلت (I) می‌باشد.

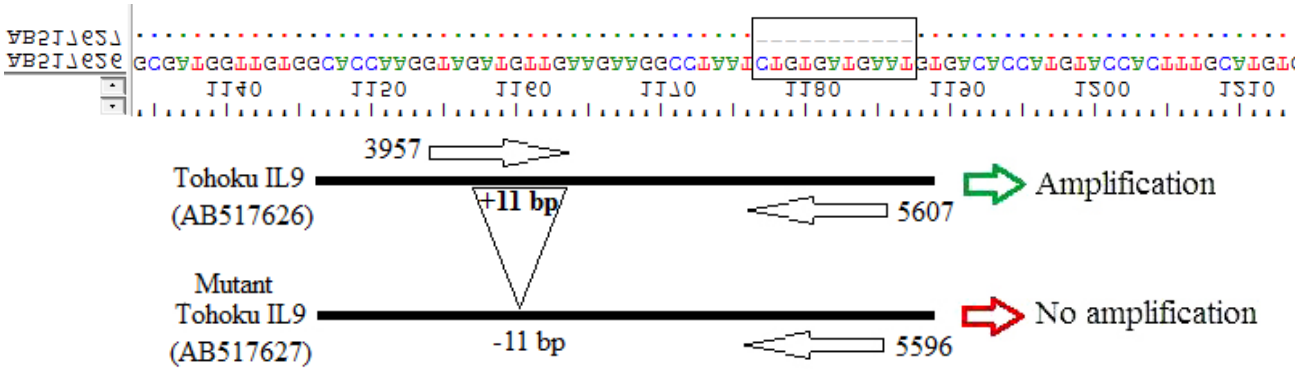


شکل ۲: بالا: نتیجه هم‌ردیف‌سازی چندگانه بین اکسشن‌های حامل ژن *Ehd1* که در آن محل دو SNP مجاور با یک مستطیل مشخص شده است. پایین: طرح شماتیک دو تفاوت تک نوکلئوتیدی (SNP) مجاور در ژن *Ehd1* بین رقم نیپون‌بار (از زیرگونه ژاپونیکا) و رقم کسلت (از زیرگونه ایندیکا) و نحوه آشکارسازی آن‌ها با استفاده از سیستم آغازگر اختصاصی آلل (ASO). محل آغازگرها بر روی هر اکسشن نشان داده شده است

Fig. 2: Top: result of multiple alignment between *Ehd1*- carrying accessions in which the position of two adjacent SNPs is depicted by a rectangular. Bottom: schematic representation of two adjacent SNPs in *Ehd1* gene between Niponbare (japonica subspecies) and Kasalath (indica subspecies) cultivars and their displaying system using allele-specific oligonucleotide primers. Positions of primers on each accession are shown

هم‌ردیف‌سازی ژن *Ehd3*

توالی‌های رقم توهوکو IL9 از زیرگونه ژاپونیکا (AB517626) و لاین موتانت آن (AB517627) هم‌ردیف‌سازی شدند که نتیجه آن شناسایی یک ناحیه InDel کوچک به طول ۱۱ نوکلئوتید در موقعیت ۳۹۷۷-۳۹۶۷ بود (شکل ۳ بالا). یک آغازگر ASO اختصاصی آلل طبیعی و یک آغازگر مشترک در پایین دست طراحی شد تا فقط آلل طبیعی (W) به طول حدود ۱۶۰۰ جفت باز تکثیر شود (شکل ۳ پایین). وجود باند نشان‌دهنده آلل طبیعی (W) و عدم وجود باند نشان‌دهنده آلل موتانت (M) می‌باشد.



