بررسی ارتباط ژن‌های *Hd5* و *Hd6* با زمان خوشه‌دهی در ارقام محلی و اصلاح شده برنج

Assessment of Relationship of *Hd5* and *Hd6* with Heading Date in Local and Improved Rice Cultivars

لیلا نیری‌پسند[۱]، نادعلی بابائیان جلودار[۲]، قربانعلی نعمت‌زاده[۲]، اسدالله احمدی‌خواه[۳]* و محمدرضا عظیمی مقدم[۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۷/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۹

چکیده

در این تحقیق ارتباط SNP عملکردی ژن‌های *Hd5* و *Hd6* با زمان خوشه‌دهی در برنج مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌منظور ۴۵ رقم برنج محلی و اصلاح شده در شرایط آب‌وهوایی گرگان مورد ارزیابی فنوتیپی قرار گرفتند و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی دو ژن فوق تعیین ژنوتیپ شدند. تجزیه ارتباط در کل جمعیت مورد مطالعه نشان داد که SNP ژن *Hd5* ۴/۸ درصد از تغییرات زمان خوشه‌دهی را توجیه نمود و اثر افزایشی آن در جهت دیررسی معادل ۲/۶ روز برآورد شد. ولی SNP ژن *Hd6* ۵/۵ درصد از تغییرات زمان خوشه‌دهی را توجیه نمود و اثر افزایشی آن در جهت زودرسی معادل ۲/۴- روز برآورد شد. پس از تفکیک جمعیت به دو گروه ارقام اصلاح شده و محلی تجزیه ارتباط نشان داد که اثر SNP ژن *Hd5* بر زمان خوشه‌دهی ارقام اصلاح شده غیرمعنی‌دار بود. اما در گروه ارقام محلی این SNP بخش نسبتاً بالایی (۱۶/۲ درصد) از تغییرات زمان خوشه‌دهی را توجیه نمود و اثر افزایشی آن در جهت دیررسی معادل ۴/۴ روز برآورد شد. اثر SNP ژن *Hd6* بر زمان خوشه‌دهی ارقام محلی معنی‌دار نبود، ولی در گروه ارقام اصلاح شده این SNP بخش نسبتاً بالایی (۱۷/۶ درصد) از تغییرات زمان خوشه‌دهی را توجیه نمود و اثر افزایشی آن در جهت زودرسی معادل ۳/۸- روز برآورد گردید. براساس نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری نمود که اصلاح ارقامی با آلل‌های زودرس‌کننده ژن‌های *Hd5* و *Hd6* امکان‌پذیر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آغازگر اختصاصی آلل، ژنوتیپ‌یابی، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، مکان‌یابی

---

۱ و ۲. به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد و استادان گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

۳. دانشیار گروه زیست فناوری، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران

۴. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

*: نویسنده مسوول Email: ahmadikhah_a@sbu.ac.ir

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری می‌باشد.

مقدمه

از زمان آغاز کشاورزی بشر اقدام به انتخاب صفاتی در گیاهان نمود که به تطابق بهتر آن‌ها با سیستم‌های کاشت کمک نماید. البته تکثیر انواع خاص گیاهان با انتخاب تکراری در طی زمان موجب محدود شدن پایه ژنتیکی آن‌ها و در نتیجه منجر به یکنواختی محصولات زراعی گردید و صفات مطلوب را در ژرم‌پلاسم زراعی تثبیت کرد. چنین صفاتی در محصولات زراعی غالباً به‌وسیله ژن‌هایی موسوم به ژن‌های اهلی شدن ایجاد می‌شوند که ارقام زراعی را از اجداد وحشی‌شان تفکیک می‌کنند *بروکز* و همکاران (Brooks *et al.*, 2008). ازجمله این صفات می‌توان به زمان گل‌دهی اشاره کرد. بسیاری از گونه‌های گیاهی توانایی آغاز گل‌دهی را درست در زمانی که بهترین شرایط برای تولید مثل آن‌ها فراهم است دارند و این توانایی عمدتاً به اندازه‌گیری دقیق تغییرات فصلی طول روز و درجه حرارت بستگی دارد *توماس و وینس-پیور*؛ *هایاما* و همکاران (Thomas and Vince-Pure, 1997; Hayama *et al.*, 2003). بنابراین، حساسیت به فتوپریود عامل مهمی برای اندازه‌گیری طول بحرانی روز و تعیین زمان گل‌دهی در گیاهان می‌باشد. تغییر حساسیت به فتوپریود زمان گل‌دهی را تغییر داده و می‌تواند سازگاری به شرایط اقلیمی محلی را در بسیاری از گونه‌های گیاهی بهبود بخشد *جونگ و مولر* (Jung and Muller, 2009). حساسیت به فتوپریود نقش مهمی در گسترش دامنه کاشت گیاهان به عرض‌های جغرافیایی بالا در ذرت *گوئسنارد* و همکاران (Gouesnard *et al.*, 2002)، *جو ترنر* و همکاران؛ *زاخرابکووا* و همکاران (Turner *et al.*, 2005; Zakhrabekova *et al.*, 2012)، سورگوم *مورفی* و همکاران (Murphy *et al.*, 2011) و برنج *فوجینو و سکیگوچی*؛ *ایزاوا*؛ *زو* و همکاران (Fujino and Sekiguchi, 2005; Izawa, 2007; Xue *et al.*, 2008) ایفا کرده است. دلیل این گسترش نیاز به خوشه‌دهی زودهنگام و تکمیل رسیدن بذر برای تطابق با دوره زمانی شرایط اقلیمی مطلوب بوده است.

