دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

استفاده از نشانگرهای آلل اختصاصی در شناسایی آلل‌های مکان‌های ژنی *VRN-1* در ژنوتیپ‌های گندم نان

منیره نظری[۱]، خلیل زینلی‌نژاد[۲]، سعید نواب پور[۳]، حسن سلطانلو[۳] و محمدهادی پهلوانی[۳]

۱ و ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسوول Khalil1381@yahoo.com)
تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۰۸
صفحه: ۱۳۳ تا ۱۴۳

چکیده

گندم مهمترین گیاه زراعی است و در سرتاسر جهان کشت می‌شود و سازگاری گسترده‌ای با مناطق گوناگون اقلیمی دارد. یکی از عوامل مهمی که باعث سازگاری گندم می‌شود، ژن‌های بهاره‌سازی است. در برنامه‌های به‌نژادی گندم شناخت از نوع آلل‌ها در مکان‌های ژنی کنترل‌کننده بهاره‌سازی می‌تواند نقش مهمی در معرفی ارقام سازگار به مناطق مختلف داشته باشد. در سطح مولکولی سه مکان ژنی برای کنترل بهاره‌سازی در گندم نان وجود دارد. این مکان‌های ژنی *Vrn-1*، *Vrn-2* و *Vrn-3* هستند. نیاز بهاره‌سازی در گندم هگزاپلوییید عمدتاً توسط مکان ژنی *Vrn-1* تعیین می‌شود که شامل مکان ژنی *Vrn-A1*، *Vrn-B1* و *Vrn-D1* است. مکان‌های ژنی *Vrn-A1*، *Vrn-B1* و *Vrn-D1* برای عادت رشد بهاره غالب و اپیستاتیک بر آلل‌های عادت رشد زمستانه هستند، بنابراین ارقام زمستانه دارای آلل‌های مغلوب در سه مکان ژنی *VRN-1* است. در این مطالعه ۳٤ ژنوتیپ گندم نان خاورمیانه به‌همراه ژنوتیپ گندم بهاره چینی با استفاده از نشانگرهای آلل اختصاصی برای مطالعه تنوع آللی در مکان ژنی *Vrn-1* مورد بررسی قرار گرفتند. مطالعه حاضر نشان داد که در مکان ژنی *VRN-A1* پنج ژنوتیپ دارای آلل غالب *VRN-A1a* بود. آلل *VRN-A1b* در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشد. تنها یکی از نمونه‌ها آلل *VRN-A1c* را نشان داد و ۳۲ ژنوتیپ به‌همراه گندم بهاره چینی دارای آلل مغلوب *vrn-A1* بودند. یک ژنوتیپ با شماره شش در این مکان ژنی بیش از یک آلل را نشان داد که غیرمعمول بود. در مکان ژنی *VRN-B1*، ١٤ ژنوتیپ دارای آلل غالب و ۲۰ ژنوتیپ به‌همراه ژنوتیپ بهاره چینی دارای آلل مغلوب بودند.

واژه‌های کلیدی: تنوع آللی، ژن‌های بهاره‌سازی، گندم نان، نشانگرهای مولکولی

مقدمه

گندم یکی از مهم‌ترین گیاهان دانه‌ای در جهان و شامل دو نوع عمده است: گندم نان هگزاپلوئید با ۹۵ درصد تولید گندم جهان و گندم دوروم تتراپلوئید با تولید پنج درصد دیگر. اهمیت اقتصادی گندم باعث افزایش مطالعات ژنتیکی و سیتوژنتیکی در راستای تولید رقم‌هایی با عملکرد بالا، کیفیت بیشتر و افزایش تحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده شده است. بهبود ژنتیکی گندم برای تامین غذای جمعیت در حال افزایش مردم جهان از برنامه‌های مهم محسوب می‌شود (۱۱). در سطح سیتوژنتیکی گندم نان گیاهی آلوهگزاپلوئید (2n=6x=42) با سه ژنوم A، B و D است و دارای ژنوم خیلی بزرگ bp/1C ۱۶×۱۰[۹] و بیشتر از ۸۰ درصد توالی تکراری است (۱۲). ژنوم گندم در هفت گروه همیولوگ سازمان یافته‌اند و در هر گروه همیولوگ سه جفت کروموزوم (AABBDD) وجود دارد (۶).

سازگاری گندم به دامنه وسیعی از شرایط محیطی به‌دلیل تنوع آللی موجود در ژن‌های تنظیم‌کننده عادت رشدی (*Vrn*) و پاسخ فتوپریودی (*PpD*) است. تنوع و اختلاف در ژن‌های *PpD* غلات را به دو گروه حساس به فتوپریود و غیرحساس به فتوپریود تقسیم می‌کند و اختلاف در ژن‌های *Vrn* به دو گروه زمستانه و تابستانه تقسیم می‌کند غلات زمستانه در پاییز کشت می‌شوند و برای گلدهی نیاز به گذراندن دوره سرمایی دارند. غلات تابستانه در بهار کشت می‌شوند و نیاز به گذراندن دوره سرمایی برای گلدهی ندارند (۳).

بهاره‌سازی در زمستان زمانی که دما بین صفر تا ده درجه سانتی‌گراد است اتفاق می‌افتد. هفته‌های کمی از سرما اغلب برای گلدهی کافی است. دوره طولانی‌تر از سرما می‌تواند گلدهی را تسریع کند، تا حدی که نیازه بهاره‌سازی اشباع شود که برای این فرآیند بیشتر از شش هفته لازم است. نیاز بهاره‌سازی می‌تواند اختیاری یا اجباری باشد. گیاهان یکساله زمستانه نیاز بهاره‌سازی اختیاری دارند یعنی دمای پایین باعث تسریع گلدهی می‌شود و برای گلدهی نیازی نیست. در گیاهان دوساله نیاز بهاره‌سازی اجباری است و بدون گذراندن یک دوره سرما وارد فاز گلدهی نمی‌شوند (۹).

آنالیزهای ژنتیکی نشان می‌دهند که سه مکان ژنی برای کنترل بهاره‌سازی در گندم نان وجود دارد. این مکان‌های ژنی، مکان‌های ژنی *Vrn-1*، *Vrn-2* و *Vrn-3* هستند (۱۶). نیاز بهاره‌سازی در گندم هگزاپلوییید عمدتاً توسط مکان ژنی *Vrn-1* تعیین می‌شود که شامل *Vrn-A1*، *Vrn-B1* و *Vrn-D1* است که به‌ترتیب بر روی بازوی بزرگ کروموزوم‌های همیولوگ 5A، 5B و 5D قرار دارند (۲۰). برای عادت رشد بهاره وجود تنها یک آلل غالب در مکان‌های ژنی *Vrn-A1*، *Vrn-B1* و *Vrn-D1* کافی است ولی برای عادت رشد زمستانه این مکان‌ها باید به‌صورت هموزیگوت مغلوب باشند (۱۳).