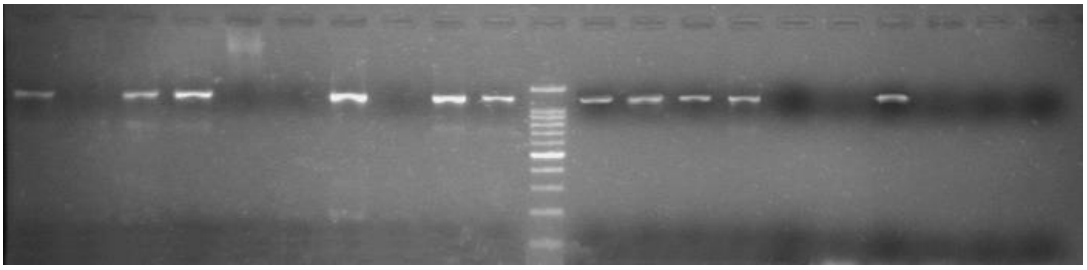
شکل ۳: بالا: نتیجه هم‌ردیف‌سازی چندگانه بین اکسشن‌های حامل ژن *Ehd3* که در آن محل ناحیه *InDel* با یک مستطیل مشخص شده است. پایین: طرح شماتیک یک ناحیه *InDel* در ژن *Ehd3* بین رقم توهوکو IL9 (از زیرگونه ژاپونیکا) و لاین جهش یافته آن و نحوه آشکارسازی این چندشکلی با استفاده از سیستم آغازگر اختصاصی آلل (ASO). محل آغازگرها بر روی هر اکسشن نشان داده شده است

Fig. 3: Top: result of multiple alignment between *Ehd3*- carrying accessions in which the position of an *InDel* region is depicted by a rectangular. Bottom: schematic representation of an *InDel* region in *Ehd3* gene between Tohoko Il9 (japonica subspecies) and its mutant line and their displaying system using allele-specific oligonucleotide primers. Positions of primers on each accession are shown.

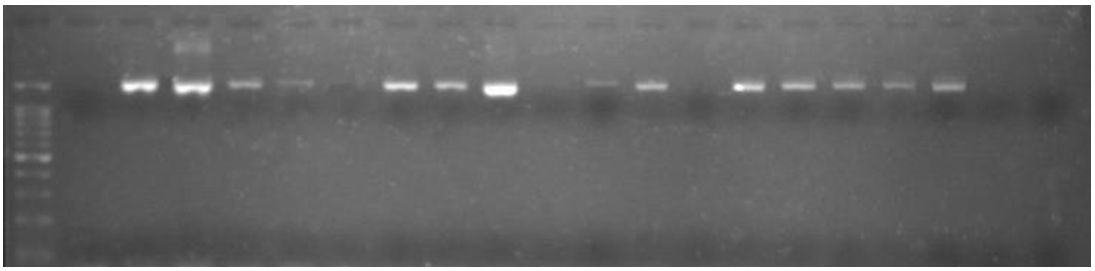
چندشکلی و فراوانی آللی ژن‌های مورد مطالعه

آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن *Ehd1* DNA ارقام مختلف را تکثیر کرده و تولید نشانگر غالب نمود. قطعات تکثیر یافته در حدود اندازه‌های مورد انتظار بودند که نمونه‌ای از الگوی باندهی آن‌ها در شکل ۴ نشان شده است. در مجموع، ۳۰ رقم (۶۶/۷ درصد) آلل I و ۱۵ رقم (۳۳/۳ درصد) آلل J را نشان دادند.

آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن *Ehd3* نیز DNA ارقام مختلف را تکثیر کرده و تولید نشانگر غالب نمودند. قطعات تکثیر یافته در حدود اندازه‌های مورد انتظار بودند که نمونه‌ای از الگوی باندهی آن‌ها در شکل ۵ نشان شده است. در مجموع، ۲۶ رقم (۵۷/۸ درصد) آلل موتانت (M) و ۱۹ رقم (۴۲/۲ درصد) آلل طبیعی (W) را نشان دادند.



شکل ۴: الگوی باندهی نشانگر اختصاصی ژن *Ehd1*
Fig. 4: Banding pattern of *Ehd1*-specific marker



شکل ۵: الگوی باندهی نشانگر اختصاصی ژن *Ehd3*
Fig. 5: Banding pattern of *Ehd3*-specific marker

اثر ژن‌های مورد مطالعه بر زمان خوشه‌دهی

اثر ژن *Ehd1*

در کل جمعیت، میانگین ارقام واجد آلل J معادل ۹۱/۵ و میانگین ارقام واجد آلل I معادل ۸۴/۷ روز محاسبه گردید (جدول ۶).

