



## مطالعه اثر ناحیه ژنومی حامل ژن *Hdl* بر زمان خوشه‌دهی در برنج

اسدالله احمدی خواه<sup>۱\*</sup>، لیلا نیری پسند<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> عضو هیات علمی، گروه زیست‌فناوری، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی تهران.

<sup>۲</sup> دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۰۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۲۰

### چکیده

عبور از مرحله رویشی به مرحله زایشی موجب تنظیم زمان خوشه‌دهی در برنج می‌گردد که از صفات مرتبط با سازگاری این گیاه به نواحی کاشت مختلف یا فصول متفاوت، می‌باشد. چندین ژن مرتبط با زمان خوشه‌دهی در برنج شناسایی شده است که یکی از مهمترین آنها ژن *Hdl* بر روی کروموزوم شماره ۶ برنج می‌باشد. در این مطالعه دو رقم برنج شامل ارقام صدری (به عنوان والد بخشنده زودرس) و ندا (به عنوان والد دوره‌ای دیررس)، به منظور بررسی اثر ناحیه ژنومی حامل ژن *Hdl* بر زمان خوشه‌دهی در برنج، تلاقی داده شدند و با دو بار تلاقی برگشتی نسل  $BC_2$  ایجاد گردید. سپس یک بوته هتروزیگوت از نسل  $BC_2$  خودگشن گردید تا جمعیت  $BC_2F_2$  جهت انجام مطالعات فنوتیپی و مولکولی به دست آید. جمعیت مورد مطالعه از نظر زمان خوشه‌دهی دارای توزیع فنوتیپی پیوسته بوده و برخی افراد جمعیت تفکیک متجاوز نسبت به والد دیررس نشان دادند. بر اساس ناحیه *InDel* موجود در اگزون شماره یک ژن *Hdl* یک نشانگر کارکردی اختصاصی طراحی شد که تفاوت بانندی واضحی بین والدین تلاقی ایجاد نمود. از اینرو، این نشانگر جهت ارزیابی الگوی آلی *Hdl* در جمعیت  $BC_2F_2$  استفاده گردید. بررسی نحوه تفکیک آلی نشان داد که مکان ژنی *Hdl* در جمعیت مورد مطالعه از الگوی تفرق مورد انتظار مندلی (با نسبت ۱:۲:۱) پیروی نمود. نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) با نشانگرهای ریزماهوره نشان داد که ناحیه ژنومی در حد فاصل نشانگرهای *Hdl*-RM527 ارتباط زیادی ( $LOD > 7/5$ ) با زمان خوشه‌دهی داشت و حدود ۲۸ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه نمود. اثر افزایشی آلل والد بخشنده، منفی و در حدود ۳/۴- روز برآورد گردید. نتایج این بررسی بیانگر اثر معنی‌دار ژن *Hdl* بر زمان خوشه‌دهی در برنج می‌باشد و از نشانگر کارکردی توسعه یافته در این تحقیق می‌توان برای ردیابی ژن *Hdl* در جمعیت‌های در حال تفرق و گزینش به کمک نشانگر (MAS) برای زودرسی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: زودرسی، نشانگر کارکردی، نقشه‌یابی.

مقدمه

در بروز حساسیت به فتوپریود دخالت دارند. اخیراً نشان داده شد که QTLهای معینی به طور مستقیم موجب اثرات متقابل پیچیده برای زمان خوشه‌دهی و یا پاسخ به فتوپریود می‌شوند (Ordonez *et al.*, 2010). برای مثال، یک QTL بزرگ اثر بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۶ (با نماد *Hdl*) باعث القای گلدهی در شرایط روزکوتاه و ممانعت از گلدهی در شرایط روز بلند می‌گردد (Yano *et al.*, 2000). مشخص گردیده که *Hdl* در شرایط روز کوتاه باعث تنظیم عمل QTL بزرگ‌اثر دیگری موسوم به *Hd3a* واقع بر کروموزوم ۶ می‌شود (Kojima *et al.*, 2002). *RFT1* مشابه *Hd3a* توسط *Hdl* در روزهای کوتاه تنظیم می‌شود و بیان آن در طی روز اتفاق افتاده و در غروب به اوج می‌رسد (Komiya *et al.*, 2008). همچنین، Yano *et al.* (1997) نیز نشان دادند که *Hdl* اثر زیادی بر روی تاریخ خوشه‌دهی دارد. شبکه ژنی که گل-دهی را تحت پوشش قرار می‌دهد شامل گیرنده-های نوری، اجزای مولکولی دخیل در تنظیم ساعت بیولوژیک و ژن‌های ایجادکننده گل‌دهی می‌باشند (Kojima *et al.*, 2002; Yano *et al.*, 2000). مطالعات ژنتیک مولکولی نشان می‌دهد ژن‌های ارتولوگ<sup>۱</sup> (شامل *Hdl/CO* و *Hd3a/FT*) در برنج به عنوان یک گیاه روز کوتاه و آراییدوپسیس به عنوان یک گیاه روز بلند، در

