

پیوستگی ژنتیکی ژن ناشناخته کنترل کننده وجود ریشک و ژن *Vrn-D1*

در گندم نان

Genetic linkage of an unknown gens controlling awn and *Vrn-D1* gene in bread wheat

ثریا پورتبریزی^۱، علی کاظمی پور^۱، قاسم محمدی نژاد^۲، غلامرضا خواجهویی نژاد^۱، روح اله عبدالشاهی^{۲*}

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار، دانشیار، بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه

شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۲- به ترتیب استاد، دانشیار، پژوهشگر فناوری تولیدات گیاهی و بخش زراعت و اصلاح نباتات دانشکده

کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

Pourtabrizi S¹, Kazemipour A¹, Mohamadi-Nejad GH², Khajoei-Nejad GH¹, Abdolshahi R^{*2}

1- PhD Student, Assistant Professor, Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2- Professor, Associate Professor, Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: abdosshahi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۴)

چکیده

ژن های *Vrn* کنترل عادت رشدی گندم (بهاره و پاییزه) را بر عهده دارند. علاوه بر این، این ژن ها نقش کلیدی در زمان گلدهی و زودرسی گندم ایفا می نمایند و در پژوهش های تحمل به خشکی بسیار مورد توجه هستند. در پژوهشی که به منظور ایجاد لاین های ایزوژن برای ژن های *Vrn-B1* و *Vrn-D1* طراحی شده بود، در نسل BC5F5 حاصل از تلاقی برگشتی روشن (والد گیرنده) و اکسکلیبر (والد بخشنده) مشخص شد برخی از لاین های ایزوژن دارای ریشک هستند. آنجا که والد تکراری بی ریشک و زمینه ژنتیکی لاین های ایزوژن با احتمال ۹۹/۹۹ درصد مشابه بود احتمال این که ژن کنترل کننده ریشک مستقل از دو ژن مورد نظر باشد رد شد. مشخص شد لاین های ایزوژن ریشک دار و بدون ریشک به ترتیب حامل آلل *Vrn-D1* و *Vrn-D1a* هستند. بنابراین مشخص شد ژن کنترل کننده ریشک و ژن *Vrn-D1* با هم ارتباط دارند و دو فرضیه لینکاژ ژنتیکی و پلیوتروپی مطرح شد. برای یافتن دلیل ژنتیکی این ارتباط، علاوه بر ارقام روشن و اکسکلیبر، ارقام رخشان، شاه پسند، مهدوی و کل حیدری نیز مورد ارزیابی ژنتیکی قرار گرفتند. نتایج این ارزیابی ها نشان داد ارقام ریشک دار شاه پسند، مهدوی و کل حیدری دارای ژنوتیپ *Vrn-D1/Vrn-D1* و رقم ریشک دار رخشان دارای ژنوتیپ *Vrn-D1a/Vrn-D1a* است. از این رو فرضیه پلیوتروپی رد و مشخص شد ژنی که با فاصله نزدیک از *Vrn-D1* قرار دارد ریشک داری را کنترل می نماید. فاصله این دو ژن چنان کم است که در ۱۴ نسل تکثیر جنسی، بین آن ها کراسینگ اور رخ نداده است. مکان ژنی *Vrn-D1* بر روی کروموزوم 5D قرار دارد و آلل *Vrn-D1a* عادت رشدی بهاره را کنترل می نماید. سه ژن شناخته شده بر روی کروموزوم های 4A، 5A و 6B ریشک داری را کنترل می نمایند و تا کنون ژن شناخته شده مهمی بر روی کروموزوم 5D شناسایی نشده است. بنابراین، ژنی که با فاصله کمی از *Vrn-D1* قرار دارد و ریشک داری را کنترل می نماید تا کنون ناشناخته باقی مانده است. در این پژوهش مشخص شد فنوتیپ بی ریشک بودن با آلل *Vrn-D1a* لینکاژ دارد. از آنجا که بی ریشک بودن صفت مطلوبی نیست، پیوستگی این دو ژن ارزش زراعی رقم را کاهش می دهد.