تجزیه ارتباط نشان داد که ژن *Eh1* ۱۲/۱ درصد از تغییرات زمان خوشه‌دهی ارقام مورد مطالعه را توجیه می‌نماید و متوسط اثر افزایشی آن معادل ۳/۴ روز برآورد شد. اما آنالیز ارتباط نشان داد که اثر ژن *Ehd1* در توجیه تغییرات زمان خوشه‌دهی هیچ یک از دو گروه ارقام اصلاح شده و محلی معنی‌دار نبود (جدول ۶).

جدول ۶: اثر ژن *Ehd1* بر زمان خوشه‌دهی
Table 6: Effect of *Ehd1* gene on heading date

	میانگین آلل J J allele mean	میانگین آلل I I allele mean	اثر افزایشی (روز) Additive effect (days)	ضریب تبیین (R^2)
کل Total	91.47	84.73	3.37	0.121^{**}
ارقام اصلاح شده Improved cultivars	92.92	91.43	0.74	0.011^{ns}
ارقام محلی Local cultivars	85.67	82.70	1.48	0.021^{ns}

ns و **: به‌ترتیب نشان‌دهنده غیرمعنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد می‌باشد
ns and **: Indicating non-significant and significant differences at 1% level

اثر ژن *Ehd3*

در کل جمعیت میانگین ارقام واجد آلل طبیعی ژن *Ehd3* (آلل W) معادل ۸۹/۵ و میانگین ارقام واجد آلل موتانت (آلل M) معادل ۸۵/۲ روز محاسبه گردید (جدول ۷). تجزیه ارتباط نشان داد که ژن *Ehd3* ۵/۴ درصد از تغییرات زمان خوشه‌دهی ارقام مورد مطالعه را توجیه می‌نماید. متوسط اثر افزایشی این ژن معادل ۲/۲ روز برآورد شد.

جدول ۷: اثر ژن *Ehd3* بر زمان خوشه‌دهی
Table 7: Effect of *Ehd3* gene on heading date

	میانگین آلل طبیعی W allele mean	میانگین آلل موتانت M allele mean	اثر افزایشی (روز) Additive effect (days)	ضریب تبیین (R^2)
کل Total	89.47	85.15	2.16	0.054*
ارقام اصلاح شده Improved cultivars	93.10	91.56	0.77	0.013ns
ارقام محلی Local cultivars	85.44	81.76	1.84	0.039*

ns و *: به‌ترتیب نشان‌دهنده غیرمعنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد می‌باشد
ns and **: Indicating non-significant and significant differences at 1% level

در گروه ارقام اصلاح شده میانگین ارقام واجد آلل طبیعی (W) و موتانت (M) به‌ترتیب معادل ۹۳/۱ و ۹۱/۶ روز محاسبه گردید (جدول ۷). آنالیز ارتباط نشان داد که اثر ژن *Ehd3* در توجیه تغییرات زمان خوشه‌دهی ارقام اصلاح شده معنی‌دار نمی‌باشد. اما در گروه ارقام محلی میانگین ارقام واجد آلل‌های فوق به ترتیب معادل ۸۵/۴ و ۸۱/۸ روز محاسبه گردید. آنالیز ارتباط نشان داد که ژن *Ehd3* تنها حدود ۴ درصد از تغییرات زمان خوشه‌دهی ارقام محلی را توجیه می‌نماید و اثر افزایشی این ژن معادل ۱/۸ روز برآورد شد.

