ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۷۲ - ۱۶۵

نقش ژن *Ehd1* در کنترل زمان خوشه‌دهی در یک جمعیت تلاقی برگشتی پیشرفته برنج در دو شرایط آب و هوایی

Study of *Ehd1* gene role in controlling flowering time in an advanced backcross population of rice at two climatic conditions

اسماعیل شریف‌زاده[۱]، اسدالله احمدی‌خواه[*۲]، بهرام ملکی‌زنجانی[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی تهران

Shrifzadeh E[1], Ahmadikhah A[*2], Maleki Zanjani B[1]

1- MSc Student, Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture University of Zanjan, Zanjan, Iran
2- Assistant Professor, Departement of Biotechnology, Faculty of New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a_ahmadikhah@sbu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۷ - تاریخ پذیرش: ۹٤/۷/۱۹)

چکیده

زمان خوشه‌دهی صفتی مهم در سازگاری جغرافیایی و فصلی گیاهان می‌باشد. این خصوصیت در غلات یک صفت پیچیده است که به‌وسیله عوامل ژنتیکی چندگانه کنترل می‌شود. در این تحقیق ارتباط ژن *Ehd1* با زمان خوشه‌دهی در یک جمعیت تلاقی برگشتی پیشرفته برنج حاصل از تلاقی دو رقم ایرانی ندا و صدری در دو شرایط آب و هوایی (گرگان و زنجان) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۹۷ لاین BC1F5 به همراه والدین تلاقی در دو مکان مورد ارزیابی فنوتیپی قرار گرفتند و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی SNP عملکردی ژن، تعیین ژنوتیپ شدند. بررسی‌های فنوتیپی نشان داد که در شرایط زنجان (محیط با دمای پایین‌تر) خوشه‌دهی به شدت به تاخیر افتاد. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که اثر SNP عملکردی این ژن بر زمان خوشه‌دهی تنها در شرایط گرگان معنی‌دار بود و تجزیه ارتباط نشان داد که ژن *Ehd1* به‌ترتیب ۱۰/۷ و ۳/۰۵ درصد از تغییرات زمان خوشه‌دهی را در دو مکان توجیه نمود. با توجه به تاثیر کاهنده آلل *Ehd1*I بر زمان خوشه‌دهی برنج (۲/۲- روز)، استفاده از این آلل همراه با آلل‌های کاهنده سایر ژن‌های موثر بر زمان خوشه‌دهی در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر (MAS) برای اصلاح زودرسی در برنج امکان‌پذیر است.

واژه‌های کلیدی

اثر متقابل ژنوتیپ- مکان
ارتباط
برنج
خوشه‌دهی
Ehd1

مقدمه

برنج یک گیاه روز کوتاه است که خوشه‌دهی آن تحت شرایط روز کوتاهی تسریع می‌شود، البته این گیاه تحت شرایط روزبلند هم گل می‌دهد، ولی زمان خوشه‌دهی آن به تاخیر می‌افتد (Lee et al. 2006). از طرفی زمان خوشه‌دهی صفتی مهم در سازگاری به شرایط جغرافیایی و فصلی می‌باشد که به‌وسیله عوامل ژنتیکی متعدد و اپی‌ژنتیک کنترل می‌شود. خصوصیات محیطی زیادی از قبیل طول روز، درجه حرارت، شدت تابش آفتاب و مواد غذایی تاریخ خوشه‌دهی را کنترل می‌کنند (Lee et al. 2006). کنترل زمان خوشه‌دهی یکی از مهم‌ترین اجزای اثر متقابل بین گیاهان و محیط رشد آن‌ها می‌باشد و نه تنها برای میزان محصول تولیدی بلکه برای کیفیت دانه برنج نیز عامل مهمی به حساب می‌آید (Fan et al. 2005). طول روز (فتوپریود) عامل محیطی مهمی در تعیین زمان خوشه‌دهی برنج می‌باشد و حساسیت به فتوپریود به صورت زودرسی، میان‌رسی و دیررسی ظهور پیدا می‌کند. اصلاح در جهت تولید واریته‌های زودرس یا غیرحساس به طول روز یکی از اهداف مهم اصلاحی برنج در چند دهه اخیر بوده است (Kobayashi et al. 2012). این صفت توسط چندین ژن با اثر کم کنترل می‌شود (Liu et al. 2006) که در تعامل نزدیک با عواملی محیطی مانند طول روز و دما بیان و یا سرکوب می‌شوند (Tsuji et al. 2011). تعداد زیادی ژن که در کنترل زمان گلدهی نقش دارند شناسایی شده‌اند و مسیرهای ژنتیک مولکولی آن‌ها در برنج و آرابیدوپسیس تشریح شده‌است (Simpson and Dean 2002; Hayama and Coupland 2004; Tsuji et al. 2011).