زمان گلدهی یا تاریخ خوشه‌دهی عامل مهمی نه تنها از حیث کمیت محصول، بلکه از نظر کیفیت دانه در برنج به شمار می‌رود (Fan *et al.*, 2005). از طرفی عبور از مرحله رویشی به مرحله زایشی جهت تکثیر جنسی موفق گیاهان از اهمیت به سزایی برخوردار می‌باشد که به وسیله عوامل داخلی و بیرونی تنظیم می‌گردد (Kojima *et al.*, 2002). در برنج، روزهای کوتاه موجب تحریک و القای انتقال به مرحله گلدهی می‌شود. در اغلب وارته‌های برنج دوره رشد رویشی متغیر است در حالی که دوره رشد زایشی نسبتاً پایدار می‌باشد. بنابراین زمان خوشه‌دهی (روز از کاشت تا خوشه‌دهی) عموماً بیانگر دوره رشد می‌باشد. حساسیت به فتوپریود، حساسیت به دما و دوره رشد رویشی تعیین‌کننده زمان خوشه‌دهی در برنج هستند (You-long *et al.*, 2009). مطالعات پیشین نشان داده اند که چندین ژن در پاسخ به فتوپریود در برنج نقش دارند (Yokoo *et al.*, 1980; Tsai, 1995; Sano, 1992; Lu *et al.*, 1998; Maheswaran *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1997; Brondani *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002; Hittalmani *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002; Rabiei, 2007). تعداد زیادی مکان صفت کمی (QTL) مرتبط با زمان خوشه‌دهی در برنج شناسایی شده‌اند. در مطالعه‌ای، Lin *et al.* (۲۰۰۰) با استفاده از لاین‌های ایزوژن نزدیک (NIL) نشان دادند که سه ژن *Hdl*، *Hd2* و *Hd3*

<sup>1</sup> Ortholog

بازیابی ژنوم والد دوره‌ای<sup>۵</sup> به کار می‌رود (Wang et al., 2007; Hospital et al., 1992). در همین راستا نشانگرهای مولکولی شناسایی شده‌اند که با خصوصیات مهم زراعی - اقتصادی پیوستگی داشته و از آن‌ها در برنامه MABC در چندین گونه گیاهی نظیر ذرت، برنج، گندم و جو استفاده شده است (Semgan et al., 2006). هدف از اجرای این تحقیق، شناسایی فرم‌های آللی مختلف ژن *Hdl* در برنج و مشخص نمودن اثرات ژنتیکی آن‌ها در تغییرات فنوتیپی صفت تعداد روز تا خوشه دهی در برنج می‌باشد تا بتوان از آن در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر برای زودرسی استفاده نمود.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد گیاهی

در این تحقیق از دو رقم والدینی ایرانی ندا و صدری استفاده شد. رقم ندا از ارقام اصلاح شده الیت منطقه شمال کشور با عملکرد بالا و میان‌رس می‌باشد، در حالی که رقم صدری از ارقام محلی کیفی با عملکرد متوسط و زودرس به حساب می‌آید. این دو رقم در سال ۱۳۸۶ در شرایط آب و هوایی گرگان در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تلاقی داده شدند و در سال ۱۳۸۸ جمعیت نسل اول تلاقی برگشتی (BC<sub>1</sub>) از تلاقی رقم ندا به عنوان والد دوره‌ای با گیاهان F<sub>1</sub> و در سال ۱۳۸۹ جمعیت نسل دوم

گل‌دهی فتوپریودی برنج نقش دارند. ژن *Ehd1* گل‌دهی را در شرایط روزکوتاهی در حضور آلل عملکردی *Hdl* سرعت می‌بخشد (Tsuji et al., 2008). ژن *Hdl* از دو آگزون و یک اینترون ساخته شده که پروتئینی با ۳۹۵ اسید آمینه را رمز می‌کند و جزو خانواده ژنی CO (آرابیدوپسیس) با یک ناحیه زینک فینگر<sup>۱</sup> می‌باشد (Yano et al., 2000). به نظر می‌رسد که *Hdl* به واسطه داشتن همین ناحیه، بر رونویسی ژن‌هایی که بیان آنها به وسیله تغییر در فتوپریود کنترل می‌شود، تأثیر می‌گذارد (Yano et al., 2000).

در دو دهه گذشته، امکان انتقال نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از نشانگرهای مولکولی فراهم شده است که منتج به طراحی و اجرای تعداد زیادی آزمایشات نقشه‌یابی ژنتیکی با هدف توسعه نشانگرهای مولکولی قابل کاربرد در گزینش به کمک نشانگر<sup>۲</sup> (MAS) و یا به طور خاص، قابل کاربرد در برنامه تلاقی برگشتی به کمک نشانگر<sup>۳</sup> (MABC) شده است (Semgan et al., 2006). استراتژی MAS مبتنی بر عدم تعادل لینکاژ بین نشانگر و QTLها می‌باشد و در صورت وجود آن، گزینش به کمک نشانگر ساده، سریع، ارزان و بسیار مؤثرتر از روش گزینش فنوتیپی می‌باشد (Hospital, 2009). روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگر برای گزینش پس‌زمینه<sup>۴</sup> و تسریع در

<sup>1</sup> Zinc-finger domain

<sup>2</sup> Marker-assisted selection

<sup>3</sup> Marker-assisted backcrossing

<sup>4</sup> Background selection

<sup>5</sup> Recurrent parent genome

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)، 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 PeqLab و با چرخه‌های دمایی شامل ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۳۵°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه؛ و سرانجام ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه انجام گردید. پس از تکثیر، فرآورده‌های PCR بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد با ولتاژ ۱۱۰ ولت الکتروفورز گردید. پس از پایان الکتروفورز عکس برداری از ژل‌ها با دستگاه UV trans-illuminator انجام شد.