بحث

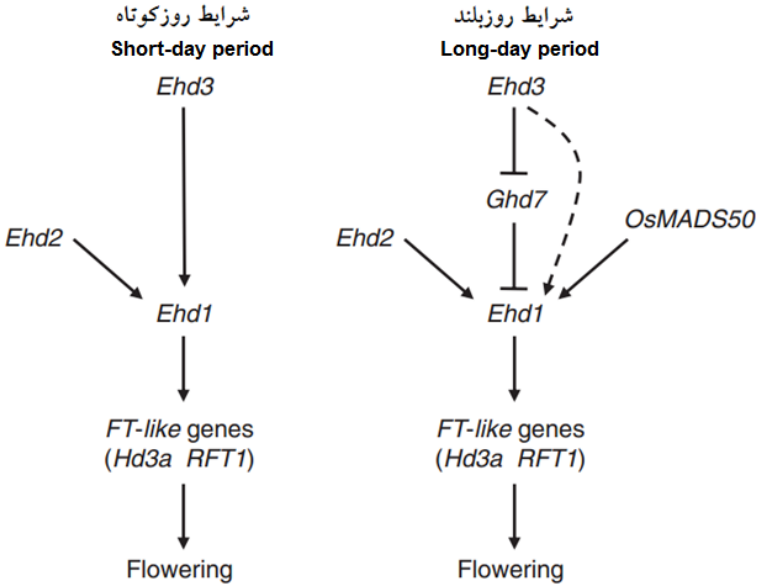
زمان خوشه‌دهی یک صفت پیچیده است که به‌وسیله فاکتورهای ژنتیکی متعدد و اپی‌ژنیک کنترل می‌شود. فاکتورهای محیطی زیادی از قبیل طول روز، درجه حرارت، شدت تابش و مواد غذایی تاریخ خوشه‌دهی در برنج را کنترل می‌کنند. همان‌گونه که در بخش نتایج (جدول ۲) ملاحظه شد تفاوت زودرس‌ترین و دیررس‌ترین رقم در این تحقیق بیش از ۴۰ روز بود که این نتیجه نشان‌دهنده وجود تنوع کافی در بین ارقام مورد مطالعه می‌باشد. طبق نظر *ایزاوا* (2007) تنوع زیادی در زمان گل‌دهی ارقام برنج وجود دارد و تجزیه توالی ژن‌های زمان گل‌دهی نشان داده که تفاوت‌های آللی منشأ اصلی این تنوع می‌باشند *زو* و همکاران، 2008؛ *یانو* و همکاران؛ *تاکاهاشی* و همکاران؛ *وی* و همکاران؛ *ابانا* و همکاران (Yano *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2010; Ebana *et al.*, 2011). لزوم سازگار شدن دستگاه پاسخ به فتوپریود با شرایط فتوپریودی مختلف موجب ایجاد تنوع فنوتیپی در میان واریته‌های برنج زراعی شده است و شواهد مولکولی نشان می‌دهد که انتخاب فرم‌های آللی مختلف در لوکوس‌های مربوط به زمان گل‌دهی (از جمله *Ghd7*، *Hd1* و *Ehd1*) علت این تنوع می‌باشد (*گائو* و همکاران، 2013).

استفاده از ابزار بیوانفورماتیک به شناسایی تنوع توالی ژن‌های مورد مطالعه کمک شایانی می‌نماید. یکی از روش‌های شناسایی این تنوع در سطح ابزاری، نرم‌افزارهای قدرتمند هم‌ردیف‌سازی توالی‌های ژنی موردنظر و جستجوی چندشکلی‌های مختلف شامل حذف‌ها، اضافه‌شدگی‌ها و جایگزینی‌های نوکلئوتیدی می‌باشد. نتایج تجزیه‌های بیوانفورماتیک و هم‌ردیف‌سازی اکسشن‌های حامل ژن‌های مورد مطالعه نشان داد که در دو ژن فوق تعدادی SNP و یا InDel وجود دارد (شکل‌های ۲ و ۳). این تفاوت‌ها امکان طراحی آغازگرهای PCR مناسب جهت تکثیر قطعات ژنی و ردیابی تنوع آللی را فراهم نمود به‌طوری‌که آغازگرهای اختصاصی این ژن‌ها مطابق انتظار تولید الگوی نشانگری غالب نمودند. این موجب شد تا بررسی چندشکلی‌های ژنی و SNPهای مورد انتظار به راحتی در سیستم ژل آگارز میسر باشد (شکل‌های ۴ و ۵). از مزایای آشکارسازی SNPها دو آللی بودن و راحتی آشکارسازی آن‌ها با تجهیزات ارزان قیمت می‌باشد (*گاریس* و همکاران، 2005؛ *مایلز* و همکاران، 2009). نتایج این تحقیق نشان داد که آغازگرهای مبتنی بر تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی (SNPها) در ژن‌های مورد مطالعه توانستند به‌طور اختصاصی منطقه هدف را تکثیر نموده و چندشکلی بین ارقام برنج را آشکار نمایند. بنابراین نشانگرهای توسعه یافته را