واژه های کلیدی

پلیوتروپی
تلاقی برگشتی
زودرسی
ژنتیک ریشک

مقدمه

گندم مهم‌ترین گیاهان زراعی جهان است و بیش از ۴۰ درصد کالری مورد نیاز مردم در سراسر دنیا را تأمین می‌نماید (Du et al. 2021). کشت این گیاه گستردگی بسیار قابل توجهی دارد. به‌طوری که تقریباً در سرتاسر دنیا گسترده شده است. سازگاری گسترده گندم به شرایط آب و هوایی توسط سه گروه ژنی بهاره سازی (*Vrn*)، فتوپریود (*Ppd*) و ژن‌های ذاتی زودرسی (*Eps*) کنترل می‌شود (Kato and Yamagata 1988). این ژن‌ها زودرسی را کنترل و در نتیجه آن اساس سازگاری ژنوتیپ با محیط‌های مختلف را پایه‌گذاری می‌نماید (Worland et al. 1998; Zhang et al. 2008). ژن‌های کنترل کننده فنولوژی، تعیین کننده عملکرد گندم در محیط هدف هستند. به‌عنوان مثال، برای حداکثر کردن پتانسیل عملکرد گندم، گلدهی بایستی در شرایط بهینه محیطی رخ دهد (Hyles et al. 2020). گلدهی در زمستان ممکن است ریسک سرمازدگی اندام‌های زایشی را افزایش و جذب نور خورشید را کاهش می‌دهد و باعث کاهش عملکرد شود (Dreccer et al. 2018). از طرف دیگر، اگر در محیط‌های گرم و خشک گیاه دیر وارد فاز زایشی شود، تنش‌های گرمایی و آبی می‌تواند عملکرد را کاهش دهند (Flohr et al. 2017; Hyles et al. 2020).

بهاره سازی توسط مکان‌های ژنی *Vrn-A1*، *Vrn-B1* و *Vrn-D1* کنترل می‌شود که بر روی کروموزوم‌های همیولوگ شماره ۵ قرار دارند (Zhang et al. 2022). از لحاظ میزان تأثیر این مکان‌های ژنی بر زودرسی، به‌صورت $Vrn-D1 < Vrn-B1 < Vrn-A1$ رتبه‌بندی می‌شوند (Ogbonnaya et al. 2017). در هر کدام از این مکان‌های ژنی، آلل‌های کنترل کننده عادت رشدی بهاره نسبت به پاییزه غلبه دارند. همین‌طور در هر سه مکان ژنی آلل‌های کنترل کننده عادت رشد بهاره نسبت به آلل‌های کنترل کننده عادت رشد پاییزه اپیستازی دارند. بنابراین، عادت رشدی پاییزه فقط زمانی مشاهده می‌شود که در هر سه مکان ژنی آلل‌های مغلوب وجود داشته باشند (Pugsley 1971). آلل *Vrn-A1a* مهم‌ترین آلل ایجاد عادت رشدی بهاره است که به تنهایی باعث عدم حساسیت به ورنالیزاسیون می‌شود. در حالی که آلل غالب در سایر مکان‌های ژنی نیاز ورنالیزاسیون را به‌طور نسبی برطرف می‌نماید (Pugsley 1972; Pugsley 1971). گستردگی ژن‌های *Vrn* در نواحی

مختلف جهان متفاوت است. به‌عنوان مثال فراوانی *Vrn-A1*، *Vrn-* *B1* و *Vrn-D1* در ارقام گندم مکزیکی به‌ترتیب ۳۹، ۴۱ و ۶۶ درصد است (Chen and Dubcovsky 2012)، *Vrn-A1a* در اروپا و *Vrn-D1a* در ژاپن، چین و نواحی مدیترانه‌ای فراوانی بیشتری دارند (Iwaki et al. 2001; Fu et al. 2005; Zhang et al. 2008). تفاوت فراوانی آلل‌های *Vrn* در مناطق مختلف جهان اهمیت سازگاری این ژن‌ها در گندم را نشان می‌دهد (Zhang et al. 2008).

ژن‌های بهاره سازی (*Vrn*) و فتوپریود (*Ppd*) تحمل به سرما را نیز کنترل می‌نمایند (Janmohammadi and Mahfoozi 2013; Babben et al. 2018; Zhang et al. 2022). در مقایسه با آلل غالب *Vrn-A1a*، آلل مغلوب *vrn-A1* به‌طور قابل ملاحظه‌ای (بیش از دو برابر) تحمل به سرما را افزایش می‌دهد (Linmin and Fowler 2006). در رابطه با ژن کنترل کننده عادت رشد که بر روی ژنوم D قرار دارد، ژنوتیپ‌های با عادت رشدی پاییزه (*vrn-* *D1/vrn-D1*) نسبت به ژنوتیپ‌هایی که عادت رشدی بهاره (*Vrn-* *D1a/vrn-D1a*) دارند تحمل به سرمای بیشتری نشان می‌دهند (Zhang et al. 2022). به‌طور کلی، آلل‌های غالب *Vrn* باعث کاهش تحمل به سرما می‌شوند و با گزینش به کمک نشانگر برای این ژن‌ها می‌توان تحمل به سرما را افزایش داد (Zhang et al. 2022). به همین دلیل است که در نواحی سرد با یخبندان زمستانه از ارقام پاییزه استفاده می‌شود.