مکان ژنی *Vrn-1*: در جوانه انتهایی و برگ‌ها عملکرد ویژه‌ای دارد. در جوانه انتهایی بیان مکان ژنی *Vrn-1* ورود به فاز زایشی را بهبود می‌بخشد بنابراین تولید برگ‌ها متوقف و

نمو گل‌ها شروع می‌شود (۷). در برگ‌ها بیان مکان ژنی *Vrn-1* باعث پاسخ گلدهی به طول روزهای بلند می‌شود و با افزایش طول روز در بهار باعث افزایش گلدهی می‌شود (۱۶).

مکان ژنی *Vrn-2*: یک مانع برای گلدهی است که در روزهای بلند بیان می‌شود و مشابه ژن *FLC* در آرابیدوپسیس است (۲۱) و به‌نظر می‌رسد که ژن *Vrn-2* با توقف در القا ژن *Vrn-3* در روزهای بلند، گلدهی را به تاخیر می‌اندازد.

در غلات مکان ژنی *Vrn-2* در زمستان به‌طور مستقیم و غیرمستقیم مکان ژنی *Vrn-3* را کنترل می‌کند (۷).

مکان ژنی *Vrn-3*: پروتئین FT را در برگ‌ها تولید و سپس به جوانه انتهایی منتقل کرده و در آنجا نمو گل را تحریک می‌کند. پاسخ گلدهی به روزهای بلند توسط ژن *FT* انجام می‌شود (۱۸). در غلات معتدل مانند گندم و جو، مشابه ژن *FT1* در آرابیدپسیس تالیانا[1] ژنی با نام *Vrn-3* وجود دارد که با طول روز بلند القا می‌شود و گلدهی را تسریع می‌کند. در پاسخ گلدهی غلات ژن *Vrn-3* تنها در گیاهانی که بهاره‌سازی شده‌اند بیان می‌شود (۲۲).

مکانیسم تنظیمی مهم برای نیاز بهاره‌سازی مبتنی بر اثر اپیستازی بین مکان‌های ژنی *Vrn-1* و *Vrn-2* است. محصول بیان مکان ژنی *Vrn-2* یک بازدارنده برای مکان ژنی *Vrn-1* است. فرآیند بهاره‌سازی فراوانی محصول ژن *Vrn-2* را کاهش می‌دهد و رونویسی ژن *Vrn-1* را به‌تدریج افزایش می‌دهد (۱۰). ژن‌های *Vrn-2* و *Vrn-1* تاثیرات متفاوتی بر رفتار گلدهی دارند. در ارقام زمستانه، ژن *Vrn-1* در ابتدا به‌مقدار بسیار کم بیان می‌شود و با بهاره‌سازی افزایش می‌یابد. بهاره‌سازی بیان ژن *Vrn-1* را در جوانه انتهایی و برگ‌ها فعال می‌کند و با ادامه فرآیند بهاره‌سازی، بیان این ژن در بافت‌ها افزایش می‌یابد (۱۹). به‌نظر می‌رسد که بیان ژن *Vrn-1* برای القا ژن *Vrn-3* در روزهای بلند نیاز است (۲۲). احتمالاً ژن *Vrn-1* با کنشی که با ژن *Vrn-2* دارد، بیان ژن *Vrn-3* را کنترل می‌کند (۱۶). آلل‌های فعال ژن *Vrn-3* بدون طول روز بلند و بهاره‌سازی باعث آغاز و توسعه سریع گلدهی می‌شوند (۲۲). عدم وجود ژن *Vrn-2* تنها در روزهای بلند بدون نیاز به بهاره‌سازی باعث تسریع گلدهی می‌شود. بنابراین تنظیم مکان ژنی *Vrn-2* توسط *Vrn-1*، مکانیسمی را ایجاد می‌کند که در برگ گیاهان بهاره‌سازی‌شده، *Vrn-3* در روزهای بلند القا شود (۷). وقتی که گیاهان گندم کاملا از نظر نیاز بهاره‌سازی اشباع شدند، شاید فعال‌شدن ژن *Vrn-1* باعث کاهش مقاومت به سرما شود ، البته این نتیجه که ناشی از تاثیر مستقیم مکان ژنی *Vrn-1* است، هنوز مشخص نیست. آلل‌های مختلف مکان ژنی *Vrn-1* طیف وسیعی از نیاز بهاره‌سازی را به‌وجود می‌آورند که هر کدام از آلل‌ها در ارقام مختلف، سازگار با منطقه‌ای برای کاشت هستند (۱۵).

برای مکان ژنی *Vrn-B1* و *Vrn-D1* تغییر در توالی راه‌انداز مشاهده نشده است و تنوع آللی آن‌ها تنها از طریق حذف درون توالی اولین اینترون شناسایی شده است. دو روش STS-PCR استفاده می‌شود که روش اول مبتنی بر آنالیز ناحیه راه‌اندازهای ژن *Vrn-A1* که باعث شناسایی آلل‌های *Vrn-A1a*، *Vrn-A1b* و *vrn-A1* می‌شود. روش دوم مبتنی‌بر آنالیز حضور یا حذف در اولین اینترون مکان ژنی *Vrn-A1* هست که باعث شناسایی *Vrn-A1c*، *Vrn-B1* و *Vrn-D1* می‌شود (۱۰). تنوع آللی ژن *Vrn-1* گندم نان در امریکا (۵)، کانادا (۱۴) و چین (۲۳) بررسی شد.

فو و همکارانش (۵) از طریق آزمایش و بررسی حذف‌شدگی‌ها و چندشکلی‌ها از نوع SNP در اینترون اول مکان ژنی *Vrn-1* جفت آغازگرهای (intr1/C/F,intr1/AB/R)، (intr1/A/F2,intr1/A/R3)، (Intr1/B/F,Intr1/B/R3)، (Intr1/B/F,Intr1/B/R4)، (Intr1/D/F,Intr1/D/R3) و (Intr1/D/F,Intr1/D/R4) را طراحی کردند. آن‌ها با استفاده از جداسازی و کلون‌کردن محصولات PCR در پلاسمید و توالی‌یابی قطعات از طریق نواحی چندشکلی بین ژنوم‌ها، آغازگرهای اختصاصی را طراحی کردند. برای طراحی آغازگر ابتدا توالی اینترون اول ژن‌های *Vrn-1* در چند نوع گندم را مورد بررسی و مقایسه قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که یک قسمت از این اینترون در تفاوت بین آلل‌های غالب و مغلوب نقش دارد. در حالیکه قسمت‌های دیگر توالی اینترون بین خود آلل‌های غالب متفاوت است و شامل حذف و اضافه‌شدگی‌ها و عناصر دیگر می‌باشد.

با توجه به اهمیت صفت روز تا گلدهی و نیاز سرمایی و همچنین معرفی نشانگرهای آلل اختصاصی، این مطالعه در نظر دارد وضعیت آللی در دو مکان ژنی مهم *Vrn-A1* و *Vrn-B1* را در تعدادی از ژنوتیپ‌های گندم‌های نان خاورمیانه به کمک نشانگرهای آلل اختصاصی مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ۳۴ ژنوتیپ گندم نان ارزیابی شدند (جدول ۱). جمعیت مورد نظر عمدتا از گندم‌های نان خاورمیانه می‌باشد که حدود نیم‌قرن پیش توسط پژوهشگران آلمانی از مناطق مختلف خاورمیانه جمع‌آوری و در موسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی در کشور آلمان نگهداری شدند (۸). همچنین از ژنوتیپ بهاره چینی (Chinese Spring) که دارای آلل‌های مشخص برای آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق بود، به‌عنوان کنترل و تایید آلل‌های مورد مطالعه استفاده شد.