می‌توان نشانگر تکثیر آلل اختصاصی (Allele-Specific Amplification; ASA) تلقی کرد. مطالعات زیادی در گذشته با استفاده چنین نشانگرهایی هم در جانوران و هم در گیاهان جهت اهداف خاص توسعه یافته است *سلیمانی* و همکاران؛ *لیو و سامر*؛ *لافرامبویس* و همکاران؛ *احمدی خواه* و همکاران؛ *احمدی خواه و ایران نژاد*؛ *گعفر*؛ *هیرتسو* و همکاران (Soleimani *et al.*, 2003; Liu and Sommer, 2004; LaFramboise *et al.*, 2005; Ahmadikhah *et al.*, 2010; Ahmadikhah and Irannejad, 2010; Gaafar, 2010; Hirotsu *et al.*, 2010). با توجه به اتمام پروژه توالی ژنوم برنج *گوف* و همکاران (Goff *et al.*, 2002) و همچنین با ثبت شکل‌های آللی جدید از ژن‌های مختلف در بانک ژن جهانی در سراسر دنیا (www.ncbi.nlm.nih.gov)، استفاده از نشانگرهای ASA تبدیل به ابزار مفیدی جهت تجزیه فراوانی‌های آللی ژن‌های کاندید و بررسی اثر آن‌ها بر تغییرات فنوتیپی صفات مورد مطالعه و همچنین استفاده از آن‌ها در مطالعات ارتباط شده است.

تجزیه ارتباط در جمعیت مورد مطالعه نشان داد که ژن *Ehd1* تأثیر بیشتری بر زمان خوشه‌دهی ارقام مورد مطالعه داشت، درحالی‌که اثر ژن *Ehd3* بیش از دو برابر کمتر از ژن *Ehd1* برآورد شد (۵/۴ درصد در مقابل ۱۲/۱ درصد). مطالعات اخیر نیز نشان داده که موتانت *ehd3* اثر کوچکی بر زمان گل‌دهی در شرایط روزکوتاه دارد (*ماتسوبارا* و همکاران، 2011). تجزیه رگرسیون نشان می‌دهد که اثر هم‌زمان این دو ژن بر زمان خوشه‌دهی معادل ۱۳/۶ درصد می‌باشد (*Ehd3*+1.18 *Ehd1*+2.93=84.03زمان خوشه‌دهی). این نشان‌دهنده دخالت تعدادی ژن دیگر غیر از این ژن‌ها در کنترل زمان گل‌دهی و حالت توارث کمّی زمان خوشه‌دهی در برنج می‌باشد *یانو* و همکاران؛ *وی* و همکاران، 2010 (Yano *et al.*, 2000).

نتایج مطالعات *دوئی* و همکاران (2004) نشان داده که *Ehd1* مستقل از *Hd1* گل‌دهی را در برنج تحریک می‌کند و mRNA ژن *Ehd1* تنها تحت شرایط روزکوتاهی القاء می‌شود. تنظیم دقیق *Ehd1* برای گل‌دهی به موقع بسیار مهم است و چندین ژن در تنظیم بیان آن نقش دارند. آنالیز بیان ژن‌های دخیل در گل‌دهی حاکی از افزایش رونویسی *Ghd7* در شرایط روزبلند و کاهش بیان ژن‌های پایین دست آن (*Ehd1* و *Hd3a*) در موتانت *ehd3* می‌باشد که نشان می‌دهد ژن *Ehd3* طبعاً به‌عنوان بازدارنده بیان *Ghd7* در شرایط روزبلند عمل می‌کند. مطالعات *ماتسوبارا* و همکاران (2011) نشان داده که *Ehd3* در شرایط روزبلند در مسیر *Ehd3-Ghd7-Ehd1-Hd3a* و در شرایط روزکوتاه در مسیر *Ehd3-Ehd1-Hd3a* بر گل‌دهی فتوپریودی برنج اثر می‌گذارد (شکل ۶). همان‌گونه که در شکل ۶ ملاحظه می‌شود، *Ehd3* در شرایط روزکوتاهی مستقل از *Ghd7* بیان *Ehd1* را تحریک می‌نماید که این نشان‌دهنده مکانیزم دوگانه *Ehd3* در القای گل‌دهی می‌باشد.