ریشک بر روی نوک لما قرار دارد و در کاهش خسارت پرندگان نقش مهمی ایفا می‌نماید. این اندام در انتشار بذر گیاهان نقش ویژه‌ای دارد (Guo and Schnurbusch 2016) و باعث افزایش فتوسنتز گیاه می‌شود (Rebetzke et al. 2016). قرار گرفتن ریشک در بالای کانوپی باعث شده است به نور و دی‌اکسید کربن نامحدودی دسترسی داشته باشد، تولید اسمیلات‌ها را افزایش دهد (Rebetzke et al. 2016) و باعث افزایش عملکرد در شرایط دیم شود (Olugbemi et al. 1976; Motzo and Giunta 2002; Nie et al. 2020). ژن‌های غالبی که بر روی بازوی کوچک کروموزوم 4A، بازوی بزرگ کروموزوم 5A و بازوی کوچک 6B قرار گرفته‌اند نداشتن ریشک را کنترل می‌نمایند (Sourdille et al. 2002; Rebetzke et al. 2016). ژن B1 که بر روی کروموزوم 5A

نسل‌ها فقط بوته‌هایی که برای هر دو مکان ژنتیکی هتروزیگوس باشند ($Vrn-B1a/vrn-B1$ $Vrn-D1a/vrn-D1$) با کمک نشانگرهای اختصاصی گزینش شدند. در نسل BC_5F_5 فقط بوته‌های هموزیگوس شامل چهار ژنوتیپ‌های $Vrn-B1a/Vrn-B1a$ $Vrn-D1a/Vrn-D1a$ $vrn-B1/vrn-B1$ و $vrn-D1/vrn-D1$ گزینش و تکثیر شدند. با توجه به شجره، میزان شباهت زمینه ژنتیکی چهار لاین ایزوژن ایجاد شده ۹۹/۹۹ درصد است. این شباهت بسیار بالای زمینه ژنتیکی، بستر مطالعه دقیق این لاین‌های ایزوژن را ایجاد می‌نماید.

استخراج DNA والدین و نتاج بر اساس روش Zhang et al. (1998) با اندکی تغییرات انجام شد. برای این منظور Tris-base (غلظت نهایی ۱۰۰ میلی‌مولار) و EDTA (غلظت نهایی ۲۰ میلی‌مولار) در آب مقطر اتوکلاو شده حل شدند. سپس NaCl (غلظت نهایی ۱/۴ مولار)، ۲% CTAB و ۲% PVP حل شد و محلول به pH=8 رسید. با افزودن آب مقطر تا حجم نهایی، بافر استخراج تهیه شد. ۰/۵ گرم از بافت تازه‌ی برگ در ازت مایع پودر و به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد. بعد از افزودن ۱۰۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۴ میکرولیتر مرکاپتواتانول، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای اثربخشی بیشتر، تیوب‌ها در فواصل زمانی ۱۰ دقیقه تکان داده شدند. ۷۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزوامیل الکل با نسبت ۲۴ به ۱ به مخلوط هر تیوب اضافه و ۵ دقیقه ورتکس شد. تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز بالایی به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و به اندازه‌ی حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه و با دست به آرامی مخلوط شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. تیوب‌ها ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس فاز رویی بیرون ریخته شد. پلیت DNA هر تیوب با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ ورتکس شد تا رسوب جدا، در الکل شناور و شستشو به‌خوبی انجام شود. سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از بیرون ریختن بافر شستشو، به‌منظور خشک کردن DNA تیوب‌ها به مدت ۲۰

قرار دارد مهم‌ترین ژن شناخته شده کنترل ریشک است. آلل غالب این مکان ژنی، بی ریشک بودن را کنترل می‌نماید و باعث افزایش تعداد سنبلیچه در سنبله و کاهش وزن هزار دانه می‌شود (DeWitt et al. 2020). هدف این پژوهش بررسی ارتباط ژنتیکی ژن‌های کنترل کننده بهاره سازی (Vrn) و ریشک‌داری در جمعیت حاصل از تلاقی برگشتی روشن (والد تکراری) و اکسکلیر (والد بخشنده) است.

