

## شناسایی مولکولی تنوع آللی در مکان‌های ژنی *VRN-1*، و *VRN-B3*، کنترل کننده نیاز بهاره‌سازی در ژنوتیپ‌های گندم بر مبنای چندشکلی موجود در پروموتور و نواحی اینترون

مهناز محمدفام<sup>۱</sup>، صابر گلکاری<sup>۲\*</sup>، بهزاد صادق زاده<sup>۲</sup>

۱- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران

۲- موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران

### چکیده

گندم، یکی از گیاهان مهم زراعی ایران و جهان، از جنبه‌های گوناگون غذایی و اقتصادی حائز اهمیت می‌باشد. شناسایی تنوع آللی ژن‌های کنترل کننده نیاز بهاره‌سازی در ارقام و لاین‌های مختلف گندم، امکان تعیین تیپ رشد، پیش‌بینی سطح تحمل سرما و سازگاری ژنوتیپ‌های مختلف گندم را به اقلیم‌ها و مناطق هدف فراهم می‌سازد. در سطح مولکولی طول دوره ورنالیزاسیون در ارقام گندم به طور عمده به وسیله مکان‌های ژنی (*VRN-1*، *VRN-2* و *VRN-3*) تعیین می‌شود. در گندم هگزاپلوئید ژن‌های (*Vrn*) برای تیپ رشد بهاره در فرم غالب و برای تیپ زمستانه در فرم مغلوب همراه با اثرات اپی‌استاتیک عمل می‌کنند. در این تحقیق تنوع آللی موجود در مکان‌های ژنی (*VRN-1* و *VRN-B3*) در ۵۰ ژنوتیپ گندم نان با استفاده از ۹ جفت آغازگر اختصاصی تعیین شد. آلل‌های غالب (*Vrn-B3* و *Vrn-B1*، *Vrn-D1*) به ترتیب با فراوانی (۵۸٪، ۲۲٪ و ۹۰٪) شناسایی شدند. همچنین آلل‌های مغلوب (*vrn-B3* و *vrn-B1*، *vrn-D1*) به ترتیب با فراوانی (۴۲٪، ۷۸٪ و ۱۰٪) شناسایی شدند. در مکان ژنی (*VRN-A1*) آلل (*Vrn-A1c*) با فراوانی ۵۸٪، آلل (*Vrn-A1b*) با فراوانی ۲۶٪، آلل (*Vrn-A1a*) با فراوانی ۱۴٪ و آلل (*vrn-A1*) با فراوانی ۲٪ دارای کمترین فراوانی بود. این تحقیق تنوع آللی قابل ملاحظه‌ای را در مکان‌های ژنی کنترل کننده ورنالیزاسیون و تحمل سرما در ژنوتیپ‌های گندم دیم مورد بررسی نشان داد که اطلاعات حاصل در جهت جمع‌آوری آلل‌های مطلوب برای تولید لاین‌های سازگار به شرایط اقلیمی در مناطق هدف مورد بهره‌برداری قرار خواهد گرفت.

**واژه‌های کلیدی:** گندم، ورنالیزاسیون، تیپ رشدی بهاره و زمستانه، *VRN-1*، *VRN-B3*

## مقدمه

غلات از مهم‌ترین منابع تامین غذای انسان به‌شمار می‌روند به‌طوری‌که حدود ۶۵-۷۰ درصد از کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، قسمت زیادی از ویتامین‌های گروه ب، املاح و عناصر ریزمغذی در رژیم غذایی روزانه از طریق غلات و فرآورده‌های آن تأمین می‌شود. گندم زراعی (*Triticum aestivum* L.) به عنوان یک محصول زراعی مهم از سطح زیر کشت وسیعی در غالب نقاط جهان برخوردار بوده و بیش از ۴۰ درصد غذای اصلی جمعیت دنیا را تامین می‌کند (تونگ و همکاران، ۲۰۰۳). محدوده کشت گندم نان بین ۶۰-۳۰ درجه شمالی و ۴۰-۲۷ درجه جنوبی است. گندم با قابلیت زراعت در اقلیم‌های مختلف سرد و خشک از بیشترین سطح زیر کشت در جهان برخوردار است (بارون و همکاران، ۲۰۰۷). شناسائی تنوع آلی ژن‌های کنترل کننده نیاز بهاره‌سازی در ارقام و لاین‌های مختلف گندم امکان تعیین تیپ رشد و درجه تحمل به سرما در ژنوتیپ‌های مختلف گندم را فراهم و به تعیین سازگاری ارقام گندم به مناطق هدف در اقلیم‌های مورد نظر کمک می‌نماید. غلات از جمله گندم برای گلدهی و عبور از رشد رویشی به زایشی باید در مراحل خاصی از رشد در دماهای پایین قرار بگیرند (زایتسوا و لمش، ۲۰۱۵). فرآیند ورنالیزه شدن زمانی اتفاق می‌افتد که گیاه برای مدت چندین هفته در دمای بین ۴ تا ۶ درجه سانتی‌گراد قرار گیرد. در سطح مولکولی طول دوره ورنالیزاسیون در گندم نان توسط ژن‌های (*VRN*) کنترل می‌شود. ژن‌های کنترل کننده بهاره‌سازی در غلات (*VRN1*، *VRN2* و *VRN3*) هستند

(ترواسکیس و همکاران، ۲۰۰۷؛ دیستالفلد و همکاران، ۲۰۰۹). وجود تنوع آلی در جایگاه (*VRN-1* و *VRN-B3*) منبع اصلی تفاوت‌های ژنتیکی در نیاز به بهاره‌سازی در گندم است (مکینتاش و همکاران، ۲۰۰۳). گندم‌های معمولی (هگراپلوئید  $2n=42$  با ژنوم AABBDD) دارای سه نسخه هومولوگ از ژن (*VRN-1*) می‌باشند که در بازوی بلند کروموزوم‌های (*5A*، *5B* و *5D*) قرار گرفته‌اند (مایسترنکو، ۱۹۷۳؛ لو و همکاران، ۱۹۷۶). در مجموع این سه ژن به عنوان جایگاه (*VRN-1*) شناخته شده‌اند. تفاوت‌های آلی در جایگاه (*Vrn-1*) اغلب منشا اصلی تنوع تیپ رشد در ارقام گندم در میان ژن‌های ورنالیزاسیون است. بیان ژن (*VRN1*) به عنوان یک فاکتور رونویسی برای گلدهی غلات معتدله ضروریست (دنیلوک و همکاران، ۲۰۰۳؛ مورای و همکاران، ۲۰۰۳؛ یان و همکاران، ۲۰۰۳). در ارقام تیپ رشد زمستانه ژن (*VRN1*) در اثر قرار گرفتن در معرض سرما بیان می‌شود اما در ارقام تیپ رشد بهاره بیان ژن (*VRN1*) نیازی به بهاره‌سازی و قرار گرفتن در معرض سرما ندارند. ژنوتیپ‌های گندم با تیپ رشد زمستانه این آلل‌ها را به‌صورت مغلوب دارند و نیازمند ورنالیزه شدن هستند اما ارقام و ژنوتیپ‌های با تیپ رشد بهاره با داشتن آلل‌های غالب نیازی به ورنالیزه شدن ندارند (زایتسوا و لمش، ۲۰۱۵). آلل‌های غالب لوکوس (*VRN1*) تحت عنوان (*VRN-A1*، *VRN-B1* و *VRN-D1*) آلل‌های مغلوب هم تحت عنوان (*vrn-A1*، *vrn-B1* و *vrn*) *DI* مشخص شده‌اند (زایتسوا و لمش، ۲۰۱۵). سه آلل غالب برای جایگاه ژنی (*Vrn-A1*) شناسایی شده‌اند. آلل *Vrn-A1a* دارای الحاق (*Insertion*) در

۲۰۰۷). لوکوس (*VRN-B3*) اورتولوگ ژن FT آراییدوپسیس است که در تعیین زمان گلدهی این گیاه نقش دارد. ال غالب در گندم نورستار در لوکوس (*VRN-B3*) دارای ترانسپوزون الحاقی در آغازگر خود است (یان و همکاران، ۲۰۰۶). ژن (*VRN-B3*) بر روی بازوی کوتاه کروموزوم 7B قرار گرفته است. ژن (*VRN-B3*) رونویسی از ژن (*VRN-*) *AI* را تسهیل می کند (یان و همکاران، ۲۰۰۶).