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های فنوتیپی مقادیر آماره‌های مختلف از قبیل میانگین، انحراف معیار (SD)، خطای معیار (S.E.)، حداقل و حداکثر به همراه شاخص‌های شکل توزیع داده‌ها شامل چولگی و کشیدگی با استفاده از نرم افزار SPSS ver. 11 (Kinnear & Colin, 2000)

تلاقی برگشتی (BC<sub>2</sub>) از تلاقی رقم ندا با گیاهان BC<sub>1</sub> ایجاد شد. پس از انگشت‌نگاری گیاهان BC<sub>2</sub> با نشانگر اختصاصی ژن *Hdl* یک بوته هتروزیگوت شناسایی گردید و در پاییز همان سال در اهواز از خودگشتی این بوته BC<sub>2</sub> جمعیت نسل BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> به دست آمد. جهت ارزیابی فنوتیپی زمان خوشه‌دهی، در سال ۱۳۹۰ تعداد ۱۱۸ بوته از جمعیت نسل BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> در مزرعه مستقر گردید. فاصله بوته‌ها ۲۵×۲۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. در مورد والدین تلاقی، از هر کدام ۲۰ بوته در دو ردیف کشت گردید. زمان خوشه‌دهی بوته‌های BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> به همراه والدین به صورت تعداد روز از زمان بذریابی تا زمان خروج اولین خوشه در هر بوته یادداشت گردید.

#### تهیه نمونه برگ، استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

نمونه‌گیری از برگ‌های جوان هر بوته در مزرعه انجام شد و نمونه‌های برگی پس از برچسب‌زنی در داخل کیسه فریزر بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. استخراج دی‌ان‌ای از برگ‌های جوان هر بوته به روش CTAB با اندکی تغییرات (Ahmadikhah, 2009) انجام شد. کیفیت DNA به وسیله الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیین شد. کمیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت هر نمونه

نتایج آمده است انجام گرفت. سه جفت آغازگر ریزماهواره در اطراف ژن *Hdl* جهت آشکارسازی چندشکلی بین والدین تلاقی به کار رفت (جدول ۱). جهت تعیین ارتباط مکان ژن *Hdl* با صفت مورد مطالعه، از روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) در نرم‌افزار QTL Cartographer 2.5 (Wang *et al.*, 2005) استفاده شد.

محاسبه گردید. به منظور آزمون برازش مقادیر مشاهده شده با مقادیر مورد انتظار، از آزمون مربع کای استفاده شد.

#### داده‌های مولکولی

طراحی آغازگرهای مورد نیاز برای واکنش زنجیره ای پلیمرز با نرم‌افزار Primer3.0 (frodo.wi.mit.edu) انجام شد. انتخاب آغازگرهای اختصاصی ژن *Hdl* به شرحی که در

جدول ۱- آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این تحقیق.

**Table 1- Microsatellite primes used in the study.**

نام آغازگر Primer name	توالی (۵'-۳') Sequence (5'-3')	دمای ذوب (°C) Tm (°C)	اندازه باند (جفت) باز بر اساس توالی رقم نیون‌بار Band size (bp) with reference to Nipponbare
RM19744-F	CTAGACCAGATTGTGGATGAACG	55.3	192
RM19744-R	GAAGTGGGAAGAGATCCGCTAGG	56.7	
RM527-F	CGGTTTGTACGTAAGTAGCATCAGG	57.7	106
RM527-R	TCCAATGCCAACAGCTATACTCG	55.3	
RM19930-F	CTATCGGATGATCCACTGTCAGG	57.1	163
RM19930-R	TAGAGGCCAGGGATGATGTCG	56.3	

ژن در توجیه تغییرات فنوتیپی ( $R^2$ ) و رسم گراف مربوطه در محیط این نرم‌افزار انجام شد.

آستانه معنی‌داری (LOD) با انجام آزمون جایگشت<sup>۱</sup> (با ۵۰۰ تکرار) تعیین گردید. برآورد پارامترهایی مانند اثر افزایشی، اثر غالبیت، سهم

<sup>۱</sup> Permutation test

## نتایج

### بررسی‌های فنوتیپی

والد بخشنده (صدری) و دوره‌ای (ندا) دارای زمان خوشه‌دهی بسیار متفاوتی (به ترتیب ۸۵ و ۱۰۳ روز) بودند، در حالیکه حداقل و حداکثر زمان خوشه‌دهی جمعیت  $BC_2F_2$  به ترتیب ۹۰ و ۱۰۶ روز به دست آمد و برخی بوته‌های جمعیت  $BC_2F_2$  تفکیک متجاوز نسبت به والد دیررس‌تر (ندا) نشان دادند که این می‌تواند دلیلی بر کمی بودن صفت مورد مطالعه باشد. در این مطالعه جمعیت در حال تفرق تهیه شده دارای توزیع فنوتیپی پیوسته و نرمال بوده و از این رو جهت مطالعات بعدی مناسب تشخیص داده شد (جدول ۲؛ شکل ۱).

### تجزیه‌های بیوانفورماتیک و انتخاب آغازگرهای

#### اختصاصی ژن *Hdl*

اکسشن‌های مربوط به ژن *Hdl* از وبگاه NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (شامل ۲۳ اکسشن از AB474759.1 تا AB474781.1) دانلود گردید و برای مقایسه و هم‌ردیف کردن آنها از نرم‌افزار Bioedit2007 استفاده شد. نتیجه هم‌ردیف‌سازی توالی‌های نوکلئوتیدی نشان داد

که علاوه بر جایگزینی‌های متعدد در موقعیت‌های مختلف، یک ناحیه بزرگ InDel (حذف/اضافه) در آگزون اول این ژن بین اکسشن‌های مختلف وجود دارد. این InDel دارای سه فرم آلی متفاوت است (شکل ۲). فرم اول (A) فاقد اضافه شدگی، فرم دوم (B) دارای یک اضافه شدگی به اندازه ۳۶ نوکلئوتید و فرم سوم (C) دارای یک اضافه شدگی به اندازه ۱۵۲ نوکلئوتید بود. بنابراین امکان طراحی آغازگرهایی در دو طرف این ناحیه InDel برای آشکارسازی پلی‌مورفیسم وجود داشت.