مواد و روش‌ها

در پژوهشی که برای بررسی تأثیر زودرسی بر عملکرد گندم نان طراحی شده بود، زودرسی با استفاده از روش تلاقی برگشتی از رقم استرالیائی اکسکلیر به رقم روشن منتقل شد. تلاقی روشن و اکسکلیر در سال ۱۳۹۰ انجام شد تا نسل F_1 حاصل شود. در سال بعد نتاج F_1 با والد تکراری (رقم روشن) تلاقی برگشتی داده شد تا نسل BC_1F_1 حاصل شود. سال بعد نتاج زودرس نسل BC_1F_1 گزینش و خودگشن شدند تا نسل BC_1F_2 حاصل شود. در سال بعد نتاج BC_1F_2 کشت شدند، زودرس‌ترین بوته گزینش و با رقم روشن تلاقی برگشتی داده شد تا نسل BC_2F_1 حاصل شود. در سال بعد زودرس‌ترین بوته نتاج BC_2F_1 با رقم روشن تلاقی برگشتی داده شد تا نسل BC_3F_1 حاصل شود. نتاج زودرس نسل BC_3F_1 در سال بعد، گزینش و خودگشن شدند تا نسل BC_3F_2 حاصل شود. در این نسل بوته‌های زودرس و دیررس گزینش شدند و ارزیابی مقدماتی عملکرد انجام شد (Dorrani-Nejad et al. 2022). در ادامه پروژه، زودرس‌ترین بوته نسل BC_3F_2 گزینش و با رقم روشن تلاقی برگشتی داده شد تا نسل BC_4F_1 حاصل شود. در این نسل والدین و نتاج از لحاظ ژن‌های کنترل‌کننده نیاز سرمایی (بهاره سازی) بررسی شدند. از لحاظ ژن $Vrn-A1$ والدین تنوع ژنتیکی نداشتند، بنابراین در ادامه ارزیابی این مکان ژنی انجام نشد. در سال بعد، بوته نتاج BC_4F_1 از لحاظ ژن‌های $Vrn-B1$ و $Vrn-D1$ بررسی و نتاج هتروزیگوت در هر دو مکان ژنتیکی گزینش و با رقم روشن تلاقی برگشتی داده شدند تا نسل BC_5F_1 حاصل شود. با استفاده از خودگشنی‌های پیایی نسل‌های BC_5F_2 ، BC_5F_3 و BC_5F_4 حاصل شد. در تمام این

دستگاه الکتروفورز Labnet جدا شدند و زیر نور فرابنفش در دستگاه Gel document (Quantom4) عکس برداری انجام شد. رقم استرالیایی اکسکلیر ریشک دار و رقم روشن در اصطلاح عامیانه بی ریشک است ولی از لحاظ گیاه شناسی اندکی ریشک دارد و به گروه گندم های awnleted تعلق دارد. در نسل BC₅F₅ و پس از ۱۴ نسل تکثیر جنسی متوجه شدیم برخی از نتاج دارای ریشک هستند. در ادامه ارتباط ریشک و ژن های *Vrn* بررسی خواهد شد.

نتایج و بحث

والدین تلاقی در پروژه مورد نظر از لحاظ ژن های *Vrn* مورد بررسی قرار گرفتند. هر دو دارای ژنوتیپ *vrn-A1/vrn-A1* بودند (شکل ۱) که عادت رشدی پائیزه را کنترل می نمایند (Pugsley 1971). از آنجایی که هر دو والد در این مکان ژنی دارای عادت رشدی پائیزه بودند امکان تهیه لاین های ایزوژن بهاره و پائیزه در این مکان ژنی وجود نداشت. از طرف دیگر، در مکان ژنی *Vrn-B1* رقم روشن دارای ژنوتیپ *vrn-B1/vrn-B1* و رقم اکسکلیر دارای ژنوتیپ *Vrn-B1a/Vrn-B1a* بود. آلل های *Vrn-B1a* و *vrn-B1* به ترتیب عادت رشدی بهاره و پائیزه را کنترل می نمایند (Pugsley 1971). همین طور در مکان ژنی *Vrn-D1*، رقم روشن دارای ژنوتیپ *Vrn-D1a/Vrn-D1a* و رقم اکسکلیر دارای ژنوتیپ *vrn-D1/vrn-D1* بود. آلل های *Vrn-D1a* و *vrn-D1* به ترتیب عادت رشدی بهاره و پائیزه را کنترل می نمایند (Pugsley 1971).