تعداد زیادی ژن که در کنترل زمان گل‌دهی نقش دارند شناسایی شده‌اند و مسیرهای ژنتیک مولکولی آن‌ها به‌خوبی در آرابیدوپسیس و برنج تشریح شده است *سیمپسون و دین*؛ *هایاما و کوپلند*؛ *تسوجی* و همکاران (Simpson and Dean, 2002; Hayama and Coupland, 2004; Tsuji *et al.*, 2011). مسیرهای فتوپریودی و ساعت شبانه‌روزی از طریق شبکه تنظیمی دقیقی در سطح بیان ژن و هم‌چنین در سطح پس از رونویسی کنترل می‌شوند *تسوجی* و همکاران، 2011؛ *ایزاوا*، 2007؛ *ایتو* و همکاران (Itoh *et al.*, 2010). برای مثال، فسفریلاسیون پروتئین‌های ساعت شبانه‌روزی نقش اساسی در تولید ضرباهنگ شبانه‌روزی مناسب در آرابیدوپسیس ایفا می‌کند *سوگانو* و همکاران (Sugano *et al.*, 1999). پروتئین CCA1 به‌عنوان جزء مرکزی ساعت شبانه‌روزی به‌وسیله کیناز رمز شده توسط CK2 فسفریله می‌شود و باعث می‌شود که این پروتئین در آرابیدوپسیس خاصیت اتصال به DNA پیدا کند *دنیل* و همکاران (Daniel *et al.*, 2004). پروتئین رمز شده به‌وسیله ژن *Hd6* که همولوگ زیرواحد آلفای CK2 در برنج می‌باشد، کارکرد بازدارندگی ژن *Hd1* را در شرایط روزبلندی از طریق فسفریله‌کردن پروتئین رمز شده به‌وسیله یک ژن ناشناخته افزایش می‌دهد *اوگیسو* و همکاران (Ogiso *et al.*, 2010). *DTH8* واقع بر کروموزوم ۸ برنج (که در پایگاه داده به‌عنوان *Hd5* ثبت شده است) با تأثیر منفی بر بیان ژن‌های *Ehd1* و *Hd3a* در شرایط روزبلندی موجب تأخیر در زمان گل‌دهی می‌شود؛ اما در شرایط روزکوتاهی بر بیان ژن *Hd3a* و زمان گل‌دهی تأثیری ندارد *وی* و همکاران (Wei *et al.*, 2010).

تنوع زیادی در زمان گل‌دهی ارقام برنج وجود دارد *ایزاوا* (2007) و تجزیه توالی ژن‌های زمان گل‌دهی نشان داده که تفاوت‌های آللی منشأ اصلی این تنوع می‌باشند *زو* و همکاران، 2008؛ *وی* و همکاران، 2010؛ *یانو* و همکاران؛ *تاکاهاشی* و همکاران؛ *ابانا* و همکاران (Yano *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2009; Ebana *et al.*, 2011). برای مثال، مشخص شده که ارقام زیرگونه ژاپونیکا از نظر ژن‌های مؤثر بر زمان گل‌دهی شامل *Hd1*، *Ghd7*، *Hd6*، *Hd5* (*DTH8*)، *Hd2* و *Hd17* تنوع آللی دارند *فوجینو* و *سکیگوچی*، 2005؛ *ابانا* و همکاران، 2011؛ *شیبایا* و همکاران؛ *ماتسوبارا* و همکاران (Shibaya *et al.*, 2011; Matsubara *et al.*, 2012).

استفاده عملی از ژن‌های جدا شده در برنامه‌های اصلاحی مستلزم تایید مجدد و برآورد اثر آن ژن‌ها در ارقام محلی یا اصلاح شده موجود می‌باشد. بدین‌منظور، در این تحقیق اثر SNP عملکردی ژن‌های *Hd5* و *Hd6* بر زمان خوشه‌دهی ارقام برنج محلی و اصلاح شده کشور مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق طی سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۲ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (ارزیابی فنوتیپی) و دانشگاه زنجان (آزمایشات مولکولی) انجام شد. تعداد ۴۵ رقم برنج [در دو گروه اصلاح شده (۱۹ رقم) و محلی (۲۶ رقم)؛ 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.

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 Variety	گروه Group	ردیف Row	نام رقم Variety	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 AbjiBoji	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 Chapa	محلی Local
9	صدری Sadri	محلی Local	32	IR58025	اصلاح شده Improved
10	IR66232	اصلاح شده Improved	33	بجار Bjar	محلی Local
11	سنگ طارم Sange Tarom	محلی Local	34	اوندا Avanda	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 Kados	اصلاح شده Improved	37	دشت Dasht	محلی Local
15	خزر Khazar	اصلاح شده Improved	38	قشنگه Gheshange	محلی Local
16	سنگ جو Sage Jo	محلی Local	39	سالاری Salari	محلی Local
17	نعمت Nemat	اصلاح شده Improved	40	دیلمانی Deilamani	محلی Local
18	دم زرد Domzard	محلی Local	41	طارم محلی Local Tarom	محلی Local
19	حسنی Hasani	محلی Local	42	عنبربوی ایلام Anbarboo Ilam	محلی Local
20	هاشمی Hashemi	محلی Local	43	اهلمی طارم Ahlami Tarom	محلی Local
21	محمدی چپرسر Mohamdi Chaparsar	محلی Local	44	میر طارم Mir Tarom	محلی Local
22	صالح Saleh	اصلاح شده Improved	45	دمسیاه Domsia	محلی Local
23	عنبربو Anbarboo	محلی Local			