به‌منظور نمونه‌گیری از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، در بهار ۹۴ از هر ژنوتیپ در مرحله پنجه‌زنی سه تا چهار برگ گرفته شد و در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج DNA به‌روش CTAB انجام شد (۴). برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. غلظت DNA استخراج‌شده در مقایسه با مارکر تری به‌صورت چشمی تخمین زده شد و سپس نمونه کاری برای انجام PCR تهیه شد.

به‌منظور بررسی تنوع آللی مکان ژنی *Vrn-1* از نشانگرهای آلل اختصاصی استفاده شد. مشخصات و توالی آغازگرهای STS استفاده شده در جدول ۲ آورده شده است. طبق این جدول جفت آغازگر VRN1AF و VRN1-INT1R پنج آلل را تفکیک می‌کند. حضور هم زمان باندهای ۹۶۵ و ۸۷۶ جفت باز، بیانگر وجود آلل *Vrn-A1a* و حضور باند ۷۱۴ جفت باز

1- *Arabidopsis thaliana*

معرف آلل *Vrn-A1b* است. علاوه بر باندهای فوق حضور باند ۷۳۴ جفت باز معرف همزمان دو آلل *Vrn-A1c* و *vrn-A1* می‌باشد. برای تفکیک دو آلل اخیر در ژنوتیپ‌هایی که باند ۷۳۴ جفت باز را نشان داده بودند، با آغازگرهای اختصاصی این دو آلل بررسی شدند.

به‌منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از مسترمیکس آماده (ساخت شرکت Ampliqon) استفاده شد. مواد مورد نیاز مطابق جدول ۳ مخلوط شدند و در تیوب‌های مخصوص PCR توزیع شدند، تیوب‌ها به دستگاه ترموسایکلر peQLab جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز منتقل شدند. برنامه PCR به‌صورت کلی در جدول ۴ آمده است. بعد از اتمام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز محصولات PCR در چاهک ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند و الکتروفورز تا مدت زمان لازم صورت گرفت.

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های گندم نان مطابق بانک ژن گیاهی کشور آلمان

Table 1. Name of bread wheat genotypes according to plant gene bank in Germany

ردیف	مکان جمع آوری	نام ژنوتیپ	شماره ژنوتیپ*	ردیف	مکان جمع آوری	نام ژنوتیپ	شماره ژنوتیپ
۱	هند	ATRI 530	۴	۱۹	ترکیه	ATRI 1494	۲۲
۲	هند	ATRI 532	۵	۲۰	ترکیه	ATRI 1495	۲۳
۳	هند	ATRI 533	۶	۲۱	افغانستان	ATRI 3297	۱۵۶
۴	ترکیه	ATRI 1924	۳۴	۲۲	افغانستان	ATRI 4113	۱۷۹
۵	ترکیه	ATRI 1925	۳۵	۲۳	ایران	ATRI 5947	۲۳۲
۶	ترکیه	ATRI 1926	۳۶	۲۴	ایران	ATRI 5956	۲۳۳
۷	نپال	ATRI 2443	۶۴	۲۵	ایران	ATRI 5961	۲۳۴
۸	نپال	ATRI 2445	۶۵	۲۶	هند	ATRI 8306	۲۶۴
۹	نپال	ATRI 2448	۶۶	۲۷	هند	ATRI 9729	۲۹۷
۱۰	افغانستان	ATRI 2618	۹۴	۲۸	پاکستان	ATRI 10002	۳۲۸
۱۱	افغانستان	ATRI 2626	۹۵	۲۹	ترکیه	ATRI 10005	۳۲۹
۱۲	افغانستان	ATRI 2632	۹۶	۳۰	سوریه	SYR 6	۶۲۶
۱۳	افغانستان	ATRI 2831	۱۲۴	۳۱	?	487/2	۶۴۸
۱۴	افغانستان	ATRI 2841	۱۲۵	۳۲	ایران	الموت	۷۱۲
۱۵	افغانستان	ATRI 2845	۱۲۶	۳۳	?	MV-17	۷۱۴
۱۶	افغانستان	ATRI 3276	۱۵۴	۳۴	ایران	اترک	۷۱۶
۱۷	افغانستان	ATRI 3283	۱۵۵	۳۵	ایران	زارع	۷۱۹
۱۸	چین	Chinese Spring	۵۳۷				

A: معرف بهاره بودن ژنوتیپ‌های گندم مطابق بانک ژن گیاهی آلمان است.

*: شماره ژنوتیپ در بانک بذر دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده و پارامترهای PCR در بررسی تنوع آللی *VRN-1*

Table 2. The applied primers and PCR parameters for allelic variation study at *VRN-1*

مکان ژنی	آلل	نام آغازگرها	توالی آغازگرها ′۳ →′۵	اندازه باندها (جفت باز)	دمای اتصال (°C)	زمان بسط
Vrn-A1	*Vrn-A1a*	VRN1AF VRN1-INT1R	GAAAGGAAAAATTCTGCTCG GCAGRGAAATCGAAATCGAAG	۸۷۶+ ۹۶۵	۵۰	یک دقیقه
	Vrn-A1b			۷۱۴		
	Vrn-A1c			۷۳۴		
	vrn-A1			۷۳۴		
	Vrn-A1c	Intr1/A/F2 Intr1/A/R3	AGCCTCCACGGTTTGAAAGTAA AAGTAAGACAACACGAATGTGAGA	۱۱۷۰	۵۶	یک دقیقه و پنج ثانیه
	vrn-A1	Intr1/C/F Intr1/AB/R	GCACTCCTAACCCACTAACC TCATCCATCATCAAGGCAAA	۱۰۶۸	۵۸	یک دقیقه و پنج ثانیه
Vrn-B1	*Vrn-B1*	Intr1/B/F Intr1/B/R3	CAAGTGGAACGGTTAGGACA CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA	۷۰۹	۶۳	۴۳ ثانیه
	vrn-B1	Intr1/B/F Intr1/B/R4	CAAGTGGAACGGTTAGGACA CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA	۱۱۴۹	۵۸	یک دقیقه و نه ثانیه

جدول ۳- مواد مورد استفاده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با جفت آغازگرهای آلل اختصاصی
Table 3. The used materials for polymerase chain reaction with allele specific primer pairs

مواد	حجم لازم به میکرولیتر
مستر میکس Ampliqon (2X)	۶
آغازگر R و L (۱۰ pmol/µl)	۱ + ۱
آب دو بار تقطیر	۴
حجم کل بدون نمونه DNA	۱۲ میکرولیتر
نمونه DNA (۲۰-۱۰ ng/µl)	۳
حجم نهایی	۱۵

جدول ۴- برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای آغازگرهای آلل اختصاصی
Table 4. Polymerase chain reaction program for the allele specific primer