با توجه به این نتایج چهار لاین های ایزوژن با ژنوتیپ های *Vrn-B1a/Vrn-B1a vrn-B1a/Vrn-B1a Vrn-D1a/Vrn-D1a D1/vrn-D1* و *vrn-B1/vrn-B1 Vrn-D1a/Vrn-D1a* برای این دو مکان ژنی ایجاد شد (شکل ۱).

در نسل BC₄F₂ مشخص شد برخی از نتاج دارای ریشک بودند. همچنین در نسل BC₅F₅ نیز برخی از ژنوتیپ ها دارای ریشک بود (شکل ۳). لازم به ذکر است که در نسل های BC₅F₁ تا BC₅F₄ نتاج ریشک دار مشاهده نشد.

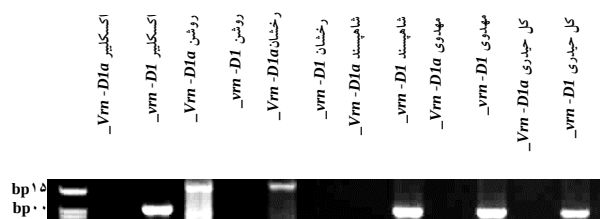
دقیقه به صورت در باز در دمای اتاق قرار داده شد. به منظور حل نمودن DNA مقدار ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به رسوب DNA اضافه شد. سپس تیوب جهت نگهداری به فریزر منتقل شد. جهت بررسی کیفیت DNA از ژل آگارز یک درصد و جهت بررسی کمیت آن از دستگاه اسپکتوفتومتری نانودراپ Nanodrop OneC شرکت ThermoScientific استفاده شد.

مخلوط واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA الگوی ژنومی، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۰ میکرولیتر pcr master mix و ۶ میکرولیتر آب بود. این واکنش با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. برای بررسی ژن *Vrn-B1* از جفت آغازگر ATCATCTTCTCCACCAAGGG و CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA برای تکثیر آلل *Vrn-B1a* با طول ۱۱۲۴ جفت باز (Shcherban et al. 2012) و جفت آغازگر GTTGGTTCAAACAGAGAGC و CACTGGTGGTAGCTGAGATT برای تکثیر آلل *Vrn-B1* با طول ۱۱۴۹ جفت باز (Fu et al. 2005) استفاده شد. همچنین برای تکثیر ژن *Vrn-D1* از جفت آغازگر GTTGTCTGCCTCATCAAATCC و GGTCCTGGTGGTCTGTGC برای تکثیر آلل *Vrn-D1a* با طول ۱۶۷۱ جفت باز (Fu et al. 2005) و جفت آغازگر GTTGTCTGCCTCATCAAATCC و AAATGAAAAGGAACGAGAGCG برای تکثیر آلل *Vrn-D1* با طول ۹۹۷ جفت باز (Fu et al. 2005) استفاده شد. برای به دست آوردن دمای مطلوب اتصال آغازگرها، واکنش PCR گرادینت برای هر کدام از جفت آغازگرها انجام شد. در برنامه واکنش زنجیره ای پلیمرز، واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و مراحل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها به مدت ۱ دقیقه و توسعه زنجیره پلیمرز در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه در ۳۶ سیکل در دستگاه (Analytik jena (Biometra Tone انجام شد. مرحله توسعه نهایی در واکنش زنجیره ای پلیمرز در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از تکثیر، محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد با رنگ آمیزی ایمن توسط DNA green viewer و در



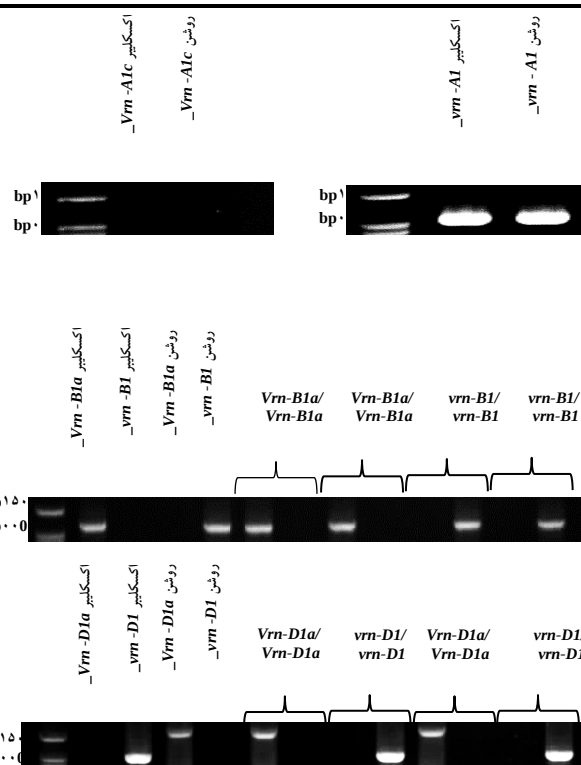
شکل ۲- مورفولوژی خوشه چهار لاین ایزوژن برای دو مکان ژنی *Vrn-B1* و *Vrn-D1*