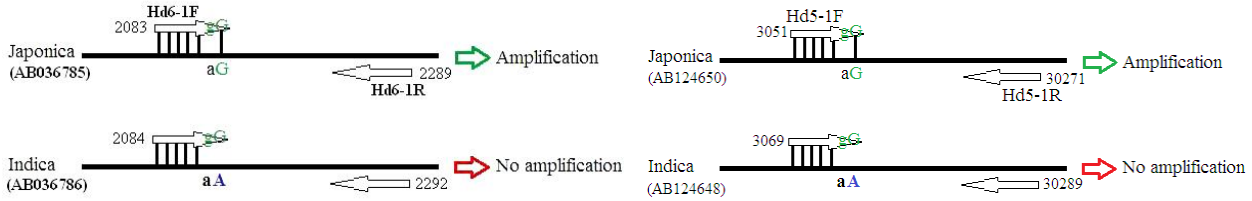
استخراج DNA از گیاهچه‌های ۷ روزه هر یک از ارقام به روش CTAB با اندکی تغییرات *احمدی‌خواه* (Ahmadikhah, 2009) انجام شد. کیفیت DNA به‌وسیله الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیین شد. کمّیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت هر نمونه در حد ۱۰۰ نانوگرم 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 (برای ژن *Hd5*) یا ۵۸°C (برای ژن *Hd6*) بمدت ۴۵ ثانیه، ۷۲°C به‌مدت ۴۰ 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.

طراحی آغازگرهای اختصاصی

برای ژن *Hd5* توالی‌های دو رقم نیپون‌بار از زیرگونه ژاپونیکا (AB124650) و رقم کَسَلَت از زیرگونه ایندیکا (AB124648) با نرم‌افزار ClustalW هم‌ردیف‌سازی شدند. انتهای `۳ آغازگر پیشرو در محل SNP بین رقم نیپون‌بار (G) و کَسَلَت (A) قرار داده شد تا فقط آلل ژاپونیکا (G) تکثیر گردد (شکل ۱ راست). برای ژن *Hd6* نیز توالی‌های دو رقم نیپون‌بار (AB036785) و کَسَلَت (AB036786) همردیف‌سازی شدند. انتهای `۳ آغازگر پیشرو در محل SNP بین رقم نیپون‌بار (G) و کَسَلَت (A) قرار داده شد تا فقط آلل ژاپونیکا (G) تکثیر شود (شکل ۱ چپ). طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer3.0 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3.0) انجام شد. در مورد هر دو ژن، وجود باند نشان‌دهنده وجود آلل نیپون‌بار و عدم‌وجود باند نشان‌دهنده وجود آلل کسلت می‌باشد. از آن‌جاکه ترکیب‌های آغازگری مورد استفاده تولید الگوی باندهی غالب می‌نمایند، بنابراین امتیازهای ارقام به‌صورت صفر (نبود باند) و ۱ (وجود باند) لحاظ گردید. جهت اطمینان از صحت DNAی استخراجی ارقام مورد مطالعه، از تکثیر با نشانگر هم‌بارز *Hd1* نیز استفاده شد *نیری‌پسند* و همکاران (Nayyeripasand *et al.*, 2013).



شکل ۱: طرح شماتیک تفاوت تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژن‌های *Hd5* (راست) و *Hd6* (چپ) بین رقم نیپون‌بار (از زیرگونه ژاپونیکا؛ G) و رقم کسلت (از زیرگونه ایندیکا؛ A) و نحوه آشکارسازی آن‌ها با استفاده از سیستم آغازگر آلل اختصاصی. محل آغازگرها بر روی هر اکسشن نشان داده شده است. آغازگر معکوس بین هر دو اکسشن حفاظت شده است اما آغازگر پیشرو به سبب این‌که در انتهای `۳ خود تنها یک نوکلئوتید (SNP) با آلل G ناجورجفتی دارد قادر به اتصال در شرایط PCR بوده و آن را تکثیر می‌کند. اما این آغازگر به سبب داشتن دو نوکلئوتید تفاوت با آلل A در انتهای `۳ قادر به اتصال در شرایط PCR نبوده و آنرا تکثیر نمی‌کند.

Fig. 1: Schematic design of single nucleotide polymorphism (SNP) in *Hd5* (right) and *Hd6* (left) genes between Niponbare (subsp. Japonica; G) and Kasalath (subsp. Indica; A) and their detection method using allele specific primer. Primer positions on each accession were marked. Reverse primer is conserved among both accessions, but forward primer can anneal and amplify G allele in PCR condition because of only one nucleotide mismatch with G allele at 3` end. However, the primer can't anneal and amplify A allele because of two nucleotide mismatch at 3` end

جدول ۲: آغازگرهای استفاده شده برای تولید نشانگرهای اختصاصی ژن‌های *Hd5* و *Hd6*

Table 2: Primer pairs used for producing *Hd5*- and *Hd6*-specific markers

نام آغازگر Primer	توالی (5' ……3') Sequence (5'……..3')	دمای ذوب (°C) Tm (°C)	اندازه باند مورد انتظار (جفت باز) Expected band size (bp)	SNP ردیابی شونده Targeted SNP
Hd5-1F	CAAAAGTGCTGAAAACCAAGAGG	61	212	G/A
Hd5-1R	GAACACCAGGGCAGCTGTC	63		
Hd6-1F	TCATGCTACCTAGATGACGG	58	250	G/A
Hd6-1R	AGCTACATATTGTTCATCTCTTC	57		

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای داده‌های فنوتیپی مقادیر آماره‌های مختلف از قبیل میانگین، انحراف معیار (SD)، حداقل و حداکثر با استفاده از نرم‌افزار SPSS *کینیر و کولین* (Kinnear and Colin, 2000) محاسبه گردید. برای داده‌های مولکولی مقادیر پارامترهایی مانند اثر افزایشی و ضریب تبیین با استفاده از نرم‌افزار QTL cartographer 2.5 *ونگ* و همکاران (Wang *et al.*, 2005) محاسبه گردید.