عملکرد گیاهان به شدت وابسته به زمان گلدهی می‌باشد. گذار به مرحله گلدهی گیاهان اساساً به دقتِ اندازه‌گیریِ تغییر در طول روز (فتوپریود) و دما بستگی دارد که هر دو فاکتور به وسیله ژن‌های داخلی و فاکتورهای محیطی تنظیم می‌شوند و گیاهان می‌توانند تغییرات در فتوپریود را درک کنند و به آن پاسخ دهند (Izawa 2007; Itoh et al. 2010). پروتئین وابسته به ساعت شبانه‌روزی OsGI در برنج فعال کننده ژن *Hd1* است که بیان *Hd1* را در شرایط روز کوتاهی افزایش می‌دهد و در نتیجه، بیان *Hd3a* در پایین دست آن افزایش یافته و در نهایت گلدهی را در برنج القاء می‌کند (Hayama et al. 2003; Komiya et al. 2008). *Ehd1* در بالا دست ژن‌های *Hd3a* و *RFT1* قرار دارد و موجب افزایش بیان این ژن‌ها به طور مستقل از *Hd1* در شرایط روز کوتاهی می‌شود (Doi et al. 2004). *Ehd1* در چندین ترکیب آمیزشی به عنوان یک QTL موثر بر زمان خوشه‌دهی شناسایی شد و با استفاده از تلاقی بین رقم نیپون‌بار و تایچونگ ٦٥ (رقمی که کاهش حساسیت به فتوپریود را نشان می‌دهد) جداسازی شد. آلل تایچونگ ٦٥ این ژن در هر دو شرایط روز کوتاهی و روز بلندی موجب تاخیر در گلدهی می‌شود و غیر عملکردی می‌باشد (Doi et al. 2004). پروتئین *Ehd1* نوعی تنظیم کننده پاسخ نوع B را رمز نموده و دارای خواص اتصال به DNA می‌باشد که نشان می‌دهد 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 (Doi et al. 2004). در حال حاضر، چند مسیر تنظیم کننده ژنتیکی (شامل مسیر جیبرلیک اسید، مسیر مستقل از جیبرلیک اسید، مسیر بهاره‌سازی و مسیر وابسته به نور) در کنترل زمان گلدهی در گیاهان شناخته شده‌است که به طور گسترده در بسیاری از گونه‌ها حفاظت شده‌اند (Izawa et al. 2003; Komeda 2004). برخی مطالعات دو مسیر سیگنال‌دهی فتوپریودی مستقل برای گلدهی در *O. sativa* پیدا کرده‌اند که توسط *Hd1* و *Ehd1* میانجی‌گری می‌گردد. *Hd1* در برنج ارتولوگ ژن CO در آرابیدوپسیس است در حالی‌که ارتولوگ *Ehd1* در ژنوم آرابیدوپیس پیدا نشده‌است (Izawa et al. 2003; Kim et al. 2007). درجه بالای چندشکلی در توالی‌های *Hd1* و *Ehd1* در میان ارقام مختلف *O. sativa* موجب تنوع در زمان گلدهی شده‌است (Johanson et al. 2000; Shindo et al. 2005; Slotte et al. 2009; Takahashi et al. 2009). هدف از این تحقیق بررسی تاثیر ژن *Ehd1* بر زمان خوشه‌دهی برنج در یک جمعیت تلاقی برگشتی پیشرفته حاصل از تلاقی دو رقم ایرانی ندا و صدری بود تا بتوان از آن در برنامه گزینش به کمک نشانگر جهت تولید ارقام زودرس استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

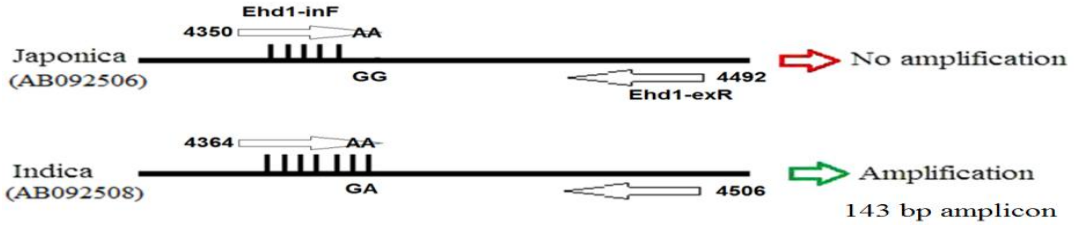
این تحقیق طی سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و دانشگاه زنجان انجام شد. آزمایشات فنوتیپی در دو مکان فوق و آزمایشات مولکولی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه زنجان انجام شد. تعداد ۹۷ لاین برنج (BC_1F_5) حاصل از تلاقی برگشتی رقم برنج ندا به عنوان والد دوره‌ای و رقم صدری به عنوان والد دهنده و سپس چهار بار خودگشنی نسل اول تلاقی برگشتی به دست آمدند. لازم به ذکر است که رقم ندا یک واریته تجاری پرعملکرد نسبتاً بی کیفیت، میان‌رس و با سطح زیر کشت زیاد در شمال کشور می‌باشد. رقم صدری یکی از ارقام بومی شمال کشور با خصوصیات کیفی مطلوب و زودرس می‌باشد. بنابراین والدین تلاقی دارای تفاوت‌های فنوتیپی فاحشی خصوصاً از نظر زمان رسیدن بودند. لاین‌های نسل BC_1F_5 به همراه والدین تلاقی در اردیبهشت ۱۳۹۲ خزانه‌گیری و گیاهچه‌های ۳۰ روزه در زمین اصلی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در دو تکرار (از هر لاین ۵ بوته بر روی یک خط و با فاصله ۲۵ سانتی‌متر بین بوته‌ها) نشاء شدند. متوسط دمای ماهیانه و مجموع GDD دو منطقه در دوره انجام آزمایش در جدول ۱ آورده شده‌است. زمان شروع خوشه‌دهی به‌صورت تعداد روز از زمان جوانه‌زنی تا زمان خروج اولین خوشه در هر لاین طبق روش (Fujino et al. 2013) یادداشت شد.