با توجه به نتایج مشاهده شده هر دو دلیل ژنتیکی مطرح شده می‌توانند این پدیده را توجیه نمایند. برای یافتن پاسخ این پرسش علاوه بر ارقام روشن و اکسکلیبر، ارقام رخشان، شاه‌پسند، مهدوی و کل‌حیدری نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. به جز رقم روشن، سایر ارقام ریشک‌دار هستند. نتایج ارزیابی ژنتیکی نشان داد ارقام ریشک‌دار شاه‌پسند، مهدوی و کل‌حیدری دارای ژنوتیپ *Vrn-D1/vrn-D1* و رقم ریشک‌دار رخشان دارای ژنوتیپ *Vrn-D1a/Vrn-D1a* است (شکل ۳). از این رو فرضیه پلیوتروپی رد می‌شود.



شکل ۳- نتایج ارزیابی مکان ژنی *Vrn-D1* در ارقام ریشک‌دار رخشان، شاه‌پسند، مهدوی، کل‌حیدری، اکسکلیبر و رقم روشن (Awnleted)

لازم به ذکر است به دلیل اینکه ریشک‌داری صفتی است که تحت کنترل چندین مکان ژنی است اطلاعات حاصل شده نمی‌تواند دلیل قطعی بر رد فرضیه پلیوتروپی باشد ولی با احتمال بسیار بالا فرضیه لینکاز ژنتیکی مورد پذیرش قرار می‌گیرد.



شکل ۱- عدم تنوع ژنتیکی بین والد روشن (والد گیرنده) و اکسکلیبر (والد بخشنده) برای مکان ژنی *Vrn-A1* و تنوع ژنتیکی والدین و لاین‌های ایزوژن برای دو مکان ژنی *Vrn-B1* و *Vrn-D1*

دلیل این امر این است که در خلال این نسل‌ها برای هر دو مکان ژنی *Vrn-D1* و *Vrn-B1* نتاج هتروزیگوت گزینش شدند و به دلیل غالبیت بی‌ریشکی نسبت به ریشک‌داری (Sourdille et al. 2002; Rebetzke et al. 2016)، نتاج ریشک‌دار در این نسل‌ها مشاهده نشد.

ژنوتیپ‌های شکل ۲ (از چپ به راست) ۱- بی‌ریشک *Vrn-D1/vrn-D1*، ۲- ریشک‌دار *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۳- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۴- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۵- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۶- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۷- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۸- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۹- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۱۰- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۱۱- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۱۲- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۱۳- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۱۴- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۱۵- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۱۶- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۱۷- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۱۸- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۱۹- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۲۰- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۲۱- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۲۲- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۲۳- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۲۴- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۲۵- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۲۶- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۲۷- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۲۸- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۲۹- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۳۰- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۳۱- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۳۲- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۳۳- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۳۴- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۳۵- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۳۶- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۳۷- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۳۸- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۳۹- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۴۰- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۴۱- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۴۲- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۴۳- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۴۴- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۴۵- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۴۶- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۴۷- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۴۸- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۴۹- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۵۰- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۵۱- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۵۲- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۵۳- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۵۴- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۵۵- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۵۶- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۵۷- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۵۸- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۵۹- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۶۰- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۶۱- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۶۲- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۶۳- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۶۴- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۶۵- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۶۶- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۶۷- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۶۸- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۶۹- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۷۰- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۷۱- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۷۲- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۷۳- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۷۴- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۷۵- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۷۶- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۷۷- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۷۸- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۷۹- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۸۰- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۸۱- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۸۲- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۸۳- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۸۴- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۸۵- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۸۶- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۸۷- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۸۸- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۸۹- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۹۰- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۹۱- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۹۲- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۹۳- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۹۴- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۹۵- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۹۶- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۹۷- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۹۸- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*، ۹۹- ریشک‌دار *Vrn-B1a/Vrn-B1a*، ۱۰۰- بی‌ریشک *Vrn-D1a/Vrn-D1a*.