نتایج

مطالعات فنوتیپی

آماره‌های مرتبط با زمان خوشه‌دهی در کل جمعیت و دو گروه ارقام اصلاح شده و محلی در جدول ۳ آورده شده است. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود، زودرس‌ترین رقم (۶۸ روز) و دیررس‌ترین رقم (۱۰۹ روز) هر دو متعلق به گروه ارقام محلی است و تنوع بیشتری در بین ارقام محلی وجود دارد (انحراف معیار = ۸/۸۷)؛ درحالی‌که زودرس‌ترین و دیررس‌ترین رقم در گروه ارقام اصلاح شده به‌ترتیب در ۷۸ و ۱۰۷ روز به خوشه رفتند. متوسط تفاوت زمان خوشه‌دهی ارقام اصلاح شده با ارقام محلی بیش از ۸ روز و معنی‌دار بود.

جدول ۳: آماره‌های مرتبط با زمان خوشه‌دهی ارقام اصلاح شده و محلی برنج

Table 3: Statistics related to heading date of improved and local rice cultivars

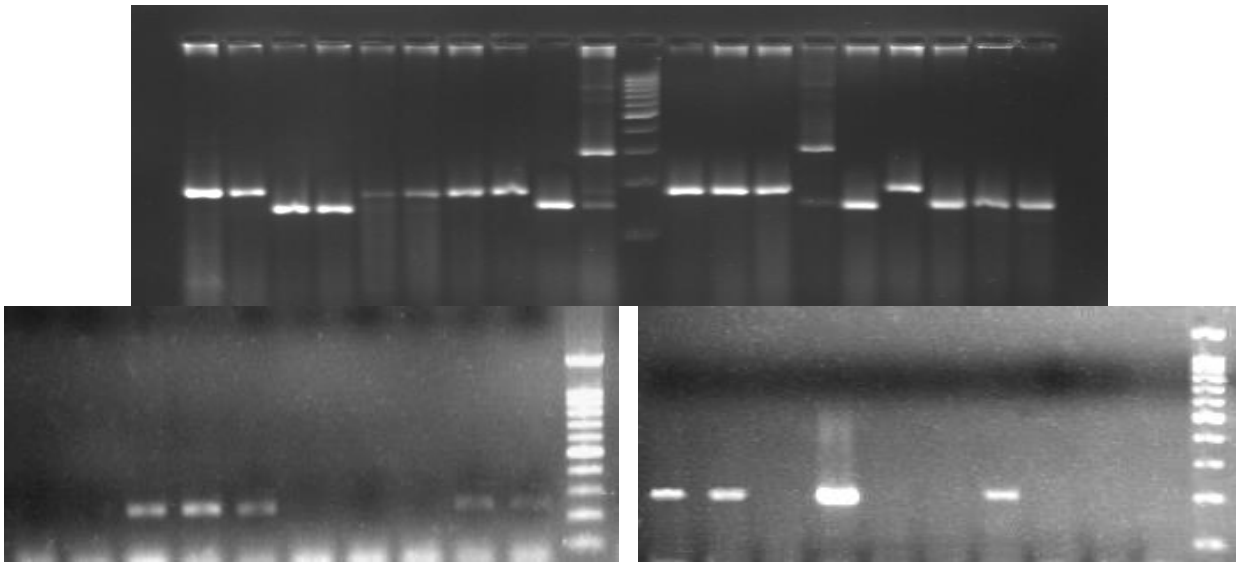
گروه Group	میانگین (روز) Mean (days)	انحراف معیار SD	حداقل Minimum	حداکثر Maximum
ارقام اصلاح شده Improved varieties	92.37**	6.75	78	107
ارقام محلی Local varieties	84.04	8.87	68	109
کل Total	86.98	9.22		

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

**: Showing significant difference of improved and local varieties means in t-test at 1% level of probability

تأیید کارآیی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های مورد مطالعه

با توجه به غالب بودن سیستم نشانگری مورد استفاده، جهت اطمینان از کیفیت DNAی الگو، از تکثیر با نشانگر هم‌بارز *Hd1* استفاده شد که به‌خوبی توانست DNAی همه ارقام مورد مطالعه را تکثیر نماید (شکل ۲ بالا). آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن‌های *Hd5* و *Hd6* نیز DNA ارقام مختلف را تکثیر نمود و قطعات تکثیر یافته در حدود اندازه‌های مورد انتظار بودند که نمونه‌ای از الگوی باندهی آن‌ها در شکل ۲ نشان شده است. در مجموع، ۸ رقم آلل G و ۳۷ رقم آلل A از ژن *Hd5* را نشان دادند؛ اما در مورد ژن *Hd6* ۱۳ رقم آلل G و ۳۲ رقم آلل A را نشان دادند.