استخراج DNA از گیاهچه‌های ۷ روزه هر یک ازلاین‌ها به روش CTAB (Saghai-Maaroof et al. 1984) با اندکی تغییرات (Ahmadikhah 2009) انجام شد. کیفیت DNA به‌وسیله 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 در حد ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر تنظیم شد. سپس نمونه‌ها تا زمان استفاده در واکنش PCR در فریزر ۲۰°C- ذخیره شدند.

برای تهیه مخلوط واکنش‌های PCR از کیت شرکت سیناکلون (ایران) (PCR master mix kit) استفاده شد. مواد مورد استفاده در یک واکنش PCR شامل شش میکرولیتر PCR Master Mix، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای مستقیم و معکوس (۱۰ نانو مولار) و ٤/٨ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود که پس از تقسیط به هر تیوب، یک میکرولیتر DNA الگو (۱۰ نانوگرم) اضافه شد. واکنش‌های تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (شرکت BioRad) با برنامه دمایی به‌صورت یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ٩٤°C به مدت پنج دقیقه، ٣٤ چرخه شامل ٩٤°C به مدت ٣٥ ثانیه، ٥٦ °C به مدت ٣٥ ثانیه، ٧٢°C به مدت ٦٠ ثانیه و سرانجام یک مرحله ٧٢°C به مدت ١٠ دقیقه انجام شد. برای تکثیر DNA از آغازگرهای اختصاصی ژن *Ehd1* طراحی شده در این تحقیق (Ehd1-inF: ATGCTGGCAGAGATGGGAA؛ Ehd1-exR: AGCCGTTGCGTCCTCCTTC) استفاده شد. پس از تکثیر DNA والدین وجمعیت مورد مطالعه، فرآورده‌های PCR بر روی ژل آگارز یک درصد با ولتاژ ۱۱۰ الکتروفورز شد. پس از پایان الکتروفورز عکس برداری از ژل‌ها با دستگاه UV trans-illuminator انجام شد.

جدول ۱- متوسط دمای ماهیانه هوا (برحسب °C) و مجموع GDD در دوره انجام آزمایش (۱۱ اردیبهشت تا ۱۱ مهر ۱۳۹۱) به همراه متوسط بلندمدت دمای هوا (منبع: وبگاه سازمان هواشناسی کشوری http://www.irimo.ir).

		می	ژوئن	جولای	آگوست	سپتامبر	متوسط دمای دوره (°C)	مجموع GDD دوره
گرگان (هاشم‌آباد)	متوسط ماهیانه	۲۳/۳	۲۷/۸	۲۹/٤	۲۸/۱	۲۷/٤	۲۷/۲	۲۳۹٦/۳
	متوسط ٥٥ ساله	۲۱/۲	۲٥/٥	۲۷/۸	۲۷/۹	۲٤/۸	۲٥/٤	
زنجان	متوسط ماهیانه	۱٤/٦	۲۰/٦	۲٤/۱	۲۲/٥	۱۹/۷	۲۰/۳	۱٦٤٦/۱
	متوسط ٥٥ ساله	۱٥/۲	۱۹/۹	۲۳/۳	۲۳/۱	۱۸/۹	۲۰/۸	



شکل ۱- طرح شماتیک تفاوت تک نوکلئوتیدی (SNP) عملکردی در ژن *Ehd1* بین رقم نیپون‌بار (از زیرگونه ژاپونیکا) و رقم کسَلت (از زیرگونه ایندیکا) و نحوه آشکارسازی آن‌ها با استفاده از سیستم آغازگر اختصاصی آلل (ASO). محل آغازگرها بر روی هر اکسشن نشان داده شده‌است. آغازگر معکوس بین هر دو اکسشن حفاظت شده‌است اما آغازگر پیشرو به‌سبب داشتن دو نوکلئوتید تفاوت با آلل J در انتهای ′۳ قادر به اتصال در شرایط PCR نبوده و آنرا تکثیر نمی‌کند، در حالی‌که این آغازگر در انتهای ′۳ خود تنها یک نوکلئوتید (SNP) ناجورجفتی با آلل *I* دارد و قادر به اتصال در شرایط PCR بوده و قطعه‌ای به اندازه ۱۴۳ جفت‌باز را تکثیر می‌کند.