ناحیه پروموتوری بوده و آلل (*Vrn-A1b*) دارای حذف (deletion) ۲۰ جفت بازی در ناحیه پروموتر می باشد. این در حالیست که آلل (*Vrn-A1c*) دارای یک حذف در اولین اینترون خود است (یان و همکاران، ۲۰۰۳؛ یان و همکاران ۲۰۰۴). در مکان های ژنی (*Vrn-D1* و *Vrn-B1*) حذف بزرگی در اینترون اول موجب پیدایش ال های غالب شده است (فو و همکاران، ۲۰۰۵، مکنتاش و همکاران،

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ های مورد ارزیابی در این تحقیق

Row	Source	Ent. No.	Line
1	14AYT-SA	9506	CRR/TIA.2//FDL490/4/1D13.1/MLT/3/LFN/SDY//PVN
2	14AYT-SA	9512	INTENSIVNAYA/KUKUNA//INTENSIVNAYA
3	14AYT-SA	9514	WBL1*2//TUKURU//FARMEC
4	14AYT-SA	9515	STEKLOVIDRAYA-24/KUKUNA
5	14AYT-SA	9530	338K1//ANB/BUC/3/GS50A/4/059E//JAGGER/PECOS/5/ZAR GANA-4
6	14AYT-SA	9531	NEMURA/CRDN//78014-40/3/DAGDAS94
7	14AYT-SA	9535	YUBILEINAYA75/3/AGRI/BJY//VEE/4/PYN/BAU
8	14AYT-SA	9538	SHARK/F4105W2.1//CHAKINSKAYA 306
9	14AYT-SA	9554	BEZ1/VIVITSI
10	14AYT-SA	9555	BURBOT-6/5/PREDELA/4/C126- 15/COFN/3/N10B/P14//P101/6/SONMEZ
11	14AYT-SA	9576	BEZ1/TUKURU
12	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9903	KARAHAN-99
13	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9904	SONMEZ01
14	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9906	SHARK/F4105W2.1//QT6258 /3/SHARK/F4105W2.1
15	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9907	T67/X84W063-9- 45//KARL92/3/GUN91/MNCH/4/SAULESKU #44/TR810200
16	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9908	JCAM/EMU//DOVE/3/JGR/4/THK/5/BOEMA
17	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9910	ABI 86.3414/JGR//K92/3/PEWIT1/4/GK ARON/AGSECO 7846//2180 (OK99711)
18	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9911	LR64/IZ1813//09344/3/NO57/4/SUT66/5/SABALAN/6/BEZ
19	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9912	ATTILA*2/PBW65//YAKAR
20	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9915	ADMIS/5/SMB/HN4//SPN/3/WTS//YMH/HYS/4/SAB
21	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9918	W0405D/HGF112//W7469C/HCF012/3/MERCAN-2
22	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9920	MV DALMA//SHARK/F4105W2.1

ادامه جدول ۱

Row	Source	Ent. No.	Line
23	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9922	JCAM/EMU//DOVE/3/JGR/4/THK/5/BOEMA
24	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9927	SERI.1B*2/3/KAUZ*2/BOW//KAUZ/4/BECUNA-6
25	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9928	KARL//CTK/VEE/3/F1502W9.01/4/STEPHENS
26	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9929	VA01W-145/TX99D4628
27	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9930	AR800-1-3-1/WX03ARS0047
28	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9931	SWM866442/OK95548 F4:12
29	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	201	GEREK79
30	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	204	MUFITBEY
31	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	207	HBK0935W-24/KS84W063-9-34-3-2//KARL
32	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	209	SHARK/F4105W2.1//QT6258 /3/SHARK/F4105W2.1
33	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	216	ESKINA-10/GRISET-9
34	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	218	ID800994.W/FALKE//ERYT26221
35	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	220	WEEBILL1/NALIM-3//GALLYA-ARAL1
36	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	222	WEEBILL1/NALIM-3//GALLYA-ARAL1
37	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	226	KS920709-B-5-1-/CHAM6//1D13.1/MLT/3/SHI4414/CROW
38	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9932	W99-331/97x0906-8
39	16 <sup>th</sup> IWWYT -SA	9933	CO980829/TAM 111
40	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	226	KS920709-B-5-1-/CHAM6//1D13.1/MLT/3/SHI4414/CROW
41	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	266	TX71A983.4/TX69D4812//PYN/3/VPM/MOS83.11.4.8//PEW
42	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	267	TX71C8130R/TX81V6610/3/RL6010/6*INIA66//KAUZ/4/PE
43	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	276	1-8188//1603/Tonichi81/4/885K4.1//MNG/SDV1/3/1D13.1/M
44	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	277	TX71A983.4/TX69D4812//PYN/3/VPM/MOS83.11.4.8//PEW
45	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	278	TX71A983.4/TX69D4812//PYN/3/VPM/MOS83.11.4.8//PEW
46	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	282	JCAM/EMU//DOVE/3/JGR/4/THK/5/BOEMA
47	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	291	W0405D/HGF112//W7469C/HCF012/3/MERCAN-2
48	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	295	JCAM/EMU//DOVE/3/JGR/4/THK/5/BOEMA
49	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	296	ATTILA*2/PBW65//YAKAR
50	21 <sup>th</sup> FAWWON-SA	299	KARL//CTK/VEE/3/F1502W9.01/4/STEPHENS

دیم و نیز ارقام استاندارد گندم بعنوان کنترل انجام شد.

### مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از تعداد ۵۰ ژنوتیپ انتخابی از خزانه‌های بین‌المللی گندم که از سازگاری مناسبی برای کشت

این تحقیق با استفاده از ۹ جفت آغازگر اختصاصی مکان‌های ژنی (*VRN-A1*، *VRN-B1* و *VRN-D1*) و (*VRN-B3*) با هدف بررسی تنوع آللی در مکان‌های ژنی مذکور جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در تعداد ۵۰ ژنوتیپ شامل ارقام و لاین‌های گندم سازگار برای کشت در شرایط

رنگ آمیزی قطعات به وسیله اتیدیوم بروماید و آشکارسازی در زیر اشعه UV انجام شد.

### نتایج و بحث

با تکمیل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و بر اساس اندازه باندهای مورد انتظار برای هر یک از ال‌ها در مکان‌های ژنی مورد ارزیابی نوع ال‌ شناسائی و ترکیب ال‌های ژنی (*VRN-1*) و (*VRN-B3*) در هر یک از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تعیین شد.

#### نوع در ناحیه پروموتوری *VRN-1*

آغازگرهای (*VRN1-INT1R* و *VRN1AF*) قطعات مورد نظر در ناحیه پروموتوری ژن (*VRN-A1*) را تکثیر می‌نمایند. این نشانگر آل‌های (*vrn-A1*) و (*Vrn-A1c*) را از آل‌های (*Vrn-A1b*) و (*Vrn-A1a*) تشخیص داده اما قادر نیست آل‌ مغلوب (*vrn-*) را از ال‌ غالب (*Vrn-A1c*) متمایز کند. تولید دو باند به اندازه‌های ۹۶۵ و ۸۷۶ جفت بازی نشان‌دهنده حضور آل‌ (*Vrn-A1a*) و تکثیر یک باند ۷۱۴ جفت بازی بیانگر حضور آل‌ (*Vrn-A1b*) در ژنوتیپ مورد نظر است (شکل-۱).