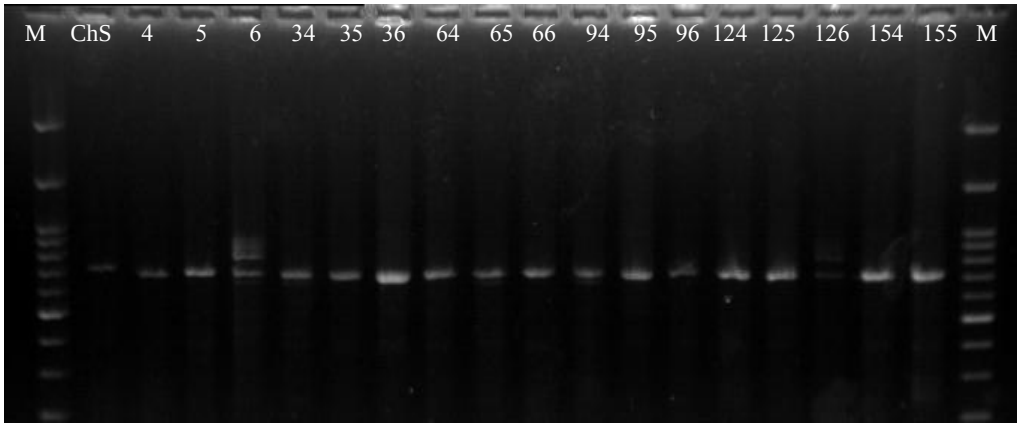
مرحله اول	واسرشت سازی اولیه	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۱۰ دقیقه	یک بار
مرحله دوم	واسرشت سازی	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۴۵ ثانیه	
مرحله سوم	اتصال	دمای مناسب	یک دقیقه	۳۸ بار
مرحله چهارم	سنتز و بسط	۷۲ درجه سانتی‌گراد	مدت زمان مناسب	
مرحله پنجم	بسط نهایی	۷۲ درجه سانتی‌گراد	پنج دقیقه	یک بار
مرحله ششم	نگه‌داری	چهار درجه سانتی‌گراد	یک ساعت	یک بار

نتایج و بحث

بررسی تنوع آللی در مکان ژنی *Vrn-A1*

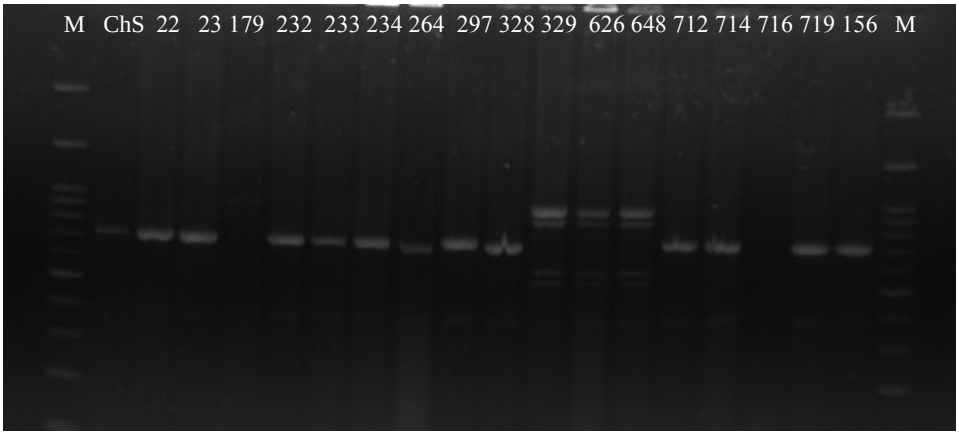
برای این منظور، آزمایشات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای هر یک از آلل‌های مکان ژنی *Vrn-A1* با جفت آغازگرهای اختصاصی انجام شد. ابتدا وجود آلل غالب در این مکان ژنی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از جفت آغازگرهای VRN1AF و VRN1-INT1R برای ناحیه راه انداز *Vrn-A1* استفاده شد. اندازه باندهای مورد انتظار برای این جفت آغازگر، ۸۷۶+۹۶۵، ۷۳۴، ۷۳۴ و ۷۱۴ جفت باز بود. سه ژنوتیپ به شماره ۳۲۹، ۶۲۶ و ۶۴۸ دو باند با اندازه‌های ۸۷۶+۹۶۵ جفت باز را نشان دادند که نشان می‌دهد دارای آلل غالب *Vrn-A1a* در این مکان ژنی بودند. ژنوتیپ شماره ۷۱۶ هیچ باندی تولید نکرد و ژنوتیپ شماره ۱۷۹ باندی غیر از باند مورد نظر را تولید کرد. باند ۷۱۴ جفت باز که بیانگر آلل غالب *Vrn-A1b* است فقط در ژنوتیپ ۲۶۴ مشاهده شد (شکل ۱). در نتایج زنگ و همکاران هشت ژنوتیپ از ۲۷۸ ژنوتیپ باند ۷۱۴ جفت باز را داشتند (۲۳).

در این تحقیق، ۲۹ ژنوتیپ به شماره ۴، ۵، ۶، ۳۴، ۳۵، ۳۶، ۶۴، ۶۵، ۶۶، ۹۴، ۹۵، ۹۶، ۱۲۴، ۱۲۵، ۱۲۶، ۱۵۴، ۱۵۵، ۲۲، ۲۳، ۲۳۲، ۲۳۳، ۲۳۴، ۲۹۷، ۳۲۸، ۷۱۲، ۷۱۴، ۷۱۹، ۱۵۶ و ژنوتیپ بهاره چینی باند ۷۳۴ را نشان دادند. ژنوتیپ‌های دارای باند ۷۳۴ جفت باز مربوط به دو آلل می‌باشد که با این جفت آغازگر قابل تفکیک نیستند. در ادامه برای تفکیک بین دو آلل *Vrn-A1c* و *vrn-A1* به‌ترتیب از جفت آغازگرهای Intr1/A/F2، Intr1/A/R3 و Intr1/C/F، Intr1/AB/R استفاده شد. از ژنوتیپ بهاره چینی جهت کنترل در این آزمایش استفاده شد. با توجه به نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز با جفت آغازگرهای VRN1AF و VRN1-INT1R اکثر ژنوتیپ‌ها باند ۷۳۴ را داشتند و تنها سه ژنوتیپ باند ۸۷۶+۹۶۵ جفت باز را آشکار نمودند و فقط یک ژنوتیپ باند ۷۱۴ جفت باز را آشکار کرد. همانطور که گفته شد برای تفکیک بین دو آلل *Vrn-A1c* و *vrn-A1* که هر دو باند ۷۳۴ را آشکار کرده بودند به‌ترتیب از جفت آغازگرهای Intr1/A/F2، Intr1/A/R3 و Intr1/C/F، Intr1/AB/R استفاده شد. نتایج حاصل از به‌کاربردن جفت آغازگرهای Intr1/A/F2، Intr1/A/R3 به این صورت بود که فقط ژنوتیپ شماره ۹۶ باند ۱۱۷۰ که مربوط به مکان ژنی *Vrn-A1c* بود را نشان داد (شکل ۲). ژنوتیپ بهاره چینی هم فاقد باند مورد نظر بود که طبق تحقیقات فو و همکارانش (۵) و زنگ و همکارانش (۲۳) صحیح می‌باشد.