(آغازگر مستقیم: 5'-ACAACAACAACAATAACAAC-3'  
3'-آغازگر معکوس: 5'-TGTTTCATGCATCCCATACTG-3')

با توجه به موقعیت آغازگرهای طراحی شده (شکل ۲) اندازه باند مربوط به فرم‌های آلی مختلف به ترتیب معادل ۳۰۳، ۱۸۷ و ۱۵۱ جفت باز پیش‌بینی گردید. بنابراین می‌توان انتظار داشت که بتوان سه فرم آلی فوق را بر روی ژل آگارز به راحتی از همدیگر جدا نمود.

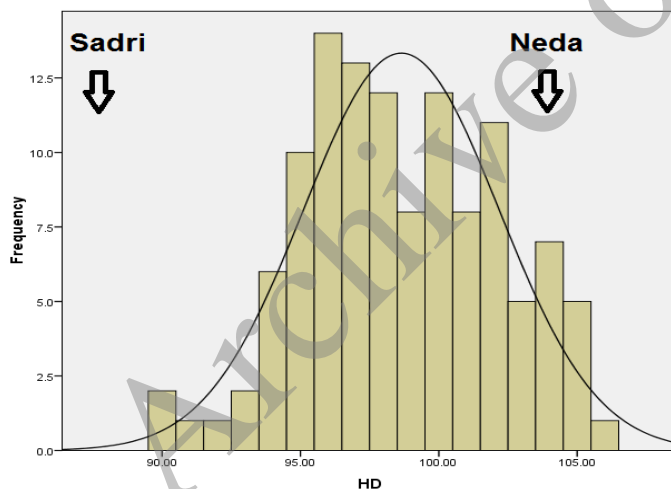
جدول ۲- پارامترهای مرتبط با زمان خوشه‌دهی والدین تلاقی و جمعیت  $BC_2F_2$

Table 2- heading date related parameters in parents of the cross and  $BC_2F_2$  population.

ردیف Row	پارامتر Parameter	مقدار Quantity	انحراف معیار (خطای معیار) SD (SE)*
۱	میانگین رقم صدری (والد بخشنده)	85	1.1
۲	میانگین رقم ندا (والد دوره‌ای)	103	0.8
۳	میانگین جمعیت $BC_2F_2$ (روز)	98.64	3.53
۴	چولگی	-0.015	0.223
۵	کشیدگی	-0.520	0.442
۶	حداقل	90	-
۷	حداکثر	106	-

\* در مورد پارامترهای ردیف ۱ تا ۳ انحراف معیار و در مورد پارامترهای ردیف ۴ و ۵ خطای معیار منظور گردید.

\* SD was considered in the case of rows 1-3 and SE was considered in the case of rows 4 and 5.



شکل ۱- توزیع فنوتیپی زمان خوشه‌دهی در جمعیت  $BC_2F_2$  موقعیت والدین با پیکان نشان داده شده است.

Figure 1- Phenotypic distribution of heading date in  $BC_2F_2$  population. Position of parents was shown with arrowheads.

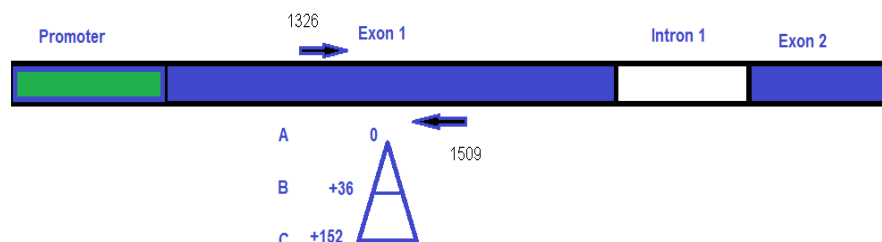
### بررسی اثر ژن *Hdl* با روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب

جهت بررسی اثر ژن *Hdl* بر زمان خوشه-دهی از مکان‌یابی QTL با روش نقشه‌یابی فاصله-ای مرکب (CIM) استفاده شد. به این منظور چندین نشانگر ریزماهواره در اطراف مکان ژنی *Hdl* انتخاب و جهت آشکارسازی چندشکلی بین والدین تلاقی به کار رفتند که سه نشانگر ریزماهواره (شامل RM19744، RM527 و RM19930) در دو طرف ژن *Hdl* بین والدین تلاقی چندشکلی نشان دادند. پس از انگشت-نگاری کل جمعیت نقشه‌یابی با این نشانگرها به همراه نشانگر مبتنی بر InDel موجود در ژن *Hdl* و انجام تجزیه با روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) مشخص شد که ناحیه ژنومی در حد فاصل *Hdl*-RM527 با زمان خوشه‌دهی در ارتباط می‌باشد ( $LOD > 7/5$ ). این مکان ژنی حدود ۲۸ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت زمان خوشه‌دهی را توجیه نمود. اثر افزایشی آلل صدری بر زمان خوشه‌دهی منفی و معادل ۳/۴- روز برآورد گردید، در حالیکه اثر غالبیت مثبت ولی ناچیز بوده است (شکل ۴).