در شرایط دیم در اقلیم‌های مختلف کشور برخوردار هستند (جدول-۱). تنوع آل‌های مکان ژنی (*VRN-1*) و (*Vrn-B3*) با استفاده از تعداد ۹ جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده توسط شرکت Genaray ارزیابی و تعیین شد (جدول-۳).

استخراج DNA از برگ‌های جوان و تازه با استفاده از روش دلاپورتا انجام گرفت. کیفیت سنجی DNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. توالی‌های مورد استفاده آغازگرها و دمای اتصال آن‌ها در جدول ۲ آورده شده است. تکثیر توالی‌ها در دستگاه PCR BioRad با ۳۰ چرخه تکثیر برای هر کدام از واکنش‌ها انجام شد (جدول-۲).

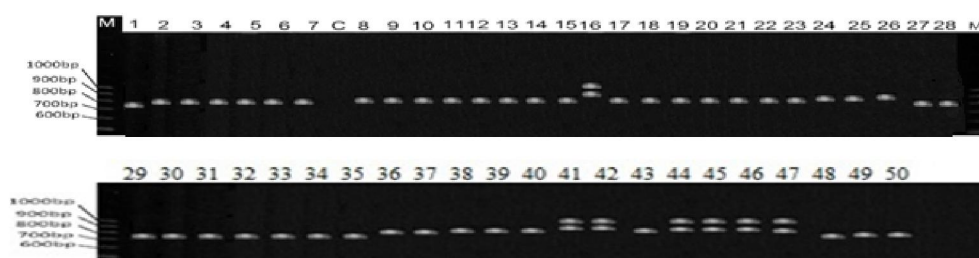
واکنش‌های PCR در حجم نهائی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو، یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase، ۱۰۰ میکرومولار از هر کدام از dATP، dTTP، dGTP و dCTP، ۷۵ میلی مولار Tris-HCL، pH 8.8، ۱/۵ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۱۰ پیکومول از آغازگرها انجام شد. قطعات DNA تکثیر شده در دستگاه PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد از همدیگر تفکیک شدند.

جدول ۲- برنامه چرخه دمایی نشانگر اختصاصی

تعداد چرخه	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	مراحل
۱	۹۴	۱۰ دقیقه	واسرشت سازی اولیه
۳۰	۹۴	۴۵ ثانیه	واسرشت سازی
۳۰	جدول ۳	۴۵ ثانیه	اتصال آغازگر
۳۰	۷۲	۶۰ ثانیه	تکثیر
۱	۷۲	۵ دقیقه	تکثیر نهایی

جدول ۳- مشخصات توالی آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی تنوع اللی در مکان‌های ژنی VRN

ردیف	نام آغازگر	توالی	دمای اتصال	تعداد نوکلئوتید
۱	VRN 1AF	GAAAGGAAAAATTCTGCTCG	۵۰	۲۰
	VRN1-INT1R	GCAGGAAATCGAAATCGAAG	۵۰	۲۰
۲	Intr1/A/F2	AGCCTCCACGGTTTGAAAGTAA	۵۶	۲۲
	Intr1/A/R3	AAGTAAGACAACACGAATGTGAGA	۵۶	۲۴
۳	Intr1/C/F	GCACTCCTAACCCACTAACC	۵۸	۲۰
	Intr1/AB/R	TCATCCATCATCAAGGCAAA	۵۸	۲۰
۴	Intr/B/F	CAAGTGGAACGGTTAGGACA	۶۳	۲۰
	Intr1/B/R3	CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA	۶۳	۲۳
۵	Intr/B/F	5-CAAGTGGAACGGTTAGGACA-3	۵۸	۲۰
	Intr1/B/R4	CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA	۵۸	۲۲
۶	Intr/D/F	5-GTTGTCTGCCTCATCAAATCC-3	۶۵	۲۱
	Intr1/D/R3	GGTCACTGGTGGTCTGTGC	۶۵	۱۹
۷	Intr/D/F	GTTGTCTGCCTCATCAAATCC	۶۳	۲۱
	Intr1/D/R4	5-AAATGAAAAGGAACGAGAGCG	۶۳	۲۱
۸	VRN4-B-INS-F	CATAATGCCAAGCCGGTGAGTAC	۶۳	۲۳
	VRN4-B-INS-R	ATGTCTGCCAATTAGCTAGC	۶۳	۲۰
۹	VRN4-B-NOINS-F	ATGCTTTCGCTTGCCATCC	۵۷	۱۹
	VRN4-B-NOINS-R	CTATCCCTACCGGCCATTAG	۵۷	۲۰



شکل ۱- قطعات تکثیر شده از PCR برای جفت آغازگر VRN1AF/VRN1-INT1R

جفت بازی توسط این نشانگر بیانگر حضور یکی از ال‌های *vrn-1* یا *Vrn-1c* است بدون اینکه بتواند این دو ال را از یکدیگر تمیز دهد (شکل-۱). از بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی ال‌های *Vrn-1a* و *Vrn-1b* به ترتیب در تعداد ۷ و ۱۳ ژنوتیپ تشخیص داده شدند. همچنین تعداد ۳۰ ژنوتیپ حامل ال‌های قابل شناسایی توسط این نشانگر بودند (جدول-۵). یان و همکاران (۲۰۰۴b)

جفت بازی توسط این نشانگر بیانگر حضور یکی از ال‌های *vrn-1* یا *Vrn-1c* است بدون اینکه بتواند این دو ال را از یکدیگر تمیز دهد (شکل-۱). از بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی ال‌های

ژنوتیپ وجود آلل غالب (*Vrn-A1a*) را تأیید کردند. در مطالعه دیگری ۳۰ رقم گندم زمستانه مورد بررسی همگی حامل آلل مغلوب (*vrn-A1*) بودند و همه ۱۳ رقم بهاره آلل غالب (*Vrn-A1a*) را داشتند (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۸؛ نواک و کوالکزیچ، ۲۰۱۰).

در مطالعه ارقام گندم مشاهده کردند که از بین لاین های دارای تیپ رشد بهاره، ۵۵٪ حامل آلل (*Vrn-*) *A1a* و فقط ۶٪ آلل (*Vrn-A1b*) هستند. آنها در بقیه لاین های مورد مطالعه خود حضور آلل مغلوب (*vrn-A1*) را گزارش کردند. اقبال و همکاران (۲۰۰۷) با مطالعه ۴۰ رقم و لاین گندم بهاره، در ۳۴

جدول ۴- پرایمرهای طراحی شده در واکنش PCR برای تفکیک آلل های *Vrn*

ردیف	مارکر	پرایمر	آلل های قابل شناسایی	طول باندهای قابل تکثیر
۱	VRN-A1 promoter region	VRN1AF VRN1-INT1R	( <i>VrnA1a</i> , <i>VrnA1b</i> , <i>vrnA1c</i> , <i>vrnA1</i> )	714bp = <i>VrnA1b</i> 875,965bp = <i>VrnA1a</i> 734bp = <i>vrnA1</i> , 734bp = <i>vrnA1c</i>
۲	VRN-A1 deletion	Intr1/A/F2 <i>Intr1/A/R3</i>	( <i>Vrn-A1c</i> )	1170 bp
۳	VRN-A1 Non deletion	Intr1/C/F Intr1/AB/R	<i>vrn-A1</i>	1068 bp
۴	TDB VRN-B1 deletion	Intr/B/F Intr1/B/R3	<i>Vrn-B1</i>	709 bp
۵	VRN-B1 Promoter region	Intr/B/F Intr1/B/R4	<i>vrn-B1</i>	1149 bp
۶	TDE VRN-D1 deletion	Intr/D/F Intr1/D/R3	<i>Vrn-D1</i>	1671 bp
۷	VRN-D1 None deletion	Intr/D/F Intr1/D/R4	<i>vrn-D1</i>	997 bp
۸	VRN-B3 marker	VRN4-B-INS-F VRN4-B-INS-R	<i>Vrn-B3</i>	1200bp
۹	VRN-B3 marker	VRN4-B-NOINS-F VRN4-B-NOINS-R	<i>vrn-B3</i>	1140 bp 1