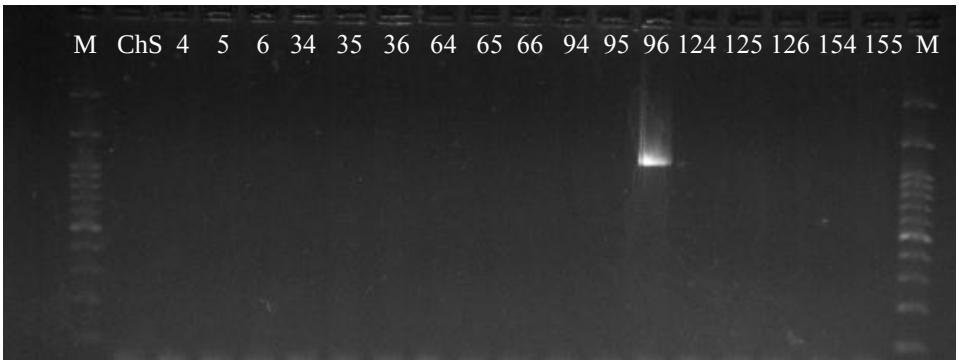
شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز برای جفت آغازگرهای VRN1AF و VRN1-INT1R با باندهای با اندازه‌های ۹۶۵+۸۷۶، ۷۳۴،۷۳۴ و ۷۱۴ جفت باز

Figure 1. Agarose gel electrophoresis for primer pair VRN1AF and VRN1-INT1R, band size 965+876, 734, 734, and 714 bp



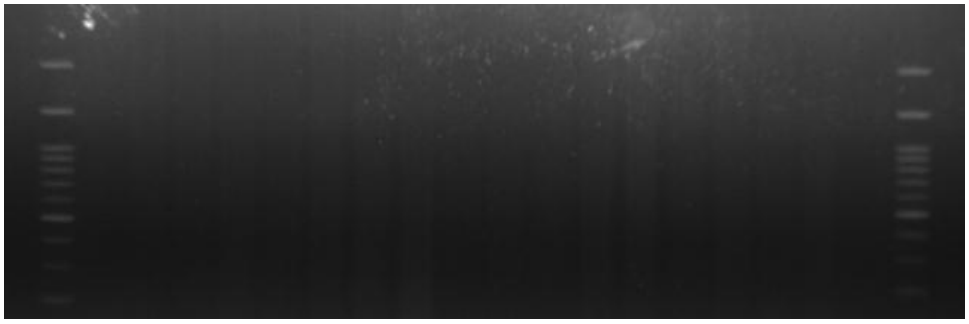
ادامه شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز برای جفت آغازگرهای VRN1AF و VRN1-INT1R با باندهای با اندازه‌های ۹۶۵+۸۷۶، ۷۳۴،۷۳۴ و ۷۱۴ جفت باز

Continue of figure 1. Agarose gel electrophoresis for primer pair VRN1AF and VRN1-INT1R, band size 965+876, 734, 734, and 714 bp



شکل ۲- تصویر الکتروفورز ژل آگارز برای جفت آغازگرهای Intr1/A/F2، Intr1/A/R3 با باند با اندازه ۱۱۷۰ جفت باز

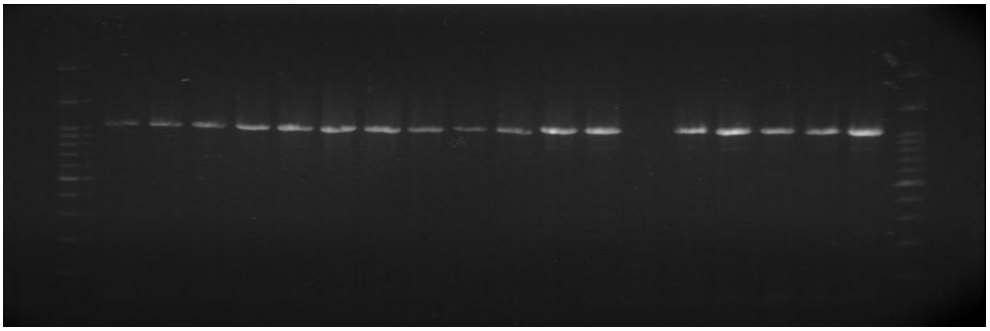
Figure 2. Agarose gel electrophoresis for primer pair Intr1/A/F2, Intr1/A/R3, with band size 1170 bp



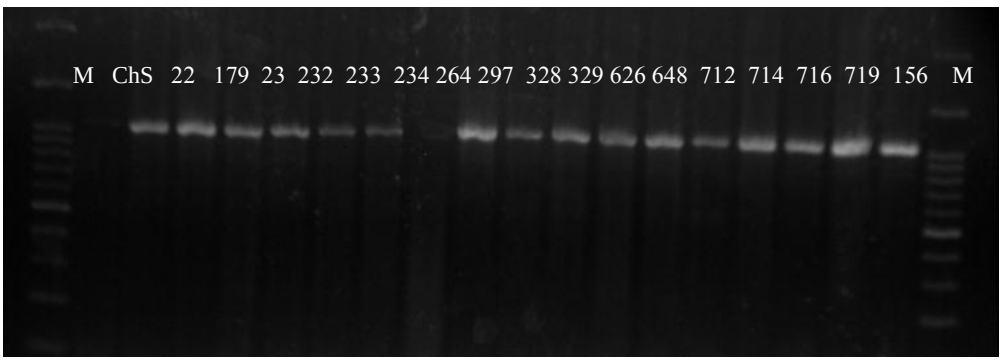
ادامه شکل ۲- تصویر الکتروفورز ژل آگارز برای جفت آغازگرهای Intr1/A/F2، Intr1/A/R3 با باند با اندازه ۱۱۷۰جفت باز
Continue of figure 2- Agarose gel electrophoresis for primer pair Intr1/A/F2, Intr1/A/R3, with band size 1170 bp

سپس جفت آغازگرهای Intr1/C/F، Intr1/AB/R برای شناسایی آلل مغلوب *vrn-A1* به کار برده شد که نتایج نشان داد ژنوتیپ‌های شماره ۴، ۵، ۶، ۳۴، ۳۵، ۳۶، ۶۴، ۶۵، ۶۶، ۹۴، ۹۵، ۱۲۴، ۱۲۵، ۱۲۶، ۱۵۴، ۱۵۵، ۲۲، ۲۳، ۱۷۹، ۲۳۲، ۲۳۳، ۲۳۴، ۲۹۷، ۳۲۸، ۳۲۹، ۶۲۶، ۶۴۸، ۷۱۲،۷۱۴، ۷۱۶، ۷۱۹ ، ۱۵۶ و ژنوتیپ بهاره چینی باند، ۱۰۶۸ جفت باز را داشتند و بیانگر این نتیجه بود که این ژنوتیپ‌ها آلل مغلوب *vrn-A1* را دارند (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهد که اکثر ژنوتیپ‌ها در مکان ژنی *Vrn-A1* دارای آلل مغلوب بودند. بنابراین این مکان ژنی در بهاره‌بودن ژنوتیپ‌های بهاره از سهم خیلی کمتری برخوردار است.