### مطالعه جمعیت $BC_2F_2$ با نشانگر کارکردی ژن *Hdl*

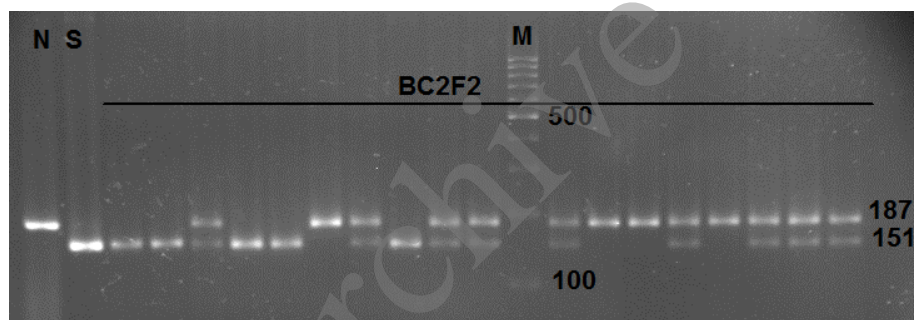
تکثیر DNA والد دوره‌ای ندا و بخشنده صدری با نشانگر طراحی شده بر اساس InDel موجود در اگزون اول ژن *Hdl* نشان دهنده تفاوت بانندی واضحی بین دو والد بود (شکل ۳). رقم ندا دارای اندازه باند ۱۸۷ جفت باز و رقم صدری دارای اندازه باند ۱۵۱ جفت باز طبق انتظار بود. بنابراین جهت مشاهده تفکیک آلی در این مکان InDel، انگشت نگاری ۱۱۸ بوته از جمعیت  $BC_2F_2$  با نشانگر اختصاصی انجام شد که نتایج حاکی از تفرق مندلی در این مکان ژنی بود (جدول ۳). همانگونه که ملاحظه می‌شود، ۲۷ بوته (۲۲/۹ درصد) دارای آلل والد بخشنده، ۳۵ بوته (۲۹/۷ درصد) دارای آلل والد دوره‌ای و ۵۶ بوته (۴۷/۵ درصد) دارای آلل‌های هر دو والد می‌باشند. میانگین زمان خوشه‌دهی بوته‌های هموزیگوس مغلوب ۱۰۲/۳ روز و میانگین زمان خوشه‌دهی بوته‌های هموزیگوس غالب ۹۵/۵ روز برآورد گردید.





شکل ۲- طرحی از ساختار ژن *Hd1* و سه فرم آلی در اگزون شماره یک آن: فرم A فاقد اضافه شدگی، فرم B دارای اضافه شدگی ۳۶ نوکلئوتیدی و فرم C دارای اضافه شدگی ۱۵۲ نوکلئوتیدی. موقعیت آغازگرهای PCR بر اساس اکسشن مرجع (AB474759.1) می‌باشد و محل آنها با پیکان نشان داده شده است.

Figure 2- A scheme of *Hd1* structure and three allelic forms in its first exon: form A absents insertion, form B has a 36 n.t insertion and form C has a 152 n.t insertion. Positions of PCR primers are shown with the reference to AB474759.1 accession (Nipponbare) and arrowheads show their location.



شکل ۳- نمونه‌ای از الگوی الکتروفورزی محصول تکثیر PCR با نشانگر مبتنی بر InDel در اگزون شماره یک ژن *Hd1* بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد. والدین تلاقی شامل ندا (N) و صدری (S) و تعدادی از افراد نسل BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> نشان داده شده‌اند. M: نشانگر اندازه مولکولی ۱۰۰ جفت باز.

Figure 3- A sample of electrophoretic pattern of PCR products obtained with InDel-based marker in first exon of *Hd1* on 2.5% agarose gel. Parents of the cross included Neda (N) and Sadri (S) and some of BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> individuals are shown. M: 100 bp size marker.

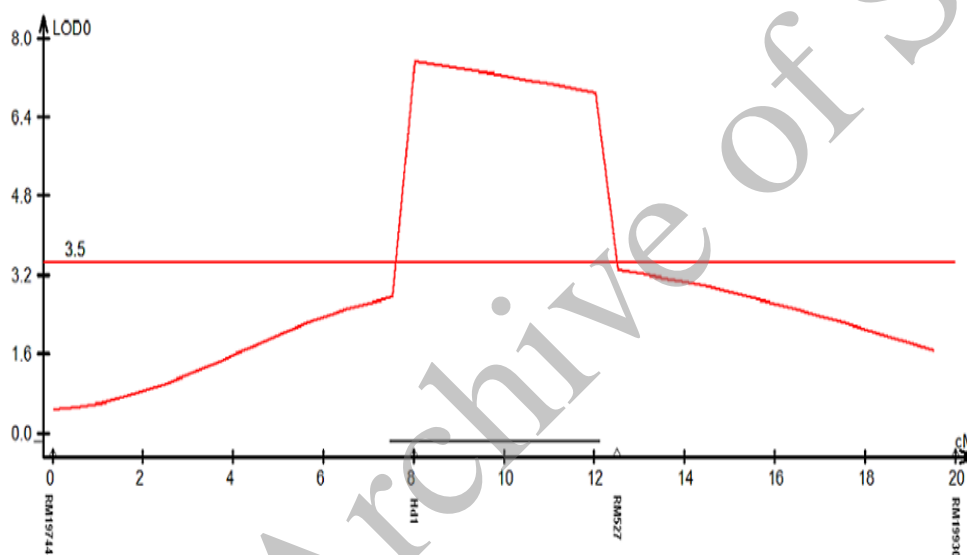
جدول ۳- میانگین زمان خوشه‌دهی، فراوانی ژنوتیپی و آزمون تفکیک مندلی.