برای طراحی آغازگرهای اختصاصی با قابلیت آشکارسازی SNP عملکردی ژن *Ehd1*، توالی‌های دو رقم Nipponbare از زیرگونه ژاپونیکا (با شماره دسترسی *AB009506*) و Kasalath از زیرگونه ایندیکا (با شماره دسترسی *AB0092508*) با نرم‌افزار ClustalW هم‌ردیف‌سازی شدند که در نتیجه آن، SNP عملکردی ژن (G>A) مطابق با کار تحقیقاتی Doi et al. (2004) مشخص شد. لازم به توضیح است که آلل Nipponbare (آلل *J*) و آلل Kasalath (آلل *I*) هر دو عملکردی هستند، ولی تأثیر آلل عملکردی *I* بر بیان ژن‌های فلوریژن که در پایین دست آن قرار دارند، بیش‌تر می‌باشد و از این‌رو موجب زودرسی بیشتری می‌شود (Doi et al. 2004). بنابراین، یک آغازگر اختصاصی آلل Kasalath با یک ناجورجفتی در انتهای ′۳ و یک آغازگر مشترک در پایین دست طراحی شد تا فقط آلل ایندیکا (*I*) تکثیر شود (شکل ۱). اندازه باند مورد انتظار ۱۴۳ جفت‌باز بود. وجود باند نشان دهنده آلل Kasalath (*I*) و عدم وجود باند نشان دهنده آلل Nipponbare (*J*) می‌باشد. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer3.0 (http:/Frodo.wi.mit.edu/Primer3.0) انجام شد. از آنجاکه ترکیب‌های آغازگری مورد استفاده تولید الگوی باندی غالب می‌نماید، امتیازدهی ژنوتیپ‌ها به‌صورت صفر (عدم وجود باند) و ۱ (وجود باند) لحاظ شد. جهت اطمینان از صحت DNA استخراجی والدین تلاقی و لاین‌های مورد مطالعه، از تکثیر با نشانگر هم‌بارز Hd1 با آغازگرهای طراحی شده توسط (Nayyeripasand et al. 2013) استفاده شد. تجزیه‌های آماری از قبیل آزمون t و تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Kinnear and Colin 2000) انجام شد. مقادیر پارامترهایی مانند اثر افزایشی و ضریب تبیین با استفاده از نرم‌افزار QTL Cartographer 2.5 (Wang et al. 2005) محاسبه شد. در این نرم‌افزار آستانه LOD برای معنی‌دار بودن ارتباط با استفاده از آزمون جایگشت[1] با ۵۰۰ تکرار تعیین گردید و طول گام‌زنی بر روی ۰/۵ سانتی‌مورگان تنظیم شد. تجزیه ارتباط اثرات ساده ژن‌ها با روش مکان‌یابی فاصله‌ای[2] (IM) انجام شد.

نتایج

بررسی‌های فنوتیپی

ارزیابی زمان خوشه‌دهی ژنوتیپ‌ها در جمعیت مورد مطالعه نشان داد که در منطقه زنجان ۷۹ لاین از ۹۷ لاین BC1F5 تا زمان پایان ارزیابی (۱۱ مهر ۱۳۹۲) وارد فاز زایشی شدند در حالی‌که در گرگان همه لاین‌های BC1F5 خوشه دادند. به‌طور کلی والدین و لاین‌های BC1F5 در منطقه زنجان تاخیر شدید در زمان خوشه‌دهی را نشان دادند (جدول ۲). همان‌گونه که مشاهده می‌شود، در زنجان والد ندا ۴۰ روز، والد صدری ۲۹ روز و جمعیت BC1F5 به‌طور متوسط ٤٤ روز دیرتر به خوشه رفتند.

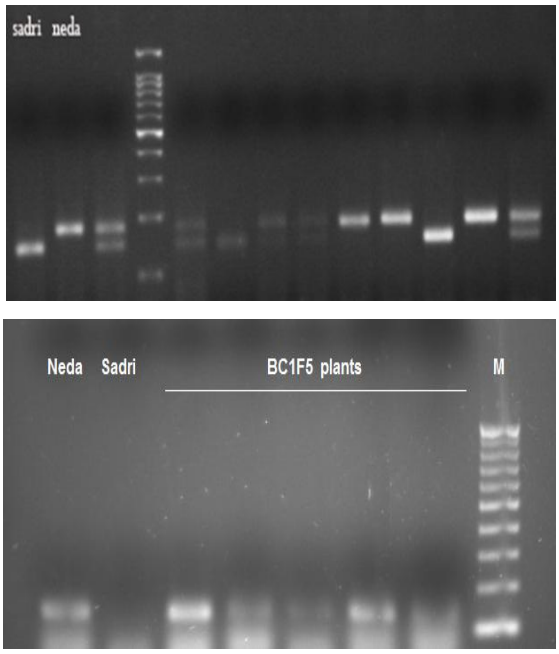
بررسی‌های مولکولی چندشکلی

از آنجاکه سیستم نشانگری مورد استفاده برای آشکارسازی چندشکلی در ژن Ehd1 غالب می‌باشد، برای اطمینان از این‌که عدم وجود باند (که باید بیانگر آلل J باشد) به دلیل کیفیت بد DNA الگو نیست، DNA هر لاین BC1F5 با یک جفت آغازگر اختصاصی ژن *Hd1* (تولید کننده نشانگر هم‌بارز) نیز تکثیر شد.

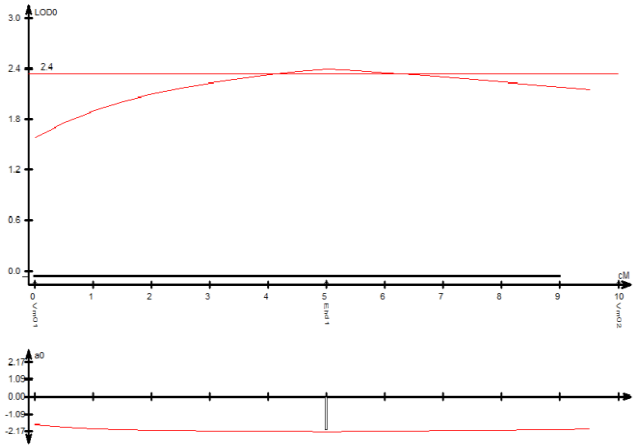
[1] Permutation test
[2] Interval mapping

a

b



شکل ۲- الگوی باندهی نشانگر هم‌بارز *Hd1* جهت تایید کیفیت DNA ارقام مورد مطالعه (a) و الگوی باندهی نشانگر اختصاصی ژن *Ehd1* (b).