شکل ۲: الگوی باندهی نشانگر هم‌بارز *Hd1* جهت تأیید کیفیت DNAی ارقام مورد مطالعه (بالا) و الگوی باندهی نشانگرهای اختصاصی ژن‌های *Hd5* (پایین راست) و *Hd6* (پایین چپ)

Fig. 2: Banding pattern of *Hd1* co-dominant marker to validate the DNA quality of studied cultivars (top) and banding patterns of *Hd5*- (bottom right) and *Hd6*- (bottom left) specific markers

اثر SNPهای مورد مطالعه بر زمان خوشه‌دهی در کل جمعیت

در جمعیت گروه‌بندی نشده میانگین ارقام واجد آلل G ژن *Hd5* معادل ۹۱/۳ روز و میانگین ارقام واجد آلل A معادل ۸۶ روز محاسبه گردید (جدول ۴). تجزیه ارتباط نشان داد که در LOD>۱/۸، SNP ژن *Hd5* ۴/۸ درصد از تغییرات زمان خوشه‌دهی ارقام مورد مطالعه را توجیه نمود. اثر افزایشی آلل G در جهت دیررسی معادل ۲/۶ روز برآورد شد (شکل ۳ چپ). در مورد ژن *Hd6* میانگین ارقام واجد آلل G معادل ۸۳/۶ روز و میانگین ارقام واجد آلل A معادل ۸۸/۳ روز محاسبه گردید. تجزیه ارتباط نشان داد که در LOD>۱/۸، SNP ژن *Hd6* بخش بالاتری (۵/۵ درصد) از تغییرات زمان خوشه‌دهی ارقام مورد مطالعه را توجیه نمود. اما بر خلاف SNP ژن *Hd5*، اثر افزایشی این SNP در جهت زودرسی معادل ۲/۴- روز برآورد شد (شکل ۳ راست).

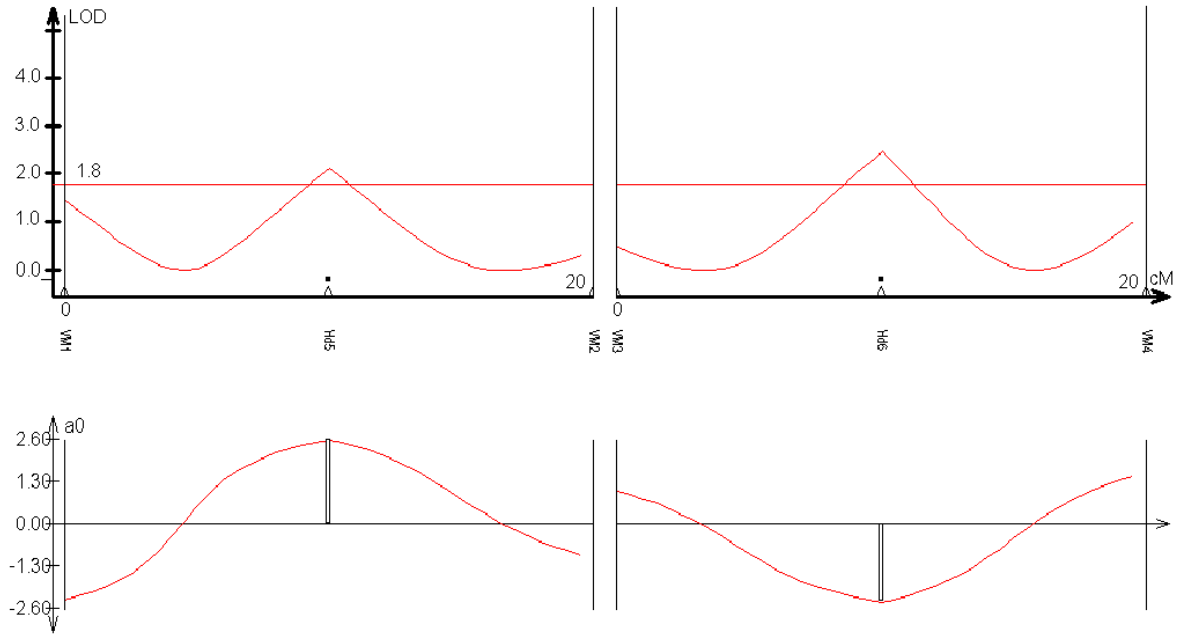
جدول ۴: اثر کلی SNP عملکردی ژن‌های *Hd5* و *Hd6* بر زمان خوشه‌دهی ارقام برنج

Table 4: Total effect of Hd5 and Hd6 functional SNP on heading date of rice cultivars

ژن Gene	میانگین ارقام با آلل G Mean of G allele	میانگین ارقام با آلل A Mean of A allele	اثر افزایشی آلل G (روز) Additive effect of G allele (days)	ضریب تبیین (R^2) Coefficient of determination
Hd5	91.25	88.05	2.60	0.0475*
Hd6	83.62	88.34	-2.36	0.0552*

*: نشان‌دهنده معنی‌دار بودن (P<۰/۰۵) می‌باشد

*: showing significance at 5% level of probability



شکل ۳: نگاره تجزیه ارتباط میان SNPهای عملکردی ژن‌های *Hd5* (چپ) و *Hd6* (راست) و زمان خوشه‌دهی در کل جمعیت مورد مطالعه. شدت ارتباط در نمودارهای بالا و اثر افزایشی در نمودارهای پایین نشان داده شده است.

Fig. 3: Graphical display of association analysis between *Hd5* (left) and *Hd6* (right) functional SNPs and heading date in total population. Relationship severity and additive effect were showed in top and bottom graphs, respectively

اثر SNP ژن *Hd5* پس از گروه‌بندی جمعیت

پس از گروه‌بندی جمعیت و تفکیک آن به دو گروه ارقام اصلاح شده (۱۹ رقم) و ارقام محلی (۲۶ رقم) تجزیه ارتباط در هر گروه به‌طور جداگانه انجام شد. در گروه ارقام اصلاح شده میانگین ارقام واجد آلل‌های G و A به‌ترتیب معادل ۹۳ و ۹۲/۳ روز محاسبه گردید (جدول ۵). با توجه به تفاوت ناچیز دو دسته آللی، اثر SNP ژن *Hd5* در توجیه تغییرات زمان خوشه‌دهی ارقام اصلاح شده غیرمعنی‌دار بود. اما در گروه ارقام محلی میانگین ارقام واجد آلل‌های G و A به‌ترتیب معادل ۹۰/۲ و ۸۱/۳ روز محاسبه گردید. آنالیز ارتباط نشان داد که در LOD>۱/۹، SNP ژن *Hd5* بخش نسبتاً بالایی (۱۶/۲ درصد) از تغییرات زمان خوشه‌دهی ارقام محلی را

توجیه نمود. اثر افزایشی این SNP در جهت دیررسی معادل ۴/۴ روز برآورد شد (شکل ۴).