نتیجه گیری کلی

در پژوهش حاضر چهار لاین ایزوژن برای دو مکان ژنی *Vrn-B1* و *Vrn-D1* ایجاد شد. این ژن‌ها زودرسی را کنترل می‌نمایند (Worland et al. 1998; Zhang et al. 2008) و با کنترل زودرسی باعث سازگاری گندم به شرایط آب و هوایی مختلف (Kato and Yamagata 1988) می‌شوند و در نهایت عملکرد گندم در محیط هدف را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Flohr et al. 2017; Dreccer et al. 2020). ژن‌های *Vrn-B1* و *Vrn-D1* علاوه بر زودرسی تحمل به سرما را نیز کنترل می‌نمایند (Janmohammadi and Mahfoozi 2013; Babben et al. 2018; Zhang et al. 2022). به عنوان مثال ژنوتیپ‌های با عادت رشدی پاییزه (*vrn-D1/vrn-D1*) نسبت به ژنوتیپ‌هایی که عادت رشدی بهاره (*Vrn-D1a/Vrn-D1a*) دارند تحمل به سرمای بیشتری نشان می‌دهند (Zhang et al. 2022). به طور کلی، آلل‌های غالب *Vrn* باعث کاهش تحمل به سرما می‌شوند و با گزینش به کمک نشانگر برای این ژن‌ها می‌توان تحمل به سرما را افزایش داد (Zhang et al. 2022). به همین دلیل است که در نواحی سرد با یخبندان زمستانه از ارقام پاییزه استفاده می‌شود.

نتایج این پژوهش نشان داد بین صفت ریشک و مکان ژنی *Vrn-D1* پیوستگی ژنتیکی وجود دارد. فاصله این دو مکان ژنی به قدری کم است که در ۱۴ نسل تکثیر جنسی بین این دو مکان ژنی کراسینگ اور رخ نداده است. مکان ژنی *Vrn-D1* بر روی کروموزوم 5D قرار دارد و آلل‌های غالب مکان ژنی *Vrn-D1* که با *Vrn-D1a* نشان داده می‌شود عادت رشدی بهاره را کنترل

می‌نماید (Fu et al. 2005; Zhang et al. 2022). در این مکان ژنی آلل‌های غالب با حذف بخشی از توالی آلل مغلوب ایجاد شده‌اند (Zhang et al. 2012). همچنین سه ژن شناخته شده بر روی بازوی کوچک کروموزوم 4A، بازوی بزرگ کروموزوم 5A و بازوی کوچک 6B ژنتیک ریشک را کنترل می‌نمایند (Sourdille et al. 2016; Rebetzke et al. 2002). که ژن B1 که بر روی کروموزوم 5A قرار دارد مهم‌ترین آن‌ها است (DeWitt et al. 2020). همان‌طور که این نتایج نشان می‌دهد تا کنون ژن شناخته شده مهمی بر روی کروموزوم 5D شناسایی نشده است. بنابراین، ژنی که با فاصله کمی از *vrn-D1* قرار دارد و ریشک‌داری را کنترل می‌نماید ناشناخته باقی مانده است. با تلاقی لاین‌های ایزوژن مکان ژنی *Vrn-D1* و ایجاد جمعیت در حال تفرق بسیار بزرگ می‌توان فاصله ژن کنترل کننده ریشک و *vrn-D1* را محاسبه نمود. در این پژوهش مشخص شد فنوتیپ بی‌ریشک بودن با آلل *Vrn-D1a* لینکاز دارد. از آنجا که آلل *Vrn-D1a* باعث زودرسی می‌شود (Zhang et al. 2022) و بی‌ریشک بودن صفت مطلوبی نیست (Rebetzke et al. 2016)، پیوستگی این دو ژن ارزش زراعی ژنوتیپ را کاهش می‌دهد.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) به خاطر حمایت مالی این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

- Babben S, Schliephake E, Janitza P, Berner T, Keilwagen J, Koch M, ... & Perovic D (2018) Association genetics studies on frost tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) reveal new highly conserved amino acid substitutions in CBF-A3, CBF-A15, VRN3 and PPD1 genes. *BMC genomics* 19:1-24.
- Chen A, Dubcovsky J (2012) Wheat TILLING mutants show that the vernalization gene VRN1 down-regulates the flowering repressor VRN2 in leaves but is not essential for flowering. *PLoS Genet* 12:e1003134.
- DeWitt N, Guedira M, Lauer E, Sarinelli M, Tyagi P, Fu D, Hao Q, Murphy JP, Marshall D, Akhunova A, Jordan K