شکل ۲- نگاره تجزیه ارتباط میان SNP ژن *Ehd1* و زمان خوشه‌دهی در جمعیت تلاقی برگشتی پیشرفته در شرایط گرگان. شدت ارتباط در نمودار بالا و اثر افزایشی در نمودار پایین نشان داده شده‌است.

بنابراین، بعد از اطمینان از کیفیت DNA والدین و نتاج BC1F5، تکثیر با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن *Ehd1* انجام شد. قطعه تکثیر یافته توسط آن‌ها در حدود اندازه مورد انتظار بود که نمونه‌ای از الگوی باندهی مربوطه در (شکل ۲b) نشان داده شده‌است. از مجموع ۹۷ لاین BC1F5، ۸۷ لاین باند مورد انتظار ۱۴۳ جفت بازی را تولید نمودند و ۱۰ لاین باند مورد انتظار را تولید نکردند (جدول ۳)، یعنی ۸۷ لاین حامل آلل I و ۱۰ لاین حامل آلل J بودند.

اثرات ژنوتیپی و آللی

در منطقه گرگان، میانگین لاین‌های دارای ژنوتیپ I (مشابه والد دوره‌ای ندا) معادل ۸۸/۲۵ روز و میانگین لاین‌های دارای ژنوتیپ J (مشابه والد دهنده صدری) معادل ۹۲/۶ روز محاسبه شد (جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها با آزمون t نشان داد که میانگین دو ژنوتیپ I و J دارای اختلاف بسیار معنی‌دار بود.

جدول ۳- اثر SNP عملکردی ژن *Ehd1* در جمعیت BC_1F_5 بر زمان خوشه‌دهی در شرایط گرگان

محیط	ژنوتیپ	فراوانی	میانگین(روز)	|t| تفاوت میانگین‌ها
گرگان	*J*	۱۰	۹۲/۶	۳/۳۹**
	I	۸۷	۸۸/۲۵	
زنجان	*J*	۱۰	۱۴۰/۸۵	۱/۷۴ns
	I	۸۷	۱۳۵/۴۴	

ns و ** به‌ترتیب نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد

جدول ٤- آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) برای بررسی اثر ژن *Ehd1* بر زمان خوشه‌دهی در دو شرایط گرگان و زنجان

محیط	منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	سطح معنی‌داری
گرگان	ژن *Ehd1*	۱	۱۶۹/۵۰**	۱۱/۵۰	۰/۰۰۱
	خطا	۹۵	۱٤/۷۵		
زنجان	ژن *Ehd1*	۱	۲۲٦/۲۷ns	۳/۰۲	۰/۰۸۵
	خطا	۹۵	۸٦/۷۵		

ns و ** به ترتیب نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد

جدول ٥- نتایج تجزیه ارتباط ژن *Ehd1* با زمان خوشه‌دهی در دو شرایط محیطی

محیط	آلل کاهنده	LOD	اثر افزایشی	ضریب تبیین
گرگان	*I*	۲/٤۱	-۲/۱۷	۱۰/٦۸
زنجان	*I*	۰/٦٦	-۲/۷۰	۳/۰۵

بحث

لزوم سازگار شدن دستگاه پاسخ به فتوپریود با شرایط فتوپریودی مختلف موجب ایجاد تنوع فنوتیپی در میان واریته‌های برنج زراعی شده‌است و شواهد مولکولی نشان می‌دهد که انتخاب فرم‌های آللی مختلف در جایگاه‌های ژنی مربوط به زمان گلدهی (از جمله *Ghd7*، *Hd1* و *Ehd1*) علت این تنوع می‌باشد. بنابراین، انتخاب مصنوعی این فرم‌های آللی برای تطابق با محیط‌های زراعی متنوع ضرورت داشته است (Huang et al. 2012). تحت شرایط روز کوتاهی در برنج، *Hd1* و *Ehd1* گلدهی را از طریق فعال‌سازی ژن‌های شبه *FT* القاء می‌کنند (Matsubara et al. 2011). تنظیم دقیق *Ehd1* برای گلدهی به موقع بسیار مهم است و مشخص شده که چندین ژن در کنترل بیان آن نقش دارند. *OsMADS51* و *Ghd8* بیان *Ehd1* را تنظیم می‌کنند و *Ehd1* نیز به نوبه خود بر روی فلوریژن *Hd3a* عمل می‌کند و از این طریق گلدهی را در برنج تحت تاثیر قرار می‌دهد (Yan et al. 2011). از طرف دیگر، *Ehd1* در تنظیم مثبت *Hd3a* نقش دارد و گذار به مرحله گلدهی را حتی در غیاب آلل‌های عملکری *Hd1* القاء می‌کند (Izawa et al. 2003; Doi et al. 2004).