در نتایج زنگ و همکاران (۲۳) نیز اکثر واریته‌ها دارای آلل مغلوب در این مکان ژنی بودند و آن‌ها نیز در ژنوتیپ بومی چینی مورد مطالعه خود آلل غالب *Vrn-A1c* را نیافتند. نواک و کوالسزیک (۱۰) تنوع آللی را با استفاده از نشانگرهای آلل اختصاصی در ۴۳ واریته زراعی گندم‌های لهستانی بررسی کردند. همه‌ی ۳۰ واریته گندم زمستانه دارای آلل نهفته *vrn-A1* بودند و همه‌ی ۱۳ واریته‌ی بهاره دارای آلل غالب در این مکان ژنی *Vrn-A1* بودند.



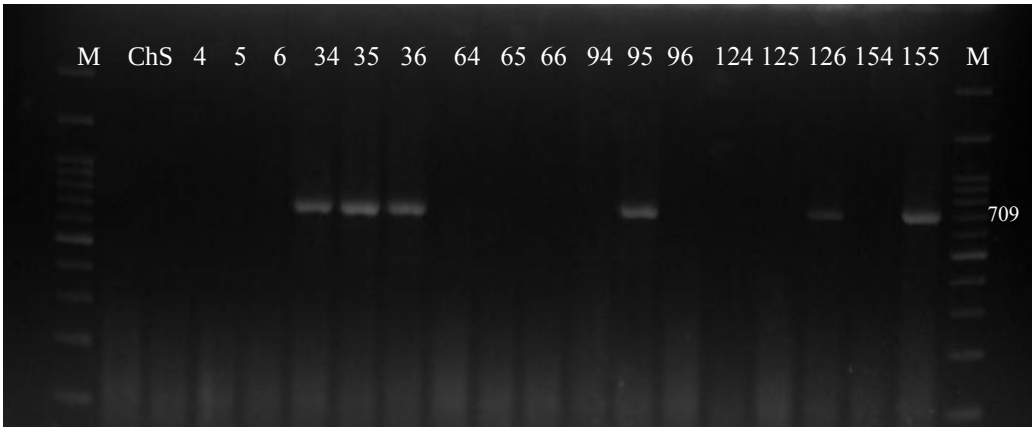
شکل ۳- تصویر الکتروفورز ژل آگارز برای جفت آغازگرهای Intr1/C/F و Intr1/AB/R با باند با اندازه ۱۰۶۸جفت باز
Figure 3. Agarose gel electrophoresis for primer pair Intr1/C/F, Intr1/AB/R, with band size 1068bp



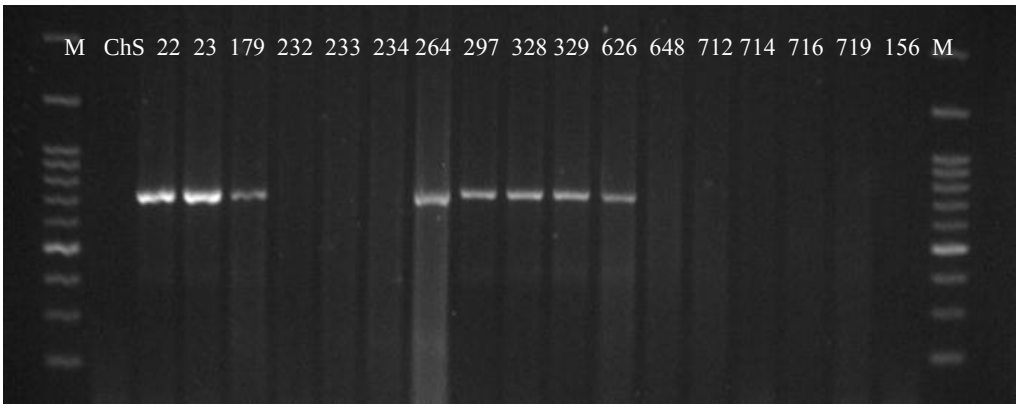
ادامه شکل ۳- تصویر الکتروفورز ژل آگارز برای جفت آغازگرهای Intr1/C/F و Intr1/AB/R با سایز باند ۱۰۶۸جفت باز
Continue of figure 3. Agarose gel electrophoresis for primer pair Intr1/C/F, Intr1/AB/R, with band size 1068bp

بررسی تنوع آللی در مکان ژنی *Vrn-B1*

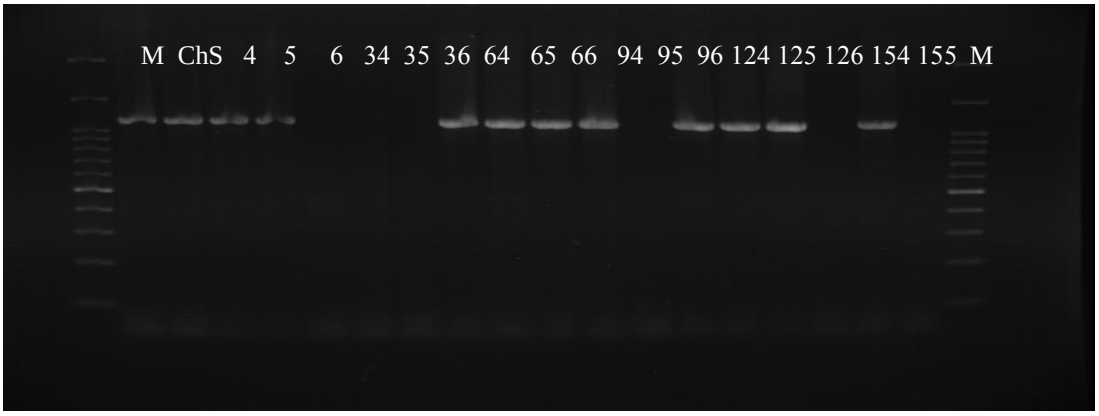
برای این منظور ابتدا همه ژنوتیپ‌ها با جفت آغازگرهای Intr1/B/F و Intr1/B/R3 برای ناحیه راه انداز *Vrn-B1* جهت بررسی وجود آلل غالب آزمایش شدند. ۱۴ ژنوتیپ به شماره ۳۴، ۳۵، ۳۶، ۹۵، ۱۲۶، ۱۵۵، ۲۲، ۲۳، ۱۷۹، ۲۶۴، ۲۹۷، ۳۲۸، ۳۲۹ و ۶۲۶ باند با اندازه ۷۰۹ جفت باز را نشان دادند (شکل ۴) که بیانگر وجود آلل غالب در این مکان و نشان‌دهنده ژنوتیپ بهاره است زیرا شرط بهاره‌بودن وجود حداقل یک آلل غالب در هر یک از مکان‌های ژنی *Vrn-1* است. برای بررسی وجود آلل مغلوب از جفت آغازگرهای Intr1/B/F و Intr1/B/R4 استفاده شد. ۲۱ ژنوتیپ به شماره ۴، ۵، ۶، ۶۴، ۶۵، ۶۶، ۹۴، ۹۶، ۱۲۴، ۱۲۵، ۱۵۴، ۲۳۲، ۲۳۳، ۲۳۴، ۶۴۸، ۷۱۲، ۷۱۴، ۷۱۶، ۷۱۹، ۱۵۶ و ژنوتیپ بهاره چینی باند ۱۱۴۹ جفت باز را نشان دادند که بیانگر وجود آلل مغلوب در این مکان ژنی است (شکل ۵). همانطور که انتظار می‌رفت الگوی باندی دو جفت آغازگر فوق یکدیگر را تکمیل کردند یعنی هر یک از ژنوتیپ‌ها تنها برای یکی از جفت آغازگرها باند دارد و برای دیگری باندی ایجاد ننمود.