شکل ۶: طرح شماتیک عمل ژن‌های *Ehd3* و *Ehd1* در شبکه ژنی تنظیمی در مسیر گل‌دهی فتوپریودی برنج (اقتباس از *ماتسوبارا* و همکاران، 2011)

Fig. 6: Schematic representation of action of *Ehd3* and *Ehd1* genes in regulatory gene network in rice photoperiodic flowering pathway (Adopted from Matsubara *et al.*, 2011)

پس از گروه‌بندی جمعیت به دو زیرگروه ارقام اصلاح شده و محلی، تجزیه ارتباط نشان داد که اثر ژن *Ehd1* بر زمان خوشه‌دهیِ هیچ یک از دو گروه ارقام محلی یا اصلاح شده قابل توجه نبود و تنها اثر ژن *Ehd3* بر زمان خوشه‌دهی ارقام محلی (حدود ۴ درصد) معنی‌دار بود. این نشان می‌دهد که تنوع مشاهده شده بین ارقام در ژن *Ehd1* ارتباطی با نحوه تکامل آن‌ها در شرایط انتخاب مصنوعی (انتخاب سازگارکننده به‌وسیله کشاورزان یا انتخاب برای عملکرد بالاتر به‌وسیله به‌نژادگران) نداشته است. این درحالی است که انتخاب مصنوعی فرم‌های آللی ژن‌ها برای تطابق با محیط‌های زراعی متنوع ضرورت دارد *زو* و همکاران، 2008؛ *هوانگ* و همکاران (Huang *et al.*, 2012). این بدان مفهوم است که انتخاب‌ها باید آگاهانه صورت گیرد، یعنی اگر به‌نژادگر بخواهد ارقام زودرسی را با ترکیبات آللی دو ژن مورد بحث اصلاح نماید، باید پس از برآورد اثر هر یک از فرم‌های آللی، فنوتیپ مورد انتظار را با فنوتیپ مشاهده شده تطابق دهد تا به نتایج مطلوب دست یابد. به‌طور مثال، ترکیب آلل ایندیکای ژن *Ehd1* با آلل موتانت ژن *Ehd3* ($Ehd1^I/Ehd3^M$) طبق انتظار می‌بایست حدود ۴/۱ روز زودرسی نشان می‌داد، درحالی‌که در عمل خیلی کمتر از این مقدار (یعنی ۱/۳ روز) زودرس شده است (جدول ۸). در عوض به‌طور غیرقابل انتظاری ترکیب این آلل با آلل طبیعی ژن *Ehd3* ($Ehd1^I/Ehd3^W$) زودرسی نشان داده است (۲/۷ روز). علت این امر، وجود ژن‌های دیگری است که در این مسیر ژنی و حتی در مسیر(های) ژنی دیگر دخالت دارند و ممکن است با یکدیگر بر هم‌کنش نمایند. بنابراین، به‌نژادگر تنها با تکیه بر دو ژن *Ehd1* و *Ehd3* نمی‌تواند برای اصلاح زودرسی در برنج اقدام نماید و باید به تأثیر سایر ژن‌های دخیل در این مسیر و هم‌چنین مسیر(های) دیگر توجه داشته باشد.

جدول ۸: اثرات مشاهده شده و مورد انتظار (اعداد داخل پرانتز) برای ترکیبات جفتی آلل‌های دو ژن *Ehd1* و *Ehd3* (بر حسب روز)
Table 8: Observed and expected (in parenthesis) effects of paired combinations of alleles of *Ehd1* and *Ehd3* genes (days)

	$Ehd1^I$	$Ehd1^J$
$Ehd3^W$	-2.7 (-1.7)	1.6 (4.1)
$Ehd3^M$	-1.3 (-4.1)	5.9 (1.7)

سپاس‌گزاری

هزینه‌های انجام این تحقیق از محل کمک به پایان‌نامه‌های کارشناسی‌ارشد توسط دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تأمین شده است. از دانشگاه زنجان به خاطر اجرای آزمایشات مولکولی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی دانشکده کشاورزی تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۵-۷ متن انگلیسی مراجعه شود.