فتوپریود و دما دو عامل محیطی مهم برای گلدهی گیاهان می‌باشند. گذار به مرحله گلدهی گیاهان بستگی به‌دقت اندازه‌گیری تغییرات در فتوپریود و دما توسط گیاه دارد. پیشرفت‌های اخیر در بیولوژی و ژنتیک مولکولی در آرابیدوپسیس و برنج نشان داده که تنظیم گلدهی گیاهان به‌وسیله فتوپریود و دما در یک شبکه ژنی پیچیده با مسیرهای تنظیمی متفاوت کنترل می‌شود (Yuan-Li and Wei-Jiang 2012). در مسیر فتوپریودی مستقل از جیبرلیک اسید، ژن‌های *Hd1* و *Ehd1* در کنترل زمان خوشه‌دهی برنج نقش دارند. این مسیرها از طریق تلفیق بیان *Ehd1* و *RFT1* به یک مسیر مشترک می‌رسند و در واقع این دو مسیر همگرا می‌باشند. ژن *RFT1* کد کننده پروتئین فلوریژن می‌باشد که به عنوان یک سیگنال محرک از برگ‌ها به سمت مریستم رأسی حرکت می‌کند تا تغییر در روند گلدهی را موجب شود (Tamaki et al. 2007; Komiya et al. 2009). همچنین، آنالیز بیان ژن با استفاده از بیان شدید *Ehd1* در گیاهان تراریخته نشان داد که *Ehd1* رونویسی *Hd3a* را در برنج فعال می‌کند (Doi et al. 2004). *Ehd1* در مسیر گلدهی برنج منحصر به فرد می‌باشد و تنظیم‌کننده پاسخ نوع B را کد می‌کند که مستقل از *Hd1*، موجب گلدهی در هر دو شرایط روز کوتاهی و روز بلندی می‌شود (Doi et al. 2004). هم‌چنین، *OsGI* در کنترل ساعت شبانه روزی نقش داشته و بیان *Ehd1* را از طریق *OsMADS51* تنظیم می‌کند (Kim et al. 2007).

نتایج این تحقیق نشان داد که اثر ژن *Ehd1* درشرایط آب و هوایی گرگان بسیار معنی‌دار بود (جدول‌های ۳ و ٤)، در حالی‌که اثر آن در شرایط آب و هوایی زنجان معنی‌دار نبود. نتایج تجزیه ارتباط نشان داد که SNP عملکردی ژن *Ehd1* در دو شرایط آب و هوایی گرگان و زنجان به ترتیب ۱۰/۷ و ۳/۰۵ درصد (جدول ۵) از تغییرات زمان خوشه‌دهی در جمعیت مورد مطالعه را توجیه کرد. Naranjo et al. (2014) گزارش کردند که ژن *Ehd1* در تاریخ خوشه‌دهی برنج اثر گذار می‌باشد و از طریق تنظیم سایر ژن‌های درگیر در زمان خوشه‌دهی از قبیل *RFT1* و یا *Hd3a* زمان گلدهی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ژن *Ehd1* در شرایط آب و هوایی مناسب، یکی از ژن‌های اصلی دخیل در زمان خوشه‌دهی برنج می‌باشد. از هشت QTL تاکنون همسانه‌سازی شده، هفت QTL در کنترل پاسخ به فتوپریود نقش دارند. نخستین آن‌ها یعنی *Hd3a* در مسیر فتوپریودی به عنوان فلوریژن عمل می‌کند که بیان آن در شرایط روز کوتاهی القاء ولی در شرایط روز بلندی سرکوب می‌شود (Tamaki et al. 2007). شش QTL دیگر موثر در پاسخ به فتوپریود عبارتند از *Hd1* و *Ehd1* که باعث تنظیم بیان *Hd3a* می‌شوند (Kojima et al. 2002; Doi et al. 2004)، *Hd6* (Ogiso et al. 2010)، *Ghd7* (Xue et al. 2008)، *DTH8* (Wei et al. 2010; Yan et al. 2011) و *Hd17* (Matsubara et al. 2012) که این چهار ژن اخیر باعث تنظیم بیان *Hd1* و یا *Ehd1* می‌شوند. در تایید نتایج حاصل از تحقیق حاضر Doi et al. (2004) نیز بیان کردند که ژن *Ehd1* اثرات متوسطی بر زمان خوشه‌دهی در برنج دارد. یکی از دلایل کاهش اثر ژن مورد مطالعه احتمالاً شرایط روزبلندی حاکم در هر دو منطقه محل آزمایش بوده است. چنان‌که اخیراً Endo-Higashi and Izawa (2011) در آزمایشی با لاین‌های ایزوژن T65+*Ehd1* نشان دادند که *Ehd1* در شرایط روزبلندی تنها به مدت چند روز