Table 3- Average of heading date, genotypic frequencies and Mendelian segregation test.

$\chi^2$	فراوانی مورد انتظار (۱:۲:۱) Expected frequency (1:2:1)	فراوانی Frequency	زمان خوشه‌دهی (روز) Heading date(days)	ژنوتیپ Genotype
0.21	29.5	27	102.3	<i>hd1hd1</i>
0.15	59.0	56	98.7	<i>Hd1hd1</i>
1.03	29.5	35	95.5	<i>Hd1Hd1</i>
1.39 <sup>n.s</sup>	118	118		جمع

n.s- non-significant [ $\chi^2$  (df=2,  $\alpha=0.05$ )=7.82]

n.s- غیر معنی‌دار [با توجه به  $\chi^2$  (df=2;  $\alpha=5\%$ ) = 7.82]



$R^2$	درجه غالبیت (d) Dominance degree	اثر غالبیت Dominance effect	اثر افزایشی Additive effect	LOD	موقعیت Position	فاصله شماره Marker interval
0.278	-0.055	0.185	-3.38	7.75	Λ	<i>Hd1</i> -RM527

نوشته‌های داخل جدول باید هم به انگلیسی و هم به فارسی باشند؟؟  
Comment [a1]:

شکل ۴- نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) برای صفت روز تا خوشه‌دهی در برنج.

Figure 4- Composite interval mapping (CIM) analysis for heading date in rice.

بحث

توجه به اتمام پروژه تعیین توالی ژنوم برنج (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<sup>۲</sup> شده است (Nayyeripasand *et al.*, 2013). نتایج این تحقیق نشان داد که انتقال ژن *Hdl* از طریق تلاقی برگشتی به زمینه ژنتیکی رقم ندا (از ارقام الیت منطقه شمال کشور) می‌تواند زمان خوشه‌دهی را تسریع نماید، به طوری که در نسل BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> تفاوت زمان خوشه‌دهی بوته‌های دارای ژنوتیپ *HdlHdl* با زمان خوشه‌دهی بوته‌های دارای ژنوتیپ مغلوب معادل ۶/۸ روز است. نتایج نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تأیید نمود که ژن *Hdl* ارتباط معنی‌داری (LOD>۷/۵) با زمان خوشه‌دهی در برنج دارد (شکل ۴) و آلل کاهنده از والد بخشنده دارای اثر افزایشی منفی معادل ۳/۴- روز بود که این نتیجه با نتایج سایر تحقیقات مبنی بر دخالت آلل غیر کارکردی *Hdl* در تسریع زمان خوشه‌دهی در برنج مطابقت دارد (Kim; Hayama *et al.*, 2003; Gaafar, 2010) (et al., 2007)؛ در حالی که در گیاه آراییدوپسیس روزهای بلند سبب بیان ژن CO در غروب می‌-

در این تحقیق جهت بررسی اثر ژن *Hdl* بر زمان خوشه‌دهی در برنج ابتدا یک جمعیت BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> از تلاقی بین ارقام ایرانی صدری و ندا با روش تلاقی برگشتی ایجاد گردید و بررسی‌های فنوتیپی در شرایط مزرعه و مطالعات مولکولی به همراه والدین تلاقی صورت گرفت. از آنجا که نتایج خودگشن شده تلاقی برگشتی قابلیت تکرار دارند، نسبت به تک گیاهان والدینی خود، از خطای محیطی کمتری برخوردار هستند. بنابراین استفاده از آنها برای شناسایی QTL‌های با وراثت‌پذیری پایین مناسب‌تر است (Ahmadikhah, 2011). نتایج نشان داد که آغازگرهای مبتنی بر ناحیه InDel در آگزون شماره ۱ ژن *Hdl* توانستند به طور اختصاصی منطقه هدف را تکثیر نموده و چندشکلی بین والدین تلاقی را آشکار نمایند. بنابراین نشانگر توسعه یافته را می‌توان یک نشانگر تکثیر آلل اختصاصی<sup>۱</sup> (ASA) کارکردی تلقی کرد. مطالعات زیادی در گذشته با استفاده از چنین نشانگرهایی هم در جانوران و هم در گیاهان جهت اهداف خاص توسعه یافته است (Soleimani *et al.*, 2003; Liu and Sommer, 2004; Ahmadikhah et al., 2005; LaFramboise *et al.*, 2010; Ahmadikhah and Irannejad, 2010; Hirotsu; Gaafar, 2010; Kiani, 2011; et al., 2010) (Nayyeripasand *et al.*, 2013) با

<sup>2</sup> Association studies

<sup>1</sup> Allele-specific amplification

نشان داد که ژن *Hdl* حدود ۲۸ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت زمان خوشه‌دهی را در جمعیت BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> تبیین کرد. در مطالعات پیشین نیز نشان داده شد که این ژن بسته به نوع جمعیت نقشه‌یابی به کار رفته بین ۱۸ تا ۳۱ درصد از تغییرات فنوتیپی زمان خوشه‌دهی را در برنج توجیه می‌نماید (Park et al., 1995; Lin et al., 2000; Yamamoto et al., 1998; Yano et al., 1997).

#### نتیجه‌گیری

ژن *Hdl* تاثیر معنی‌داری بر زمان خوشه‌دهی در برنج دارد و نشانگر کارکردی اختصاصی ژن *Hdl* که بر اساس یک ناحیه InDel بزرگ در اگزون شماره ۱ ژن مزبور طراحی شد، می‌تواند به طور موثری در گزینش به کمک نشانگر برای اصلاح ارقام زودرس در برنج به کار رود.