اثر SNP ژن *Hd6* پس از گروه‌بندی جمعیت

در گروه ارقام اصلاح شده میانگین ارقام واجد آلل‌های G و A به‌ترتیب معادل ۸۶ و ۹۳/۶ روز محاسبه گردید (جدول ۶). تجزیه ارتباط نشان داد که در LOD>۱/۹، SNP ژن *Hd6* بخش نسبتاً بالایی (۱۷/۶ درصد) از تغییرات زمان خوشه‌دهی ارقام اصلاح شده را توجیه نمود. اثر افزایشی این SNP در جهت زودرسی معادل ۳/۸- روز برآورد گردید (شکل ۵). اما در گروه ارقام محلی میانگین ارقام واجد آلل G و A به‌ترتیب معادل ۸۲/۹ و ۸۳/۱ روز محاسبه گردید. آنالیز ارتباط نشان داد که اثر SNP ژن *Hd6* در توجیه تغییرات زمان خوشه‌دهی ارقام محلی معنی‌دار نبود.

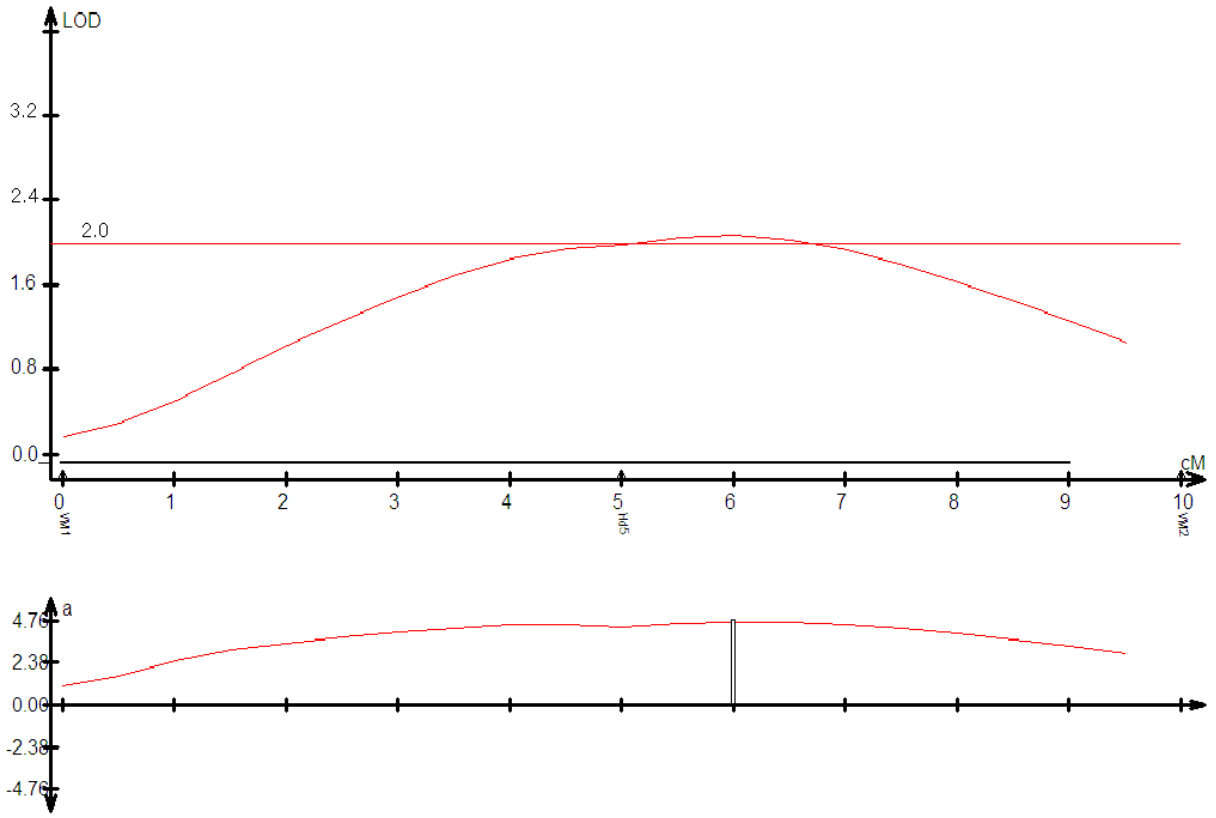
جدول ۵: اثر SNP عملکردی ژن *Hd5* پس از گروه‌بندی جمعیت بر زمان خوشه‌دهی

Table 5: Effect of Hd5 SNP on heading date after grouping the population

ضریب تبیین (R^2) Coefficient of determination	اثر افزایشی آلل G (روز) Additive effect of G allele (days)	میانگین ارقام با آلل A Mean of A allele	میانگین ارقام با آلل G Mean of G allel	گروه Group
0.0017 ns	0.38	92.25	93.00	ارقام اصلاح شده Improve varieties
0.1616*	4.43	81.33	90.20	ارقام محلی Local varieties

ns و *: به‌ترتیب نشان‌دهنده غیرمعنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن (P<۰/۰۵) می‌باشد

ns and **: showing non-significance and significance at 5% level of probability



شکل ۴: نگاره تجزیه ارتباط SNP عملکردی ژن *Hd5* با زمان خوشه‌دهی در گروه ارقام محلی. شدت ارتباط در نمودار بالا و اثر افزایشی در نمودار پایین نشان داده شده است