موجب زودرسی نسبت به لاین T65 شد، در حالی‌که در شرایط روزکوتاهی موجب زودرسی بیشتری شد. با توجه به اینکه اثر این ژن در دو محیط تفاوت فاحشی داشت (تبیین ۱۰/۷ و ۳/۰۵ درصد از تغییرات زمان خوشه‌دهی)، می‌توان بیان داشت که خصوصیات محیطی نظیر فتوپریود و دمای هوا در طول دوره رشد بر نحوه بیان این ژن اثر می‌گذارند. Gao et al. (2013) نیز گزارش کردند که فتوپریود و دما مسیرهای گلدهی را در برنج تحت تاثیر قرار می‌دهند و گلدهی در برنج توسط اثر متقابل بین عوامل زیستی و غیر زیستی تنظیم می‌شود. تحت شرایط روز بلندی، گلدهی در برنج به تأخیر می‌افتد و مسیر *OsGI-Hd1-Hd3a* مسیر بازدارنده گلدهی می‌باشد. بدین معنی که *Hd1* تحت شرایط روز بلند از رونویسی *Hd3a* ممانعت کرده و موجب تاخیر در گلدهی برنج می‌شود (Izawa 2007). مهار کننده دیگر گلدهی *Ghd7* می‌باشد که یک فاکتور رونویسی را رمز می‌کند و گلدهی را در برنج از طریق کاهش سطوح *Ehd1 mRNA* به تاخیر می‌اندازد (Xue et al. 2008). با توجه به این‌که طول روز در شرایط گرگان و زنجان تفاوت قابل ملاحظه‌ای ندارد (در حد چند دقیقه)، کاهش اثر ژن *Ehd1* در زنجان احتمالاً بیشتر ناشی از پایین بودن دمای هوا (دریافت GDD کمتر) و کاهش بیان *Ehd1* بوده است، زیرا همان‌گونه که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود، متوسط دمای هوا در دوره انجام آزمایش در زنجان حدود ۷ °C پایین‌تر از گرگان بود؛ از طرف دیگر مجموع GDD دریافت شده در گرگان حدود ۷۵۰ واحد بیشتر از زنجان بود. بنابراین، دمای پایین هوا و در نتیجه GDD دریافتی کمتر در زنجان باعث شد که والدین و جمعیت BC_1F_5 با تاخیر قابل ملاحظه وارد فاز زایشی شوند. Song et al. (2012) نیز گزارش کردند که دمای پایین هوا (۲۳ °C) بیان *Ehd1* را کاهش می‌دهد. با توجه به نتایج این تحقیق، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که برای اثرگذاری ژن *Ehd1* بر زمان خوشه‌دهی، باید شرایط دمایی مناسب باشد، به‌طوری که تاثیر این ژن در دمای پایین کاهش می‌یابد. با توجه به تاثیر کاهنده آلل *I* ژن *Ehd1* بر زمان خوشه‌دهی برنج، استفاده از این آلل در ترکیب با آلل‌های کاهنده سایر ژن‌های موثر بر زمان خوشه‌دهی در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر (MAS)، برای اصلاح زودرسی امکان‌پذیر است.

منابع

Ahmadikhah A (2009) A rapid mini-prep DNA extraction method in rice. African Journal of Biotechnology 8: 234-238.

Doi K, Izawa T, Fuse T, Yamanouchi U, Kubo T (2004) *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of *Hd1*. Genes and Development 18: 926-936.

Endo Higashi N, Izawa T (2011) Flowering Time Genes Heading date 1 and Early heading date 1 Together Control Panicle Development in Rice. Plant Cell Physiology 52: 1083-1094.

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.

Fojino K, Yamanouchi U, Yano M (2013) Roles of the *Hd5* gene controlling heading date for adaptation to the northern limits of rice cultivation. Theoretical and Appleid Genetics 126: 611-618.

Gao H, Zheng XM, Fei G, Chen J, Jin M, Ren Y, Wu W, Zhou K, Sheng P, Zhou F, Jiang L, Wang J, Zhang X, Guo X, Wang JL, Cheng Z, Wu C, Wang H, Wan JM (2013) *Ehd4* Encodes a Novel and Oryza Genus Specific Regulator of Photoperiodic Flowering in Rice. PLoS Genetics 9: e1003281.

Hayama R, Coupland G (2004) The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of Arabidopsis and rice. Plant Physiology 135: 677-684.

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.

Huang CL, Hung CY, Chiang YC, Hwang CC, Hsu TW, Huang CC, Hung KH, Tsai KC, Wang KH, Osada N, Schaal BA, Chiang TY (2012) Footprints of natural and artificial selection for photoperiod pathway genes in *Oryza*. Plant Journal 70: 769-782.

Itoh H, Nonoue Y, Yano M (2010) A pair of floral regul A pair of floral regulators sets critical day length for *Hd3a* florigen expression in rice. National Genetics 42: 635-638.

Izawa T (2007) Daylength measurements by rice plants in photoperiodic short-day flowering. International Review in Cytology 256: 191-222.

Izawa T, Takahashi Y, Yano M (2003) Comparative biology comes into bloom: Genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and Arabidopsis. Current Opinion in Plant Biology 6: 113-120.

Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Ameasino R, Dean C (2000) Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. Science 290: 344-346.