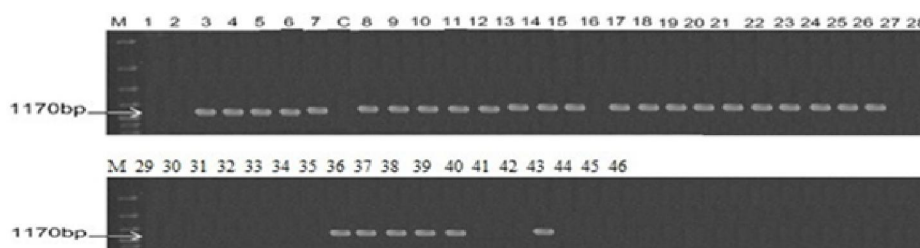
نشانهگر حذفی ناحیه *VRN-A1* (*INTR1/A/R3* و *INT1A/F2*) از طریق تشخیص تفاوت در ناحیه حذفی واقع در اینترون اول ژن (*VRN-A1*) را فراهم می کند. تکثیر باند ۱۱۷۰ جفت

#### نشانهگر حذفی ناحیه *VRN-A1*

این نشانهگر شناسایی و تمایز آلل غالب (*Vrn-*) *A1c* را از آلل مغلوب (*vrn-A1*) توسط آغازگر

(۲۰۱۱) نیز با بررسی تنوع آللی در مکان ژنی (*VRN-*) در تعداد ۵۹ ژنوتیپ گندم بهاره شرکت کننده در آزمایشات پیشرفته آلل (*Vrn-A1c*) را مشاهده کردند. یان و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی تنوع آللی گندم نان علاوه بر آلل (*VRN-A1a* و *VRN-A1b*) وجود آلل جدیدی به نام (*Vrn-A1c*) را با مشاهده باند ۱۱۷۰ bp جفت بازی گزارش کردند.

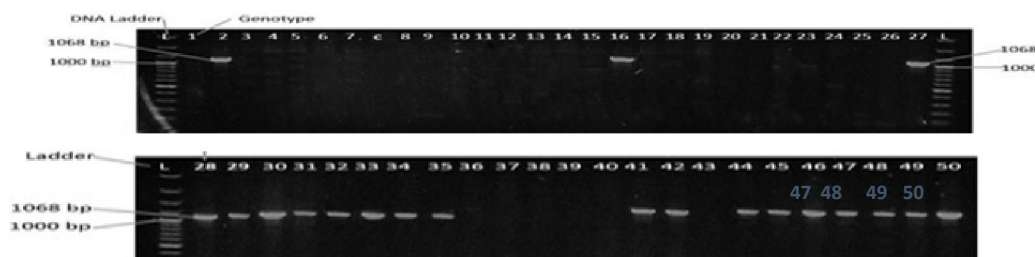
بازی نشان دهنده وجود آلل غالب (*Vrn-A1c*) و عدم تکثیر باند فوق نشان دهنده وجود آلل مغلوب (*vrn-A1*) می باشد. ژنوتیپ های مورد بررسی توسط این نشانگر نشان داد که از تعداد ۳۰ ژنوتیپ که احتمالا دارای یکی از الی های (*Vrn-A1c*) یا (*vrn-*) هستند، تعداد ۲۹ ژنوتیپ حامل آلل (*Vrn-A1c*) بوده و تنها ژنوتیپ شماره ۲ حامل آلل (*vrn-A1*) تشخیص داده شد (شکل-۲).



شکل ۲- قطعات تکثیر شده از PCR برای جفت آغازگر INT1A/F2 و Intr1/A/R3

۱۰۶۸ جفت بازی مشاهده شد که نشان می دهد این ۲۱ ژنوتیپ فاقد آلل (*Vrn-A1c*) می باشند و ۲۹ ژنوتیپ (۵۸ درصد) دیگر دارای آلل (*Vrn-A1c*) هستند که این یافته نتایج مربوط به نشانگرهای مارکر ناحیه پروموتری (*VRN-1*) و ناحیه حذفی (*VRN-*) (*A1*) را تأیید می کند.

**مارکر غیر حذفی ناحیه پروموتر *Vrn-A1***  
جفت پرایمر (*Intr1/AB/R* و *Intr1/C/F*) برای شناسایی و تکثیر نواحی از DNA که هیچ گونه حذفی در ناحیه پروموتر و ایترون نداشته به کار می رود. وجود یک باند ۱۰۶۸ جفت بازی نشان دهنده امکان وجود تمام آلل ها به جز آلل (*Vrn-*) (*A1c*) است، در تعداد ۲۱ ژنوتیپ مورد بررسی باند



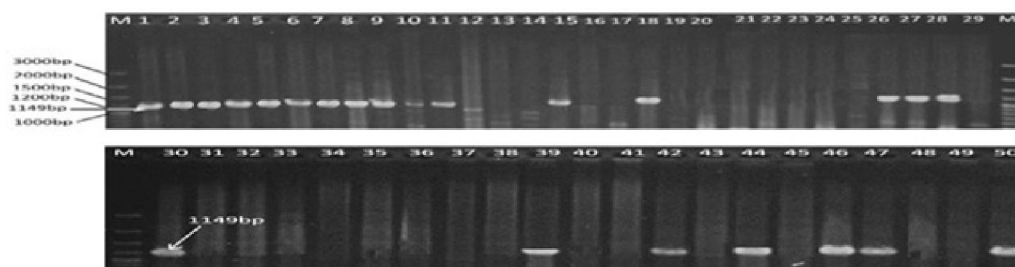
شکل ۳- قطعات تکثیر شده از PCR برای جفت آغازگر Intr1/AB/R و Intr1/C/F



نظر دارای آلل (*vrn-B1*) بوده و عدم تکثیر باند نشان دهنده آلل (*Vrn-B1*) می‌باشد. در ژنوتیپ‌های ۱ تا ۹ و ژنوتیپ‌های ۱۵، ۱۸، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۳۰، ۳۹، ۴۲، ۴۴، ۴۶، ۴۷ و ۵۰ یک قطعه ۱۱۴۹ مشاهده شد که نشان دهنده حضور آلل (*vrn-B1*) در ژنوتیپ‌های فوق می‌باشد.

### نشانهگر پروموتور ناحیه VRN-B1

تنوع آللی موجود در ناحیه پروموتور ژن (*VRN-*) (*B1*) با استفاده از جفت پرایمر (*Intr1/B/F*) و (*Intr1/B/R4*) مورد تکثیر قرار گرفت. این آغازگر نشان‌دهنده عدم حذف‌شدگی در منطقه اینترون است که آلل مغلوب (*vrn-B1*) را تکثیر می‌کند. در صورت تولید باند ۱۱۴۹ جفت باز ژنوتیپ مورد



شکل ۴- قطعات تکثیر شده از PCR برای جفت آغازگر *Intr1/B/R4* و *Intr1/B/F*

آنالیز ترکیبات آللی (*VRN-I*) در ارقام گندم حذف در اولین اینترون از ژن (*Vrn-B1*) را در تعداد ۲۰ ژنوتیپ شناسایی کردند. درخشان و همکاران (۲۰۱۲) تنوع آللی در منطقه پروموتور ژن (*VRN-B1*) را در ۳۹۵ ژنوتیپ بومی گندم ایرانی با استفاده از آغازگرهای (*VRNIBF* و *VRNIR*) مطالعه کردند که ۸۰ ژنوتیپ آلل غالب (*Vrn-B1*) را دارا بودند.