شود و لذا پروتئین مربوطه سبب زودرسی در شرایط روزبلندی می‌شود. بنابراین می‌توان بیان نمود که تنظیم ژن‌های گروه FT توسط ژن‌های CO (در آراییدوپسیس) و *Hdl* (در برنج) به ترتیب نقش مرکزی در فتوسیرودیسیم گیاهان روزبلند و روزکوتاه دارد (Doi et al., 2004). همانگونه که در بالا ذکر شد، به کمک نشانگر کارکردی اختصاصی *Hdl* آلل کاهنده زمان خوشه‌دهی در والد بخشنده صدی شناسایی گردید. شناخت آلل کاهنده زمان خوشه‌دهی می‌تواند اهمیت اصلاحی داشته باشد، زیرا هنگامی که به‌نژادگر قصد بهبود و اصلاح لاین‌های زودرس از طریق استراتژی گزینش به کمک نشانگر (MAS) را دارد، دانستن اینکه کدام آلل موجب زودرسی می‌شود، انتخاب والد بخشنده‌ای که باید با لاین(های) گیرنده تلاقی یابد را تسهیل می‌نماید. نتایج نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب همچنین

#### منابع

- Ahmadikhah A (2009). A rapid mini-prep DNA extraction method in rice. African Journal of Biotechnology 8: 234-238.
- Ahmadikhah A (2011). Advanced plant breeding. Gorgan University Press, Gorgan, Iran. 480 pp.
- Ahmadikhah A, Arkhy A, Ghafari H (2010). Development of an allele specific amplification (ASA) co-dominant marker for fragrance genotyping of rice cultivars. Archives of Applied Science Research 2: 204-211.
- Ahmadikhah A, Irannejad A (2010). Development of a co-dominant CMS-specific ALP marker in Tobacco (*Nicotiana tabacum*). Annals of. Biological Research 1: 101-106.
- Brondani C, Rangel PHN, Brondani RPV, Ferreira ME (2002). QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics 104: 1192-1203.
- Doi K, Izawa T, Fuse T, Yamanouchi U, Kubo T, Shimatani Z, Yano M, Yoshimura A (2004). *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of *Hdl*. Genes and Development 18: 926-936.

- Fan CC, Yu XQ, Xing YZ, Xu CG, Luo LJ, Zhang Q (2005). The main effects, epistatic effects and environmental interactions of QTLs on the cooking and eating quality of rice in a doubled-haploid population. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 1445-1452.
- Gaafar RM (2010). Molecular marker analysis of heading date *Hd1* locus in Egyptian rice varieties. *Biotechnology* 23: 3368-3372.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang RL, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchinson D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong JP, Miguel T, Paszkowski U, Zhang SP, Colbert M, Sun WL, Chen LL, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu YS, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Science* 296: 92-100.
- Hirotsu N, Murakami N, Kashiwagi T, Ujiie K, Ishimaru K (2010). A simple gel-free method for SNP genotyping using allele-specific primers in rice and other plant species. *Plant Methods* 6: 12-16.
- Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K (2003). Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* 422: 719-722.
- Hittalmani S, Shashidhar HE, Bagali PG, Huang N, Sidhu JS, Singh VP, Khush GS (2002). Molecular mapping of quantitative trait loci for plant growth, yield and yield related traits across three diverse locations in a doubled haploid rice population. *Euphytica* 125: 207-214.
- Hospital F, Chevalet C, Mulsant P (1992). Using Markers in Gene Introgression Breeding Programs. *Genetics* 132: 1199-1210.
- Hospital F (2009). Challenges for effective marker-assisted selection in plants. *Genetica* 136: 303-310.
- Kiani Gh (2011). Marker aided selection for aroma in F<sub>2</sub> populations of rice. *African Journal of Biotechnology* 10: 15845-15848.
- Kim SL, Lee S, Kim HJ, Nam HG, An G (2007). *OsMADS51* is a shortday flowering promoter that functions upstream of *Ehd1*, *OsMADS14*, and *Hd3a*. *Plant Physiology* 145: 1484-1494.
- Kinnear PR, Colin DG (2000). *SPSS for Windows made simple: Release 10*. Hove, UK: Psychology Press.
- Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M (2002). *Hd3a*, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. *Plant Cell Physiology* 43: 1096-1105.
- Komiya R, Ikegami A, Tamaki S, Yokoi S, Shimamoto K (2008). *Hd3a* and *RFT1* are essential for flowering in rice. *Development* 135: 767-774.
- LaFramboise T, Weir BA, Zhao X, Beroukhim R, Li C, Harrington D, Sellers WR, Meyerson M (2005). Allele-specific amplification in cancer revealed by SNP array analysis. *PLoS Computational Biology* 1: 65.
- Lin HX, Yamamoto T, Sasaki T, Yano M (2000). Characterization and detection of epistatic interactions of three QTLs, *Hd1*, *Hd2* and *Hd3*, controlling heading date in rice using nearly isogenic lines. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1021-1028.
- Lin SY, Sasaki T, Yano M (1998). Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 997-1003.