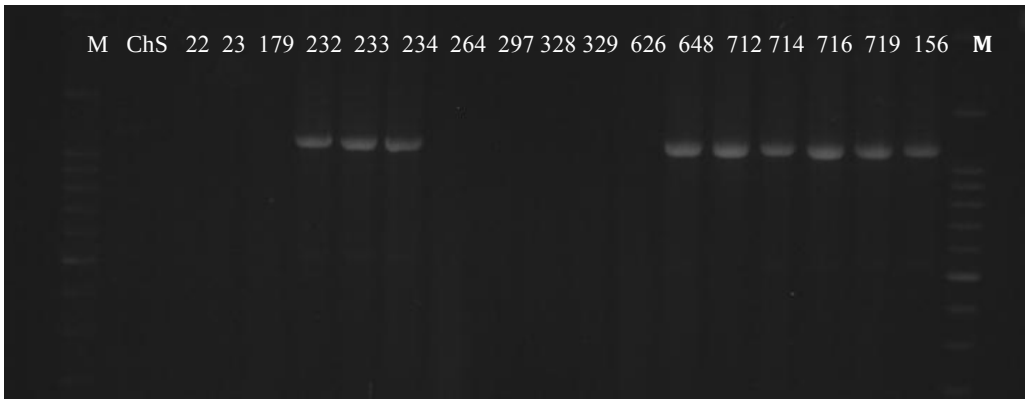
شکل ۴- تصویر الکتروفورز ژل آگارز برای آغازگرهای Intr1/B/F و Intr1/B/R3 با باند با اندازه ۷۰۹ جفت باز
Figure 4. Agarose gel electrophoresis for primer pair Intr1/B/F and Intr1/B/R3, with band size 709 bp



ادامه شکل ۴- تصویر الکتروفورز ژل آگارز برای جفت آغازگرهای Intr1/B/F و Intr1/B/R3 با باند با اندازه ۷۰۹ جفت باز
Continue of figure 4. Agarose gel electrophoresis for primer pair Intr1/B/F and Intr1/B/R3, band size 709 bp



شکل ۵- تصویر الکتروفورز ژل آگارز برای جفت آغازگرهای Intr1/B/F و Intr1/B/R4 با باند با اندازه ۱۱۴۹ جفت باز
Figure 5. Agarose gel electrophoresis for primer pair Intr1/B/F and Intr1/B/R4, with band size 1149 bp



ادامه شکل ۵- تصویر الکتروفورز آگارز برای جفت آغازگرهای Intr1/B/F و Intr1/B/R4 با باند با اندازه ۱۱۴۹ جفت باز
Continue of figure 5. Agarose gel electrophoresis for primer pair Intr1/B/F and Continue of Intr1/B/R4, with band size 1149 bp

بنابراین از بین ۳۵ ژنوتیپ ۱۴ ژنوتیپ دارای آلل غالب و ۲۱ ژنوتیپ دارای آلل مغلوب از نظر این مکان ژنی بودند. در مطالعه زنگ و همکاران (۲۳) که ۲۷۸ ژنوتیپ چینی را بررسی کردند از نظر مکان ژنی *Vrn-B1* اکثر ارقام (۲۰۵ رقم) دارای آلل مغلوب بودند که از بین این ۲۰۵ رقم تنها ۹۲ رقم آن زمستانه بودند. به‌عبارت‌دیگر این ۹۲ رقم در هر سه مکان ژنی دیگر هم دارای آلل مغلوب بودند.

مطالعه تنوع آللی در مکان ژنی *vrn-A1* نشان داد که در مکان ژنی *Vrn-A1* سه ژنوتیب دارای آلل غالب *Vrn-A1a* بودند. آلل *Vrn-A1b* فقط در یکی از نمونه‌ها مشاهده شد و یکی از نمونه‌ها آلل *Vrn-A1c* را نشان داد. ۲۸ ژنوتیپ به‌همراه گندم بهاره چینی دارای آلل مغلوب *vrn-A1* بودند. این نتایج نشان داد که اکثر ژنوتیپ‌ها در مکان ژنی *Vrn-A1* دارای آلل مغلوب بودند. بنابراین این مکان ژنی در بهاره‌بودن ژنوتیپ‌های بهاره از سهم خیلی کمتری برخوردار است. در مکان ژنی *Vrn-B1*، ۱۴ ژنوتیپ دارای آلل غالب و ۲۰ ژنوتیپ به‌همراه ژنوتیپ بهاره چینی دارای آلل مغلوب بودند. از ۳۵ ژنوتیپ مورد مطالعه، ۱۶ ژنوتیپ حداقل یک آلل غالب و ۱۹ ژنوتیپ هم در هر دو مکان دارای آلل مغلوب بودند (جدول ۵).

جدول ۵- وضعیت آلل‌ها در دو مکان ژنی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

Table 5. Allelic status in the two loci of the studied genotypes

ردیف	ژنوتیپ	مکان جمع آوری	*Vrn-A1*	*Vrn-B1*	تعداد آلل غالب	روز تا گلدهی
۴	ATRI 530	هند	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۲۶
۵	ATRI 532	هند	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۱۱
۶	ATRI 533	هند	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۲۹
۳۴	ATRI 1924	ترکیه	*vrn-A1*	*Vrn-B1*	۱	۱۲۹
۳۵	ATRI 1925	ترکیه	*vrn-A1*	*Vrn-B1*	۱	۱۳۰
۳۶	ATRI 1926	ترکیه	*Vrn-A1a*	*Vrn-B1*	۲	۱۲۸
۶۴	ATRI 2443	نپال	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۳۸
۶۵	ATRI 2445	نپال	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۱۶
۶۶	ATRI 2448	نپال	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۲۰
۹۴	ATRI 2618	افغانستان	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۳۲
۹۵	ATRI 2626	افغانستان	*vrn-A1*	*Vrn-B1*	۱	۱۳۰
۹۶	ATRI 2632	افغانستان	*Vrn-A1c*	*vrn-B1*	۱	۱۲۷
۱۲۴	ATRI 2831	افغانستان	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۲۷
۱۲۵	ATRI 2841	افغانستان	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۲۷
۱۲۶	ATRI 2845	افغانستان	*Vrn-A1a*	*Vrn-B1*	۲	۱۱۶
۱۵۴	ATRI 3276	افغانستان	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۳۲
۱۵۵	ATRI 3283	افغانستان	*vrn-A1*	*Vrn-B1*	۱	۱۳۶
۲۲	ATRI 1494	ترکیه	*vrn-A1*	*Vrn-B1*	۱	۱۳۰
۲۳	ATRI 1495	ترکیه	*vrn-A1*	*Vrn-B1*	۱	۱۲۷
۱۵۶	ATRI 3297	افغانستان	*vrn-A1*	*Vrn-B1*	۱	۱۲۷
۱۷۹	ATRI 4113	افغانستان	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۳۵
۲۳۲	ATRI 5947	ایران	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۳۲
۲۳۳	ATRI 5956	ایران	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۲۹
۲۳۴	ATRI 5961	ایران	*vrn-A1*	*Vrn-B1*	۱	۱۲۸
۲۶۴	ATRI 8306	هند	*vrn-A1*	*Vrn-B1*	۱	۱۲۵
۲۹۷	ATRI 9729	هند	*vrn-A1*	*Vrn-B1*	۱	۱۲۰
۳۲۸	ATRI 10002	پاکستان	*Vrn-A1a*	*Vrn-B1*	۱	۱۲۱
۳۲۹	ATRI 10005	ترکیه	*Vrn-A1a*	*Vrn-B1*	۱	۱۲۵
۶۲۶	SYR 6	سوریه	*Vrn-A1a*	*vrn-B1*	۱	۱۳۵
۶۴۸	487/2	?	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۲۱
۷۱۲	الموت	ایران	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۱۲
۷۱۴	MV-17	?	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۲۶
۷۱۶	اترک	ایران	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۱۷
۷۱۹	زارع	ایران	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۲۵
۵۳۷	Chinese Spring	چین	*vrn-A1*	*vrn-B1*	۰	۱۲۲