Fig. 4: Graphical display of association analysis between *Hd5* functional SNP and heading date in local cultivars group. Relationship severity and additive effect were showed in top and bottom graphs, respectively

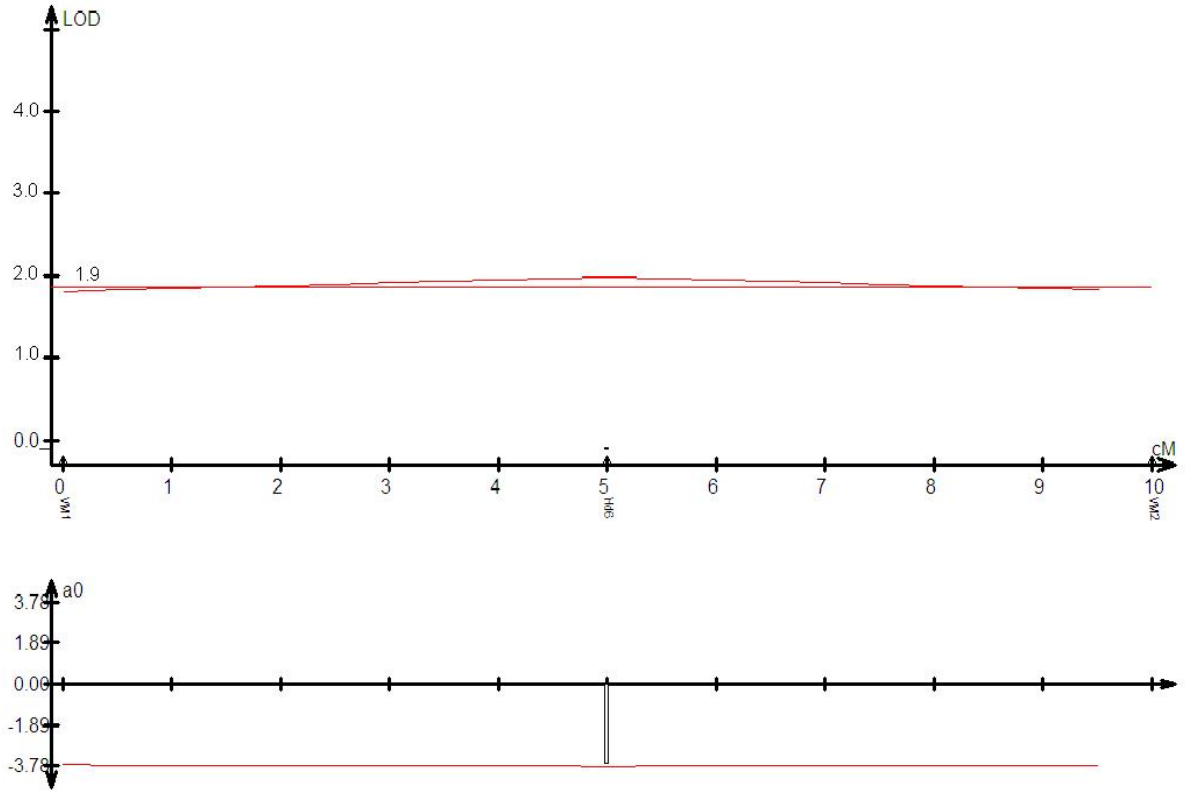
جدول ۶: اثر SNP ژن *Hd6* پس از گروه‌بندی جمعیت بر زمان خوشه‌دهی

Table 6: Effect of *Hd6* SNP on heading date after grouping the population

گروه Group	میانگین ارقام با آلل G Mean of G allel	میانگین ارقام با آلل A Mean of A allele	اثر افزایشی آلل G (روز) Additive effect of G allele (days)	ضریب تبیین (R^2) Coefficient of determination
ارقام اصلاح شده Improved varieties	86.00	93.56	-3.78	0.1761**
ارقام محلی Local varieties	82.90	83.13	-0.11	0.0002 ns

ns و **: به‌ترتیب نشان‌دهنده غیرمعنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن (P<۰/۰۱) می‌باشد

ns and **: showing non-significance and significance at 1% level of probability



شکل ۵: نگاره تجزیه ارتباط میان SNP ژن *Hd6* و زمان خوشه‌دهی در گروه ارقام اصلاح شده. شدت ارتباط در نمودار بالا و اثر افزایشی در نمودار پایین نشان داده شده است

Fig. 5: Graphical display of association analysis between *Hd6* SNP and heading date in improved cultivars group. Relationship severity and additive effect were showed in top and bottom graphs, respectively

جدول ۷: اثر هم‌زمان آلل‌های ایندیکا و ژاپونیکای ژن‌های *Hd5* و *Hd6* بر زمان خوشه‌دهی ارقام برنج

Table 7: Simultaneously effect of indica and japonica of *Hd5* and *Hd6* genes on heading date of rice cultivars

آلل *Hd5* *Hd5* allele	آلل *Hd6* *Hd6* allele	تعداد ارقام No. of varieties		زمان خوشه‌دهی (روز) Heading time (days)		میانگین Mean	انحراف از میانگین کل جمعیت Deviation from entire population mean
		اصلاح شده Improved	محلی Local	اصلاح شده Improved	محلی Local		
J	J	0	2	-	82.0	82.0	–[a]
J	I	3	3	93.0	95.7	94.3	+7.3
I	I	13	13	93.7	80.2	87.0	0.0
I	J	3	8	86.0	83.1	83.9	-3.1

a: به‌دلیل فراوانی پایین ژنوتیپ مربوطه در جمعیت، محاسبه انحراف از میانگین کل معتبر نبوده و از آن صرف‌نظر شده است

a: due to low frequency of respective genotype in population, the calculated deviation from grand mean was dropped.