- Liu Q, Sommer SS (2004). Detection of extremely rare alleles by bidirectional pyrophosphorolysis-activated polymerization allele-specific amplification (Bi-PAP-A): measurement of mutation load in mammalian tissues. *Bio Techniques* 36:156-166.
- Lu C, Shen L, Tan Z, Xu Y, He P, Chen Y, Zhu L (1997). Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments by using a doubled-haploid population. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 145-150.
- Maheswaran M, Huang N, Sreerangasamy SR, McCouch SR (2000). Mapping quantitative trait loci associated with days to flowering and photoperiod sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding* 6: 145-155.
- Nayyeripasand L, Babaeian Jelodar N, Nematzadeh GA, Ahmadikhah A, Azimi MR (2013). Development of a PCR-based marker for studying allelic variation of *Hd3a* in rice and its effect on flowering time. *International Research Journal of Applied Basic Sciences* 4: 402-409.
- Ordonez SA, Silva J, Oard JH (2010) Association mapping of grain quality and flowering time in elite japonica rice germplasm. *Journal of Cereal Science* 51: 337-343.
- Park WD (1995). Identification of quantitative trait loci (QTLs) for heading date and plant height in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 91: 374-381.
- Rabiei B (2007). Linkage map of SSR markers and QTLs detection for heading date of Iranian rice cultivars. *Journal of Agricultural Science and Technology* 9: 235-242.
- Sano Y (1992). Genetic comparisons of chromosome 6 between wild and cultivated rice. *Japan Journal of Breeding* 42: 561-572.
- Semagn K, Bjørnstad A, Ndjioudjop MN (2006). Progress and prospects of marker assisted backcrossing as a tool in crop breeding programs. *African Journal of Biotechnology* 25: 2588-2603.
- Soleimani VD, Baum BR, Johnson DA (2003). Efficient validation of single nucleotide polymorphisms in plants by allele-specific PCR, with an example from barley. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 281-288.
- Tsai KH (1995). Genetic analysis for heading time in wild rice strains. *Japan Journal of Genetics* 70: 555-562.
- Tsuji H, Tamaki S, Komiya R, Shimamoto K (2008). Florigen and the photoperiodic control of flowering in rice. *Rice* 1: 25-35.
- Wang S, Basten CJ, Zeng ZB (2005). *Windows QTL Cartographer 2.5*. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Wang J, Chapman SC, Bonnett DG, Rebetzke GJ, Crouch J (2007). Application of population genetic theory and simulation models to efficiently pyramid multiple genes via marker-assisted selection. *Crop Science* 47: 580-588.
- Yamamoto T, Kuboki Y, Lin SY, Sasaki T, Yano M (1998). Fine mapping of quantitative trait loci *Hd-1*, *Hd-2* and *Hd-3*, controlling heading date of rice, as single Mendelian factors. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 37-44.
- Yano M, Harushima Y, Nagamura Y, Kurata N, Minobe Y, Sasaki T (1997). Identification of quantitative trait loci controlling heading date in rice using a high-density linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1025-1032.
- Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T (2000). *Hdl*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* 12: 2473-2483.

- Yokoo M, Kikuchi F, Nakane A, Fujimaki H (1980). Genetical analysis of heading time by aid of close linkage with blast, *Pyricularia oryzae*, resistance in rice. Bulletin of National Institute of Agriculture Science 31: 95–126.
- Yu SB, Li JX, Xu CG, Tan YF, Li XH, Zhang Q (2002). Identification of quantitative trait loci and epistatic interactions for plant height and heading date in rice. Theoretical and Applied Genetics 104: 619–625.
- Yu-long X, Chuan-yuan Y, Jian-guo L, Ma-zhong L, Lin J, Jian-min W (2009). Genetic mechanism of dominant earliness in Kefeng A, a new rice cytoplasmic male sterile line. Rice Science 16: 267–273.
- Zhou Y, Li W, Wu W, Chen Q, Mao D, Worland AJ (2001). Genetic dissection of heading time and its components in rice. Theoretical and Applied Genetics 102: 1236-1242.

Archive of SID

## Study of the effect of *Hdl*-harboring genomic region on heading date in rice

Ahmadikhah A.<sup>1\*</sup>, Nayeripasand L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Energy Engineering and Modern Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

<sup>2</sup> M.Sc. graduate, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

### Abstract

Transition from vegetative to reproductive stage in rice plays a vital role in regulation of timing of flowering and is one of its adaptation related traits to different cultivation areas or different cropping seasons. Several genes related to heading date were identified in rice, that *Hdl* on the 6<sup>th</sup> rice chromosome is one of the most important ones. In this study, two rice cultivars including Sadri (as early flowering donor parent) and Neda (as late flowering recipient parent) were crossed to investigate the effect of *Hdl*-harboring genomic region on rice heading date, and BC<sub>2</sub> generation was developed with two times of backcrossing. Then a single heterozygote plant in BC<sub>2</sub> generation was self-pollinated to obtain BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> population for conducting phenotypic and molecular studies. The studied population had a continuous phenotypic distribution in heading date and some individuals in the population showed transgressive segregation over late flowering parent. On the basis of an InDel region in first exon of *Hdl* gene a functional specific marker was designed which produced a distinct different banding pattern among the cross parents. Hence, this marker was used to evaluate allelic pattern of *Hdl* in BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> population. Analysis of allelic segregation revealed that *Hdl* locus in the studied population followed from the expected Mendelian segregation (with 1:2:1 ratios). Composite interval mapping (CIM) with microsatellite markers showed that genomic region at *Hdl*-RM527 interval had a high relationship (LOD>7.5) to heading date and explained nearly 28 percent of phenotypic variation of the trait. Additive effect of the donor parent allele on the trait was negative and was estimated nearly -3.4 days. Results of this investigation indicated that *Hdl* had a significant effect on heading date in rice and it is possible to use the newly developed functional marker in this research for tracing the *Hdl* in segregating populations and marker-assisted selection (MAS) for early maturity.

**Key words:** Early maturity, Functional marker, Mapping.

\* Corresponding Author: Ahmadikhah A.

Tel: 09112734072

Email: ahmadikhaha@gmail.com