منابع

1. CIMMYT. 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third Edition. Mexico, D.F.: CIMMYT, 102.
2. Dubcovsky, J., C. Chen and L. Yan. 2005. Molecular characterization of the allelic variation at the *VRN-H2* vernalization locus in barley. Molecular Breeding, 15: 395-407.
3. Distelfeld, A., C. Li and J. Dubcovsky. 2009. Regulation of flowering in temperate cereals. Plant Biology, 12: 178-184.
4. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.
5. Fu, D., P. Szucs, L. Yan, M. Helguera, J.S. Skinner, J. Von Zitzewitz, P.M. Hayes and J. Dubcovsky. 2005. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. Molecular Genetics and Genomics, 273: 54-65.

6. Gupta, P.K., R.R. Mir, A. Mohan and J. Kumar. 2008. Wheat Genomics: present status and Future prospects (Review Article). International Journal of plant Genomics, 10: 1-36.
7. Hemming, M.N., S. Fieg, W.J. Peacock, E.S. Dennis and B. Trevaskis. 2009. Regions associated with repression of the barley (*Hordeum vulgare*) VERNALIZATION1 gene are not required for cold induction. Molecular Genetics and Genomics, 282: 107-117.
8. IPK-Gatersleben Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) gene bank. Germany.
9. Michaels, S.D. and R.M. Amasino. 2000. Memories of winter: vernalization and the competence to flower. Plant, Cell and Environment, 23: 1145-1153.
10. Nowak, M. and K. Kowalczyk. 2010. Allelic variation at the *VRN-1* locus of polish cultivars of common wheat *(Triticum aestivum* L.). Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 52: 86-91.
11. Peng, J.H., D. Sun and E. Nevo. 2011. Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. Molecular Breeding, 28: 281-301.
12. Röder, M.S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy and M.W. Ganal. 1998. A microsatellite map of wheat. Genetics, 149: 2007-2023.
13. Snape, J.W., K. Butterworth, E. Whitechurch and A.J. Worland. 2001. Waiting for fine times: genetics of flowering time in wheat. Euphytica, 119: 185-190.
14. Stelmakh, A.F. 1998. Genetic systems regulating flowering response in wheat. In *Wheat*: Prospects for Global Improvement. Springer Netherlands, 491-501.
15. Takahashi, R., and S. Yasuda. 1971. Genetics of earliness and growth habit in barley. In 'Barley genetics II. Proceedings of the Second International Barley Genetics Symposium. Ed. R.A. Nilan, 388-408.
16. Trevaskis, B., M.N. Hemming, E.S. Dennis and W.J. Peacock. 2007. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. Trends in Plant Science, 12: 352-357.
17. Trevaskis, B., M.N. Hemming, E.S. Dennis and W.J. Peacock. 2009. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. Plant Science, 12: 352-357.
18. Trevaskis, B. 2010. The central role of the *VERNALIZATION1* gene in the vernalization response of cereals. Functional Plant Biology, 37: 479-487.
19. Yan, L., A. Loukoianov, G. Tranquilli, M. Helguera, T. Fahima and J. Dubcovsky. 2003. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100: 6263-6268.
20. Yan, L., M. Helguera, K. Kato, S. Fukuyama, J. Sherman and J. Dubcovsky. 2004. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. Theoretical and Applied Genetics, 109: 1677-1686.
21. Yan, L., A. Loukoianov, A. Blechl, G. Tranquilli, W. Ramakrishna, P. SanMiguel, J.L. Bennetzen, V. Echenique and J. Dubcovsky. 2004. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. Science, 303: 1640-1644.
22. Yan, L., D. Fu, C. Li, A. Blechl, G. Tranquilli, M. Bonafede, A. Sanchez, M. Valarik, S. Yasuda and J. Dubcovsky. 2006. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of FT. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103: 19581-19586.
23. Zhang, X.K., Y.G. Xiao, Y. Zhang, X.C. Xia, J. Dubcovsky and Z.H. He. 2008. Allelic variation at the vernalization genes, and in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit. Crop Science, 48: 458-470.

Application of Allele Specific Markers in Determining Alleles at *VRN-1* Loci in Bread Wheat Genotypes

Monireh Nazari[1], Khalil Zaynali Nezhad[2], Saeid Navabpour[3], Hassan Soltanlo[3] and Mohamdhadi Pahlavani[3]

1 and 3- M.Sc. Student and Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2- Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, (Corresponding Author: Khalil1381@yahoo.com)
Received: June 11, 2018 Accepted: December 29, 2018

Abstract

Wheat is the most important crop and is cultivated all over the world. Wheat has a wide range of adaptability to different climates. Vernalization genes are one of the important factors determining wheat adaptability. in wheat breeding program understanding the alleles at vernalization requirement gens are useful to introduce new cultivar for different climates. At the molecular level, the length of the vernalization period of common wheat (*Triticum aestivum* L.) is determined mainly by three loci: *VRN-1*, *VRN-2* and *VRN-3* .The *VRNA1*, *VRN-B1*, and *VRN-D1* genes are dominant for spring growth habit and epistatic to the alleles for winter growth habit. Therefore, winter cultivars are homozygous for the recessive alleles at the three *VRN-1* loci. In the current study, 34 bread wheat accessions plus Chinese Spring wheat were investigated for allelic variation at *Vrn1* loci. The current study showed that five genotypes had dominant allele at *VRN-A1*. *VRN-A1b* allele was not found at any of the genotypes. Only one genotype had *VRN-A1c* allele and 32 genotypes including the Chinese Spring showed *vrn-A1* allele. The genotype No. 6 unexpectedly had more than one allele. At locus *VRN-B,* 14 genotypes had dominant allele while 20 including the Chinese Spring showed recessive allele.

Keywords: Allelic Variation, Bread Wheat, Molecular Markers, Vernalization