Kim SL, Lee S, Kim HJ, Nam HG, An G (2007) OsMADS51 is a short-day 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. Psychology Press, Hove, UK.
Kobayashi K, Yasuno N, Sato Y, Yoda M, Yamazaki R, Kimizu M, Yoshida H, Nagamura Y, Kyozuka J (2012) Inflorescence meristem identity in rice is specified by overlapping functions of three AP1/FUL-like MADS Box genes and PAP2, a SEPALLATA MADS Box gene. The Plant Cell 24: 1848-1859.
Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T (2002) *Hd3a*, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. Plant and Cell Physiology 43: 1096-1105.
Komeda Y (2004) Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. Annual Review of Plant Biology 55: 521-535.
Komiya R, Ikegami A, Tamaki S (2008) *Hd3a* and *RFT1* are essential for flowering in rice. Development 135: 767-774.
Komiya R, Yokoi S, Shimamoto K (2009) A gene network for long-day flowering activates RFT1 encoding a mobile flowering signal in rice. Development 136: 3443-3450.
Lee CK, Choi KJ, Shin JC (2006) Response characteristics of Korean rices to photoperiod. Proc. Korean Society Crop Science Conference. pp. 296-297.
Liu QQ, Li QF, Cai XL, Wang HM, Tang SZ, Yu HX, Wang ZY, Gu MH (2006) Molecular marker-assisted selection for improved cooking and eating quality of two elite parents of hybrid rice. Crop Science 46: 2354-2360.
Matsubara K, Yamanouchi U, Nonouem Y, Sugimoto K, Wang ZX, Minobe Y, Yano M (2011) *Ehd3*, encoding a plant homeodomain finger-containing protein, is a critical promoter of rice flowering. Plant Journal 66: 603-612.
Naranjo L, Talón M, Domingo C (2014) Diversity of floral regulatory genes of japonica rice cultivated at northern latitudes. BMC Genomics 15: 101.
Nayyeripasand L, Nematzadeh Gh, Babaeian Jelodar N, Ahmadikhah A, Azimi MR (2013) Development of an allele-specific functional marker for studying *Hd1* effect on flowering time of rice. International Research Journal of Basic and Applied Sciences 4: 1000-1006.
Ogiso E, Takahashi Y, Sasaki T, Yano M, Izawa T (2010) The role of Casein Kinase II in flowering time regulation has diversified during evolution. Plant Physiology 152: 808-820.
Saghai Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dymnamics. Proceedings of National Academy of Science of USA 81: 8014-8018.
Shindo C, Aranzana JA, Lister C, Baxter C, Nicholls C, Nordborg M, Dean C (2005) Role of FRIGIDA and FLOWERING LOCUS C in determining variation in flowering time of Arabidopsis. Plant Physiology 138: 1163-1173.
Simpson GG, Dean C (2002) Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time. Science 296: 285-289.
Slotte T, Huang HR, Holm K, Ceplitis A, Onge KS, Chen J, Lagercrantz U, Lascoux M (2009) Splicing variation at a FLOWERING LOCUS C homeolog is associated with flowering time variation in the tetraploid Capsella bursa-pastoris. Genetics 183: 337-345.
Song Y, Gao Z, Luan W (2012) Interaction between temperature and photoperiod in regulation of flowering time in rice. Science China Life Sciences 55: 241-249.
Takahashi Y, Teshima KM, Yokoi S, Innan H, Shimamoto K (2009) Variations in Hd1 proteins, *Hd3a* promoters, and *Ehd1* expression levels contribute to diversity of flowering time in cultivated rice. Proceeding of the National Academy of Sciences of USA 106: 4555-4560.
Tamaki S, Matsuo S, Wong HL, Yokoi S, Shimamoto K (2007) *Hd3a* protein is a mobile flowering signal in rice. Science 316: 1033-1036.
Tsuji H, Taoka K, Shimamoto K (2011) Regulation of flowering in rice: two florigen genes, a complex gene network, and natural variation. Current Opinion in Plant Biology 14: 45–52.
Wang S, Basten CJ, Zeng ZB (2005) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
Wei X, Xu J, Guo H, Jiang L, Chen S (2010) DTH8 suppresses flowering in rice, influencing plant height and yield potential simultaneously. Plant Physiology 153: 1747-1758.
Xue W, Xing Y, Weng X (2008) Natural variation in Ghd7is an important regulator of heading date and yield potential in rice. National Genetics 40: 761-767.
Yan WH, Wang P, Chen HX, Yu SB, Xing YZ, Zhang QF (2011) A major QTL, *Ghd8*, plays pleiotropic roles in regulating grainproductivity, plant height, and heading date in rice. Molecular Plant 4: 319-330.
Yuan-Li S, Wei-Jiang L (2012) Molecular regulatory network of flowering by photoperiod and temperature in rice. Rice Science 19: 169-176.

Modern Genetics Journal

Vol 11, Number 2, Summer 2016, Quaternary

Study of *Ehd1* gene role in controlling flowering time in an advanced backcross population of rice at two climatic conditions

Shrifzadeh E[1], Ahmadikhah A[*2], Maleki Zanjani B[1]

1. MSc Student, Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture University of Zanjan, Zanjan, Iran
2. Assistant Professor, Departement of Biotechnology, Faculty of New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* Corresponding Author, Email: a_ahmadikhah@sbu.ac.ir

ABSTRACT

Heading date is a key trait for geographical and seasonal adaptation of plants. It is a complex trait which is controlled by multiple genetic factors. In this research, the relationship of *Ehd1* gene with heading date was assessed at two climatic conditions (Gorgan and Zanjan) in an advanced backcross population of rice derived from crossing two Iranian cultivars Neda and Sadri. For this purpose, 97 BC_1F_5 lines along with their parents were evaluated phenotypically at both locations and were genotyped using genetic primers specifically designed for the functional SNP of *Ehd1*. Phenotypic evaluations showed that in Zanjan with lower temperatures comparing to Gorgan, heading time delayed considerably. Molecular analysis of variance showed significant effect of functional SNP only in Gorgan. Association analysis showed that *Ehd1* gene is related to 10.7% and 3.05% of phenotypic variations of heading date at two locations, respectively. Regarding to the decreasing effect of $Ehd1^I$ allele on rice heading date (-2.2 dayes), employing this allele in combination with the alleles of other genes with decreasing effect on heading date is applicable in marker-assisted selection (MAS) for improving early maturity in rice.

Key Words

Ehd1, Genotype-location interaction, Heading, Relationship, Rice