### نشانهگر پروموتور ناحیه VRN-D1

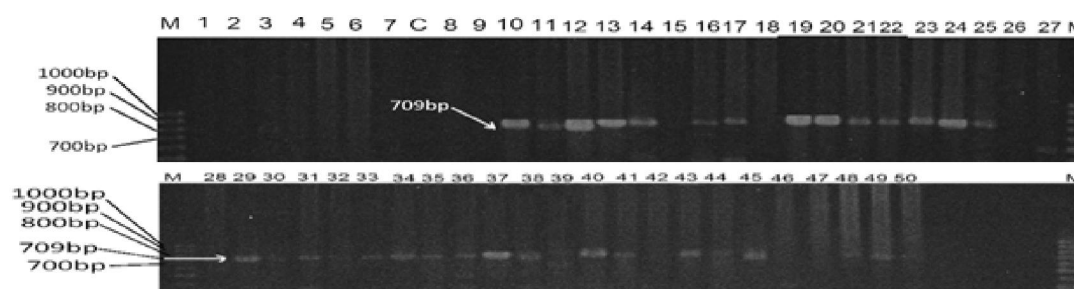
آغازگر (*Intr1/D/R4* و *Intr1/D/F*) توالی‌هایی را تکثیر می‌کند که هیچ گونه حذفی در اولین اینترون مربوط به جایگاه (*VRN-D1*) در آن صورت نگرفته باشد. این آغازگر قطعه‌ای به طول bp ۹۹۷ در ژنوتیپ‌های که دارای آلل مغلوب (*vrn-*) (*DI*) هستند را تکثیر می‌کند. عدم تکثیر باند نشان دهنده آلل (*Vrn-D1*) می‌باشد. در ژنوتیپ‌های ۳، ۸، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۲۲، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۴۳، ۴۵، ۴۸ و ۴۹

### مارکر حذفی پروموتور ناحیه VRN-B

جفت آغازگر اختصاصی ژنوم B (*Intr1/B/F*) و (*Intr1/B/R3*) با مارکر حذفی پروموتور ناحیه (*VRN-B1*) می‌باشد که برای شناسایی حذف بزرگ در ناحیه اینترون آلل غالب (*Vrn-B1*) به کار می‌رود. وجود یک باند ۷۰۹ جفت بازی نشان دهنده حضور آلل (*Vrn-B1*) و عدم تکثیر باند نشان دهنده حضور آلل (*vrn-B1*) می‌باشد. نتایج این نشانگر داده‌های نشانگر پروموتور ناحیه (*VRN-B1*) را تأیید کرد. به طوری که در ژنوتیپ‌های ۱ تا ۹ و ژنوتیپ‌های ۱۵، ۱۸، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۳۰، ۳۹، ۴۲، ۴۴، ۴۶، ۴۷ و ۵۰ قطعه تکثیری ژن مورد نظر مشاهده نشد لذا دارای آلل (*vrn-B1*) که نشان‌دهنده تیپ رشد زمستانه است می‌باشند. در سایر ژنوتیپ‌ها مشاهده باند ۷۰۹ جفت بازی موید حضور آلل (*Vrn-B1*) بود که نشان‌دهنده تیپ رشد بهاره می‌باشد. فو و همکاران (۲۰۰۵) در

استفاده کردند. در ۵ ژنوتیپ بومی (۲ ژنوتیپ زمستانه، دو ژنوتیپ اختیاری و یک ژنوتیپ بهاره)، قطعه ۱۲۰۰ جفت باز تکثیر شد که احتمال اضافه شدگی در منطقه پروموتور ژن (*VRN-1*) در ژنوم *D* این ژنوتیپها را نشان می‌دهد.

تکثیر شده ژن مورد نظر مشاهده نشد لذا دارای آلل (*Vrn-D1*) هستند ولی برای سایر ژنوتیپها مشاهده باند ۹۹۷ جفت بازی موید حضور آلل (*vrn-D1*) بود. درخشان و همکاران (۲۰۱۲) از جفت آغازگر (*VRN1DR* و *VRN1DF*) برای تکثیر منطقه راه انداز ژن (*VRN-1*) ژنوم *D* ژنوتیپهای بومی گندم ایرانی



شکل ۵- قطعات تکثیر شده از PCR برای جفت آغازگر *Intr1/B/R3* و *Intr1/B/F*

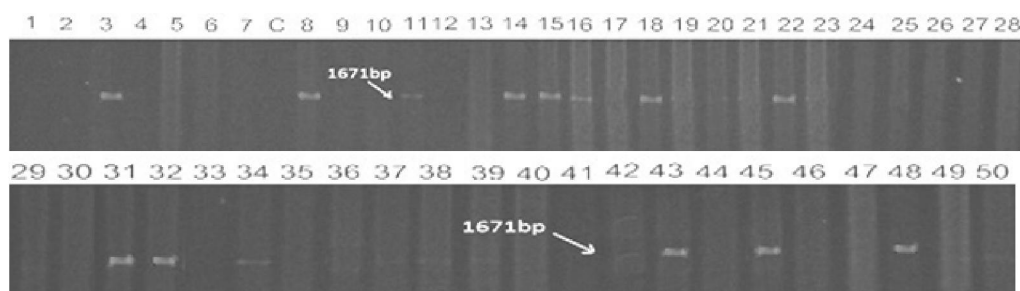


شکل ۶- قطعات تکثیر شده از PCR برای جفت آغازگر *Intr1/D/R4* و *Intr1/D/F*

ژنوتیپها این قطعه تکثیر نشده بنابراین دارای آلل (*vrn-D1*) می‌باشند. اقبال و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که محصولات PCR تکثیر شده با آغازگرهای (*Intr1/D/R3* و *Intr1/D/F*) (آغازگرهای *Vrn-D1*) باندهای ۱۶۷۱ جفت بازی در ۳۵ رقم یا لاین تولید کردند که حضور آلل تیپ رشد بهاره در مکان ژنی (*Vrn-D1*) را نشان می‌دهد. در ۲۴ ژنوتیپ دیگر هیچ تکثیری صورت نگرفت که نشان‌دهنده حضور آلل تیپ رشد زمستانه در مکان ژنی (*Vrn-D1*) است.

### مارکر حذفی ناحیه پروموتور *VRN-D1*

این پرایمر آلل غالب (*Vrn-D1*) را تکثیر می‌کند و مارکر حذفی منطقه (*VRN-D1*) می‌باشد که برای شناسایی آلل غالب (*Vrn-D*) به کار برده می‌شود. تولید باند ۱۶۷۱ جفت بازی نشان دهنده وجود آلل (*Vrn-D1*) و عدم تکثیر باند نشان دهنده آلل (*vrn-D1*) می‌باشد. ژنوتیپهای ۳، ۸، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۲۲، ۳۱، ۳۲، ۴۳، ۴۵ و ۴۸ یک باند ۱۶۷۱ جفت بازی مشاهده شد که نشان‌دهنده حضور آلل (*Vrn-D1*) در ژنوتیپهای فوق است ولی برای سایر

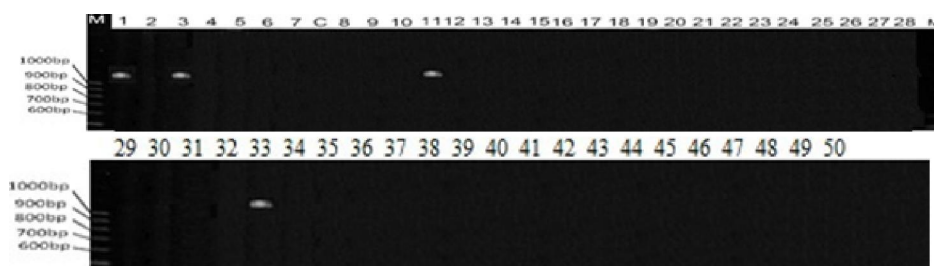


شکل ۷- قطعات تکثیر شده از PCR برای جفت آغازگر Intr1/D/R3 و Intr1/D/F در ژنوتیپ مورد بررسی

هستند ولی برای سایر ژنوتیپ‌ها قطعه مورد نظر تکثیر نشد، لذا دارای آلل (Vrn-B3) می‌باشند. درخشان و همکاران (۲۰۱۲) فقدان آلل غالب (Vrn-B3) را با استفاده از جفت آغازگرهای (VRN4-B- NOINS-) و (VRN4-B-NOINS-R) تایید کردند و یک قطعه ۱۱۴۰ جفت بازی از آلل مغلوب (vrn-B3) در ۳۶۶ ژنوتیپ مشاهده کردند. ژنوتیپ بومی گندم Sabzevar8 برای آلل (Vrn-B3) در مکان‌های ۱۱۴۰ و ۱۳۰۰ جفت باز هتروزیگوت بودند.