- (2020) Sequence-based mapping identifies a candidate transcription repressor underlying awn suppression at the B1 locus in wheat. *New Phytologist*. 225:326-339.
- Dreccer MF, Fainges J, Whish J, Ogonnaya FC, Sadras VO (2018) Comparison of sensitive stages of wheat, barley, canola, chickpea and field pea to temperature and water stress across Australia. *Agricultural and Forest Meteorology*. 248:275-294.
- Du D, Zhang D, Yuan J, Feng M Li Z, Wang Z, Zhang Z, Li X, Ke W, Li R, Chen Z (2021) FRIZZY PANICLE defines a regulatory hub for simultaneously controlling

- spikelet formation and awn elongation in bread wheat. *New Phytologist* 231:814-833.
- Flohr BM, Hunt JR, Kirkegaard JA, Evans JR (2017) Water and temperature stress define the optimal flowering period for wheat in south-eastern Australia. *Field Crops Research* 209:108-119.
- Fu D, Szűcs P, Yan L, Helguera M, Skinner JS, Von Zitzewitz J, Hayes PM, 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* 273:54-65.
- Guo Z, and Schnurbusch T (2016) Costs and benefits of awns. *Journal of Experimental Botany*. 67:2533.
- Hyles J, Bloomfield MT, Hunt JR, Trethowan RM, Trevaskis B (2020) Phenology and related traits for wheat adaptation. *Heredity* 125:417-430.
- Iwaki K, Haruna S, Niwa T, Kato K (2001) Adaptation and ecological differentiation in wheat with special reference to geographical variation of growth habit and *Vrn* genotype. *Plant Breeding* 120:107-114.
- Janmohammadi M, Mahfoozi S (2013) Regulatory network of gene expression during the development of frost tolerance in plants. *Current Opinion in Agriculture* 2:11.
- Kato K, Yamagata H (1988) Method for evaluation of chilling requirement and narrow-sense earliness of wheat cultivars. *Japanese Journal of Breeding* 38:172-186.
- Limin AE, Fowler DB (2006) Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): response to photoperiod, vernalization, and plant development. *Planta* 224:360-366.
- Motzo R, Giunta F (2002) Awnedness affects grain yield and kernel weight in near-isogenic lines of durum wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 53:1285-1293.
- Niu J, Zheng S, Shi XSiY, Tian S, He Y, Ling HQ (2020) Fine mapping and characterization of the awn inhibitor B1 locus in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *The Crop Journal* 8:613-622.
- Ogbonnaya FC, Rasheed A, Okechukwu EC (2017) Genome-wide association study for agronomic and physiological traits in spring wheat evaluated in a range of heat prone environments. *Theor Appl Genet* 130:1819-1835.
- Olugbemi LB, Austin RB, Bingham J (1976) Effects of awns on the photosynthesis and yield of wheat, *Triticum aestivum*. *Annals of Applied Biology* 84:241-250.
- Pugsley AT (1971) A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 22:21-31.
- Pugsley AT (1972) Additional genes inhibiting winter habit in wheat. *Euphytica* 21:547-552.
- Rebetzke, GJ, Bonnett DG, Reynolds MP (2016) Awns reduce grain number to increase grain size and harvestable yield in irrigated and rainfed spring wheat. *Journal of Experimental Botany* 67:2573-2586.
- Shcherban AB, Börner A, Salina EA (2015) Effect of *VRN-1* and *PPD-D1* genes on heading time in European bread wheat cultivars. *Plant Breeding* 134:49-55.
- Sourdille P, Cadalen T, Gay G, Gill B, and Bernard M (2002) Molecular and physical mapping of genes affecting awning in wheat. *Plant Breeding* 121:320-324.
- Worland AJ, Börner A, Korzun VLi, Petrovic S, Sayers EJ (1998) The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats. *Euphytica* 100:385-394.
- Zhang H, Xue X, Guo J, Huang Y, Dai X, Li T, Hu J, Qu Y, Yu L, Mai C, Liu H (2022) Association of the Recessive Allele *vrn-D1* With Winter Frost Tolerance in Bread Wheat. *Frontiers in plant science* 13.
- Zhang J, Wang Y, Wu S, Yang J, Liu H, Zhou Y (2012) A single nucleotide polymorphism at the *Vrn-D1* promoter region in common wheat is associated with vernalization response. *Theoretical and Applied Genetics* 125:1697-1704.
- Zhang XK, Xiao YG, Zhang Y, Xia XC, Dubcovsky J, He ZH (2008) Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, and *Vrn-B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit. *Crop science* 48:458-470.