بحث

ارقام محلی در روند اهلی شدن توسط کشاورزان اولیه به نحوی انتخاب شدند تا بهترین تطابق را با سیستم کاشت و شرایط آب‌وهوایی داشته باشند و یکی از صفات مهم برای رسیدن به این هدف خوشه‌دهی زودهنگام بوده است *یانو* همکاران؛ *هایاما* و همکاران، 2003 (Yano *et al.*, 2002). به

همین علت میانگین زمان خوشه‌دهی ارقام محلی غالباً پایین می‌باشد *هوری* و همکاران (Hori *et al.*, 2013). چنان‌چه نتایج این تحقیق نیز نشان داد ارقام محلی زمان خوشه‌دهی پایین‌تری داشتند (به‌طور متوسط ۸۴ روز؛ جدول ۲). درحالی‌که ارقام اصلاح شده برای اهداف دیگری نظیر عملکرد بالاتر یا مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده توسط به‌نژادگران انتخاب شده‌اند؛ به همین علت دیده شد که میانگین زمان خوشه‌دهی ارقام اصلاح شده (به‌طور متوسط ۹۲/۴ روز) به‌طور معنی‌داری بالاتر از ارقام محلی بود. با توجه به تفاوت قابل‌ملاحظه بین زمان خوشه‌دهی این دو گروه به نظر می‌رسد به‌نژادگران در شکستن لینکاژ منفی بین صفات مختلف‌الجهت (نظیر زودرسی/عملکرد پایین – دیررسی/عملکرد بالا) ناموفق عمل کرده‌اند. تجزیه ارتباط قبل از گروه‌بندی جمعیت مورد مطالعه نشان داد که به‌طورکلی اثر SNP عملکردی ژن‌های *Hd5* و *Hd6* بر زمان خوشه‌دهی برنج پایین (بین ۴/۸ تا ۵/۵ درصد) بود. این نشان‌دهنده دخالت تعدادی ژن دیگر غیر از دو ژن مورد مطالعه در کنترل زمان گل‌دهی و حالت توارث کمّی زمان خوشه‌دهی در برنج می‌باشد (*یانو* و همکاران، 2002؛ *وی* و همکاران، 2010). پس از گروه‌بندی جمعیت به دو زیرگروه ارقام اصلاح شده و محلی، تجزیه ارتباط نشان داد که اثر SNP ژن *Hd5* در زیرگروه ارقام محلی و اثر SNP ژن *Hd6* در زیرگروه ارقام اصلاح شده نسبتاً بالا (به‌ترتیب ۱۶/۲ و ۱۷/۶ درصد) بود. با توجه به جهت اثر ژن‌ها، زودرسی ارقام محلی ناشی از آلل ایندیکای ژن *Hd5* (آلل A) و زودرسی ارقام اصلاح شده ناشی از آلل ژاپونیکای ژن *Hd6* (آلل G) بوده است (جدول‌های ۵ و ۶). از آن‌جایی‌که ژن *Hd5* در شرایط روزکوتاهی باعث عدم‌حساسیت به فتوپریود می‌شود (*وی* و همکاران، 2010)، آلل عملکردی آن (آلل ایندیکا؛ I) در جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق باعث زودرسی شده است. طبق نظر *وی* و همکاران (2010) برای عرض‌های جغرافیایی پایین و میانه بهتر است اقدام به اصلاح ارقام با آلل عملکردی این ژن نمود تا گل‌دهی آن‌ها به‌وسیله روزهای کوتاه تحریک شود. با در نظر گرفتن جهت اثر دو ژن مورد بررسی می‌توان ارقام زودرس و با عملکرد نسبتاً بالا تولید کرد. به‌طور مثال، ادغام آلل ایندیکای ژن *Hd5* (با اثر زودرس‌کننده ۲/۶- روز) و آلل ژاپونیکای ژن *Hd6* (با اثر زودرس‌کننده ۲/۴- روز) به احتمال زیاد می‌تواند باعث زودرسی گردد. طبق انتظار اثر ژنوتیپ $Hd5^{I}Hd6^{J}$ می‌بایست حدود ۵- روز باشد درحالی‌که در عمل ارقام با ژنوتیپ $Hd5^{I}Hd6^{J}$ کمتر از این مقدار (۳/۱- روز) زودرس شده‌اند (جدول ۷). بر همین اساس، ارقام با ژنوتیپ $Hd5^{J}Hd6^{I}$ طبق انتظار بایستی ۵ روز دیررس شوند که در عمل بیش از این مقدار (۷/۳ روز) دیررس شده‌اند. چون ژن‌های دیگری هم در این زمینه نقش دارند و ممکن است اثر زودرس‌کننده آلل‌های مختلف‌الجهت فوق را تغییر دهند، به همین علت اثر ترکیبی این دو آلل کامل نبوده است. از طرف دیگر ارقام با ژنوتیپ $Hd5^{I}Hd6^{I}$ طبق انتظار نباید تغییری در زمان خوشه‌دهی نشان دهند که در عمل چنین اتفاقی افتاده است و اثر زودرسی آلل I ژن *Hd5* در حضور آلل I ژن *Hd6* خنثی شده به‌طوری‌که زمان خوشه‌دهی این ارقام انحرافی از میانگین کل (۸۷ روز) نشان نداده است.

سپاسگزاری

هزینه‌های انجام این تحقیق از محل کمک به پایان‌نامه‌های کارشناسی‌ارشد توسط دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تأمین شده است.

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۷-۸ متن انگلیسی مراجعه شود.