### مارکر ناحیه پروموتور Vrn-B3

وجود یک باند ۱۱۴۰ جفت بازی نشان دهنده وجود آلل مغلوب (vrn-B3) و عدم تکثیر باند نشان دهنده آلل غالب (Vrn-B3) می‌باشد. (VRN-B3) یک آلل غالب برای ارقام با تیپ رشد بهاره می‌باشد و در روی بازوی کروموزوم 7BS واقع شده است. آلل غالب (Vrn-B3) در نتیجه الحاق رتروترانسپوزانهایی در ناحیه پروموتور مشابه با ژن FT در آراییدوپسیس است (یان و همکاران، ۲۰۰۶). برای ژنوتیپ‌های ۱، ۳، ۴، ۱۱ و ۳۳ یک باند ۱۱۴۰ تکثیر شد که این ژنوتیپ‌ها دارای آلل مغلوب (vrn-B3)



شکل ۸- قطعات تکثیر شده از PCR برای جفت آغازگر VRN4-B-NOINS-R و VRN4-B-NOINS-F

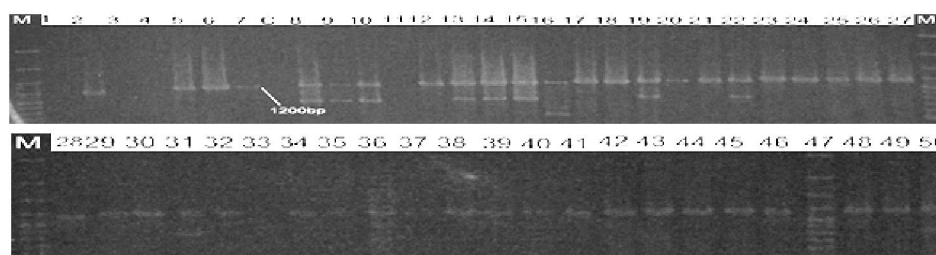
جفت باز را نشان دادند که بیانگر آلل مغلوب (vrn-B3) است. همچنین در یک بررسی در تمام ارقام گندم بهاره پاکستانی یک قطعه ۱۱۴۰ جفت بازی تکثیر شد که مشخصه آلل (vrn-B3) می‌باشد (اقبال و همکاران، ۲۰۱۱).

تکثیر آلل‌های جدید در نژادهای بومی ایرانی ممکن است به دلیل اضافه شدن رتروترانسپوزون‌های جدید در منطقه راه‌انداز ژن (VRN-B3) باشد که قبلاً گزارش نشده است. ژانگ و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی تنوع آللی ژن (VRN-B3) از بین ۲۷۸ رقم گندم در چین ۲۷۶ رقم، یک باند با طول ۱۱۴۰

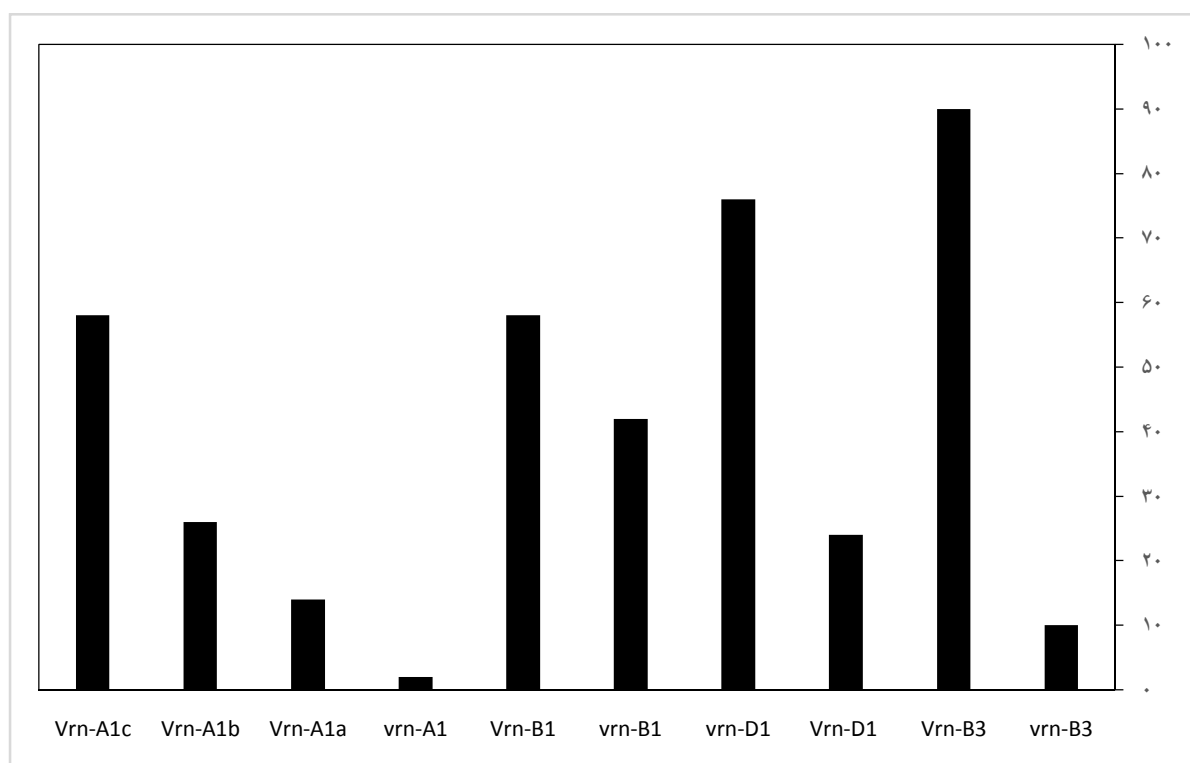
شد لذا دارای آلل (*Vrn-B3*) می‌باشند. اقبال و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که آغازگرهای *VRN4-B-INS-F* و *VRN4-B-INS-R* موفق به تکثیر هیچ محصول PCR در تمامی ارقام یا لاین‌ها نشدند که این امر بیانگر عدم حضور آلل تیپ رشد بهاره در مکان ژنی (*Vrn-B3*) می‌باشد.

### مارکر حذفی ناحیه پروموتور *Vrn-B3*

این جفت آغازگر در ژنوتیپ‌های که دارای آلل غالب (*Vrn-B3*) هستند قطعاتی به طول ۱۲۰۰ جفت باز تولید می‌کند. برای ژنوتیپ‌های ۱، ۳، ۴، ۱۱ و ۳۳ قطعه مورد نظر مشاهده نشد لذا دارای آلل مغلوب (*vrn-B3*) هستند ولی برای سایر ژنوتیپ‌ها در ۱۲۰۰ جفت باز قطعه مورد نظر تکثیر



شکل ۹- قطعات تکثیر شده از PCR برای جفت آغازگرهای *VRN4-B-INS-R* و *VRN4-B-INS-F*



شکل ۱۰- مقایسه فراوانی آلل‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

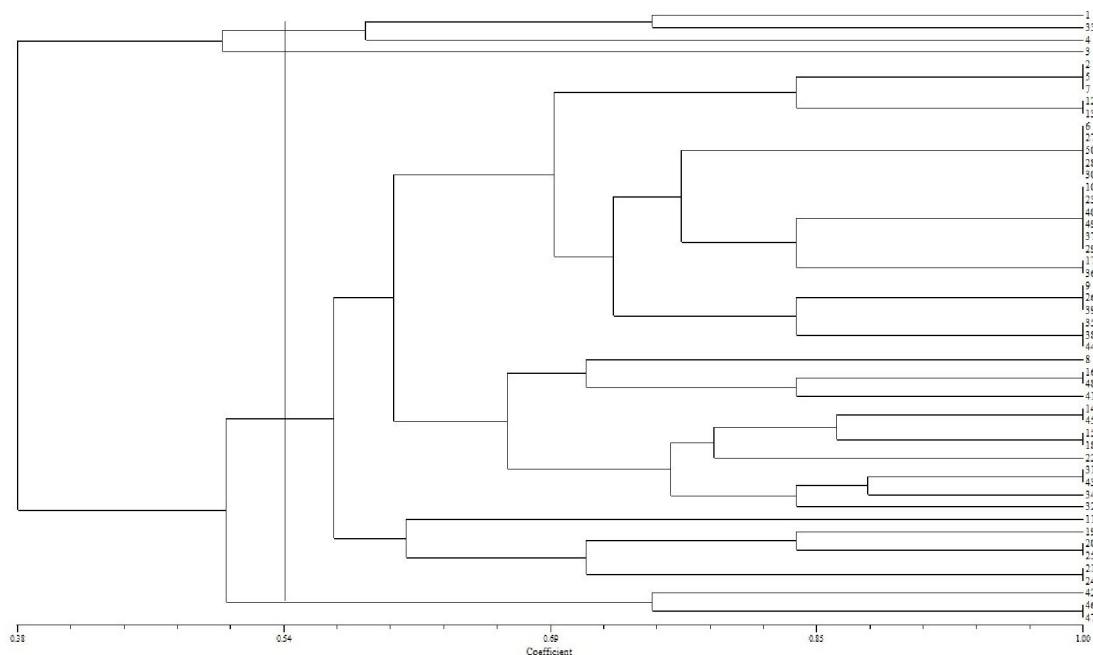
جدول ۵- ترکیب آللی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

ژنوتیپ	VRN-A1	VRN-B1	VRN-D1	VRN-B3
1	<i>Vrn-A1b</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>
2	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
3	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>
4	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>
5	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
6	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
7	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
8	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
9	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
10	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
11	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>
12	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
13	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
14	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
15	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
16	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
17	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
18	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
19	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
20	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
21	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
22	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
23	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
24	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
25	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
26	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
27	<i>Vrn-A1b</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
28	<i>Vrn-A1b</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
29	<i>Vrn-A1b</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
30	<i>Vrn-A1b</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
31	<i>Vrn-A1b</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
32	<i>Vrn-A1b</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
33	<i>Vrn-A1b</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>
34	<i>Vrn-A1b</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
35	<i>Vrn-A1b</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
36	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
37	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
38	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
39	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
40	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
41	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
42	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
43	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
44	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
45	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
46	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
47	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
48	<i>Vrn-A1b</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
49	<i>Vrn-A1b</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>
50	<i>Vrn-A1b</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Vrn-B3</i>

## تجزیه کلاستر

ماتریس مورد نظر بر اساس داده‌های صفر و یک حاصل از تکثیر آغازگرها بر روی DNA ژنومی به دست آمد. تجزیه کلاستر با استفاده ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA حاصل شد و دندروگرام مربوطه رسم شد. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در چهار گروه مجزا طبقه‌بندی شدند. آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش تا اندازه‌ای توانستند ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را از نظر تیپ رشدی در گروه‌های مجزا قرار دهند دلیل احتمالی

پایین بودن تطابق بین تیپ رشد و نتایج مارکر در تعداد اندکی از ژنوتیپ‌ها، می‌تواند تعدد و نحوه اثر اپیستاتیک آلل‌ها باشد. ژنوتیپ شماره ۱ که تنها ژنوتیپ با رشد زمستانه است با فاصله زیاد از اکثر ژنوتیپ‌ها قرار گرفت و ژنوتیپ‌های با تیپ رشد بهاره نیز همه در یک گروه قرار گرفتند لذا این آغازگرها برای تشخیص تیپ رشدی ژنوتیپ‌های گندم نان توصیه می‌شوند.



شکل ۱۱- دندروگرام حاصل از ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA

می‌توان ژنوتیپ‌های مختلف گندم را از نظر تیپ رشدی در مراحل اولیه رشد، بدون استفاده از روش‌های زمان‌بر مزرعه‌ای گزینش کرد. همچنین آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش توانستند تا اندازه‌ای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را از نظر تیپ رشدی در گروه‌های مجزا قرار دهند دلیل احتمالی پایین بودن تطابق بین تیپ رشد و نتایج مارکر در

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تنوع آلی قابل ملاحظه‌ای در جایگاه ژنی *VRN* در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود دارد. از این تنوع می‌توان به عنوان منبع ارزشمند در شناسایی تیپ رشد ژنوتیپ‌های مختلف گندم بهره برد و در جهت انتخاب ارقام با تیپ رشد مناسب اقدام نمود. با پیدا کردن رابطه‌ی دقیق بین آلل‌ها و صفت تیپ رشدی

می‌شود (شیندو و ساساکوما، ۲۰۰۰). علاوه بر این، ترکیب آلل‌های مختلف *Vrn* باعث تفاوت در زمان گلدهی، طول دوره رشد، ارتفاع گیاه و عملکرد گندم نیز می‌شوند. ارقام گندم با آلل‌های غالب *Vrn-AI* (نسبت به بقیه ارقام زودرس‌تر هستند، در حالی که ارقام گندم با آلل‌های *Vrn-B1* و *Vrn-D1*) در شرایط بدون ورنالیزاسیون به ترتیب دیر رس‌تر هستند. حضور دو آلل (*VRN-AI* و *VRN-B1*) باعث زودرسی و عملکرد بالا می‌شود در حالی که حضور هر سه آلل غالب *Vrn* باعث کاهش طول دوره رشد می‌شود که این امر به کاهش عملکرد نیز منجر می‌شود. مطالعات نشان داده است که ترکیب آللی (*Vrn-D1* و *Vrn-B1*، *Vrn-A1a*) زودرسی و نیز کاهش عملکرد ارقام گندم را در پی دارد (گونچارو، ۲۰۰۴). ژنوتیپ شماره ۱ با ترکیب آللی (*Vrn-B3*، *vrn-D1*، *vrn-B1* و *vrn-A1b*)، دارای تیپ رشد زمستانه بوده و نیاز به بهاره‌سازی دارد. ژنوتیپ‌های شماره ۱۴، ۱۶، ۲۲، ۳۱، ۳۲، ۴۳، ۴۵ و ۴۸ هر سه آلل (*Vrn-1*) را به صورت غالب دارند و تیپ رشدی متمایل به بهاره خواهند داشت این ژنوتیپ‌ها احتمالاً کمترین طول رشد را دارند اما این کم بودن طول رشد با کاهش عملکرد نیز همراه خواهد بود. ژنوتیپ‌های شماره ۳ و ۴ با ترکیب آللی (*vrn-B3*، *vrn-B1*) و در دو مکان دیگر غالب، ژنوتیپ‌های ۲، ۵، ۶، ۷، ۹، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۳۰، ۳۹، ۴۲، ۴۴، ۴۶، ۴۷ و ۵۰ با ترکیب آللی (*vrn-D1* و *vrn-B1*) و در دو مکان دیگر غالب، بقیه ژنوتیپ‌ها که تنها در یک مکان ژنی دارای آلل مغلوب و در ۳ مکان دیگر غالب هستند احتمالاً نیاز به بهاره‌سازی ندارند یا دارای تیپ رشد بینابینی هستند.

تعداد اندکی از ژنوتیپ‌ها، می‌تواند تعدد و نحوه اثر اپیستاتیک آلل‌ها باشد. لذا این آغازگرها برای تشخیص تیپ رشدی ژنوتیپ‌های گندم نان و تعیین تنوع آللی مکان ژنی *VRN* قابل توصیه هستند.

### نتیجه‌گیری کلی

این تحقیق تنوع ژنتیکی بالایی را در مکان‌های ژنی مورد بررسی به نمایش گذاشت، به طوری که در مکان ژنی (*VRN-AI*) آلل (*Vrn-A1c*) (۵۸٪) دارای بیشترین فراوانی بود و آلل (*vrn-A1*) (۲٪) دارای کمترین فراوانی بود. فراوانی آلل (*Vrn-A1b*) (۲۶٪) از فراوانی آلل (*Vrn-A1a*) (۱۴٪) بیشتر بود و از فراوانی آلل (*Vrn-A1c*) (۵۸٪) کمتر بود. در مکان ژنی (*VRN-B1*) آلل (*Vrn-B1*) (۵۸٪) دارای فراوانی بیشتری نسبت به آلل (*vrn-B1*) (۴۲٪) بود. در مکان ژنی (*VRN-D1*) آلل (*vrn-D1*) (۷۶٪) دارای فراوانی بیشتری نسبت به آلل (*Vrn-D1*) (۲۴٪) بود. در مکان ژنی (*VRN-B3*) آلل (*Vrn-B3*) (۹۰٪) دارای فراوانی بیشتری نسبت به آلل (*vrn-B3*) (۱۰٪) بود (شکل-۱۰).

وجود آلل‌های هموزیگوت مغلوب در هر سه جایگاه ژنی (*VRN-AI*، *VRN-B1* و *VRN-D1*) باعث تیپ رشدی زمستانه می‌شود. (پوجسلی، ۱۹۷۲). آلل غالب (*VRN-AI*) با عدم حساسیت به ورنالیزاسیون همراه می‌باشد، اما ژنوتیپ‌های گندم حامل آلل‌های (*VRN-B1* و *VRN-D1*) تا اندازه‌ای نسبت به ورنالیزاسیون حساسیت دارند همچنین ژن (*VRN-AI*) نسبت به ژن‌های (*VRN-B1* و *VRN-D1*) حالت اپی‌استاتیک دارد و روی آن‌ها اثر گذاشته و باعث کاهش حساسیت به ورنالیزاسیون

آمده می‌تواند اصلاحگران گندم را جهت اصلاح گندم‌های با ترکیب آلی مناسب کمک کند تا بتوانند ارقامی مناسب با شرایط اقلیمی مناطق هدف به ویژه از نظر تحمل یا مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده محیطی تولید نمایند.

شناسایی تنوع آلی مکان‌های ژنی Vrn اطلاعات مفیدی در باره تیپ‌رشدی و زمان گلدهی این ژنوتیپ‌ها فراهم خواهد آورد. نتایج نشان می‌دهد که با تجمع ترکیب مناسبی از آلل‌های اختصاصی Vrn رسیدن به تیپ رشدی مورد نظر و تنظیم زمان رسیدن مطلوب ممکن می‌باشد. اطلاعات به دست

## منابع

- Barron C, Surget A, Rouau X. 2007. Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticumaestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal Science*, 45: 88-96.
- Derakhshan B, Mohammadi SA, Moghaddam M, Kamali J. 2013. Molecular characterization of vernalization genes in Iranian wheat landraces. *Crop Breeding Journal*, 3(1), 1-11.
- Fu D, Szücs P, Yan L, Helguera M, Skinner J.S, Von Zitzewitz J, Hayes PM. and Dubcovsky J. 2005. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, vol. 273, no. 1, p. 54-65.
- Golovnina K A, Kondratenko EY, Blinov AG, Goncharov NP. 2010. Molecular characterization of vernalization loci VRN1 in wild and cultivated wheats. *BMC plant biology*, 10(1), 168.
- Iqbal M, Navabi A, Yang RC, Salmon DF, Spaner D. 2007. Molecular characterization of vernalization response genes in Canadian spring wheat. *Genome*, 50(5), 511-516.
- Iqbal M, Shahzad A, Ahmed I. 2011. Allelic variation at the Vrn-A1, Vrn-B1, Vrn-D1, Vrn-B3 and Ppd-D1a loci of Pakistani spring wheat cultivars. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(1), 1-2.
- Iqbal M, Shahzad A, Ahmed I. 2010. Allelic variation at the *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3* and *Ppd-D1a* loci of Pakistani spring wheat cultivars.
- Nowak M, Kowalczyk K. 2010. Allelic variation at the VRN-1 locus of Polish cultivars of common wheat (*Triticumaestivum*L.). *Acta BiologicaCracoviensia Series Botanica*,
- Pugsley AT. 1971. A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat. *Crop and Pasture Science*, 22(1), 21-31.
- Pugsley AT. Additional genes inhibiting winter habit in wheat, *Euphytica*, 1972, vol. 21: 547-552.
- Yan L, Helguera M, Kato K, Fukuyama S, Sherman J, Dubcovsky J. 2004b. Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploidwheat. *Theoretical and applied genetics*, 109(8), 1677-1686.
- Yan L, Loukoianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, SanMiguel P, Dubcovsky J. 2004a. The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science*, 303(5664), 1640-1644
- Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J. 2003. Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1.-2003. *Proc. Natl. Acad. Sci.-USA.-100.-P*, 6263-6268.



- Yan L, Fu D, Li C, Blechl A, Tranquilli G, Bonafede M, Sanchez A, Valarik M, Yasuda S, Dubcovsky J. 2006. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:19581-19586.
- Stelmakh AF. 1993. Genetic effects of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat, *Euphytica*, 65:53–60.
- Zhang XK, Xiao YG, Zhang Y, Xia XC, Dubcovsky J, He ZH. 2008. Allelic variation at the vernalization genes, and in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit. *Crop Science*, 48(2), 458-470.
- Zaitseva OI, Lemesh VA. 2015. Allelic composition in the *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, and *Vrn-B3* genes of double haploid lines of hexaploid triticale. *Russian Journal of Genetics*, 51: 653-660.

## Molecular characterization of allelic variation at the VRN-1 and VRN-B3 loci controlling vernalization requirement in wheat genotypes based on polymorphism in the promoter and intron regions

M. Mohammadfam<sup>1</sup>, S. Golkari<sup>\*2</sup>, B. Sadegzadeh<sup>2</sup>

1-Department of Biotechnology, Maragheh branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

2-Dryland Agricultural Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Maragheh, Iran

### Abstract

Wheat, as a major crop in Iran and in the world, is considered an important crop for human consumption. Identification of allelic variations at loci that control vernalization requirements and cold tolerance, provides valuable information for determining adaptability of wheat genotypes to target environments. At molecular level, vernalization in wheat (*Triticum aestivum* L.) is determined mainly by three VRN-1, VRN-2 and VRN-3 loci. In hexaploid wheat, dominant alleles Vrn-A1, Vrn-B1 and Vrn-D1 are responsible for spring growth habit and recessive alleles with epistatic interactions determine the winter growth habit. In this study, allelic variations among 50 wheat genotypes were studied using 9 primer pairs specific to VRN-1 and VRN-B3 loci. Dominant alleles at Vrn-B1, Vrn-D1 and Vrn-B3 loci were detected with the frequency of %58, %24 and %90, respectively. Recessive alleles vrn-B1, vrn-D1 and vrn-B3 had a frequency of %42, %76 and %10, respectively. At Vrn-A1 locus, different alleles were detected with the frequency of Vrn-A1c (58%), Vrn-A1b (26%), Vrn-A1a (14%) and vrn-A1 (2%). Our finding revealed a considerable level of variations at gene loci controlling vernalization and cold tolerance in dryland wheat genotypes. Data provided here may be used for producing new wheat cultivars adapted to the target environments.

**Keywords:** Wheat, Vernalization, spring growth habit, winter growth habit, VRN-1 and VRN-B3.

\* Corresponding author: s.golkari@areo.ir

Received: 2016/08/23

Accepted: 2017/02/21