Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 49, No 1, Spring 2018 (271-280)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.237091.1280

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۷ (ص ۲۸۰-۲۷۱)

بررسی الگوی بیان ژن‌های *AsFT* و *galFY* در فرایند تکامل زایشی در اندام‌های مختلف برخی از همگروه‌های سیر ایرانی (*Allium sativum* L.)

فهیمه قائمی‌زاده[۱]، فرشاد دشتی[۲*] و علیرضا شافعی نیا[۳]
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه بوعلی سینا
۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/٤/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۹/۷)

چکیده

درک درست از الگوی بیان ژن‌های کنترل‌کنندهٔ گلدهی در نژادگان (ژنوتیپ)های زایای سیر، روند برنامه‌های اصلاحی آن را بهبود می‌بخشد. بدین منظور الگوی بیان ژن‌های *AsFT 1,2,4* و *galFY* در اندام‌های رویشی و زایشی سه همگروه گل‌ده، نیمه گل‌ده و غیر گل‌ده سیر ایرانی بررسی شد. بیشترین بیان نسبی *galFY* هشت هفته پس از کشت در مریستم هر سه همگروه مشاهده شد و بیان آن در نوع گل‌ده ۲۰ برابر غیر گل‌ده بود. بیان *galFY* همچنین در گل‌آذین همگروه گل‌ده نسبت به شاهد (مرحلهٔ ۸ برگی سیر غیر گل‌ده) افزایش یافت. *AsFT4* در سوخ همهٔ همگروه‌ها و *AsFT1* در مقادیر بسیار کم در گل‌آذین و گل همگروه گل‌ده بیان شدند. بیشترین بیان نسبی *AsFT2* ۱۲ هفته پس از کشت در برگ هر سه همگروه مشاهده شد و در همگروه گل‌ده ۳/۲ برابر بیشتر از غیر گل‌ده بود. بیان *AsFT2* تنها در مریستم همگروه گل‌ده و نیمه گل‌ده مشاهده شد. درمجموع به نظر می‌رسد *galFY* یک ژن محرک زمان گلدهی و هویت مریستم گل و *AsFT2* یک ژن محرک زمان گلدهی در همگروه گل‌ده هستند. میزان پایین بیان این دو ژن در همگروه نیمه گل‌ده و غیر گل‌ده منجر به القا گلدهی می‌شود، اما از تشکیل کامل ساقهٔ گل‌دهنده جلوگیری می‌کند. به‌طوری‌که در سیر غیر گل‌ده ساقهٔ گل‌دهنده تشکیل نشده و در سیر نیمه‌گل‌ده ساقهٔ گل‌دهندهٔ بسیار کوتاه در میان‌برگ‌ها تشکیل می‌شود.

واژه‌های کلیدی: گلدهی، *FLOWERING LOCUS T*، *LEAFY*، Real-Time PCR.

Expression Analysis of *galFY* and *AsFT* during reproductive development in different organs of some Iranian Garlic (*Allium sativum* L.) Clones

Fahimeh Ghaemizadeh[1], Farshad Dashti[2]* and Ali Reza Shafeinia[3]
1, 2, Ph. D. Candidate and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan. Iran
3. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Ramin Agriculture and Natureal Resource University of Khuzestan, Iran
(Received: Jul. 6, 2017 - Accepted: Nov. 28, 2017)

ABSTRACT

A true understanding of the temporal and spatial expression patterns of the genetic coding of florogenesis in fertile garlic genotypes will facilitate garlic breeding. Herein we studied the expression patterns of *galFY* and *AsFT 1, 2, 4* during reproductive development in different organs of bolting, semi-bolting and non-bolting Iranian garlic clones. The highest relative expression of the *galFY* was observed in the meristem of all clones eight weeks after planting, which was 20 fold more in bolting than in non-bolting clone. *galFY* expression was also increased in the inflorescence of bolting clone in comparison to control (eight leaves of non-bolting clone). *AsFT4* and *AsFT1* were expressed in the bulbs of all clones and at low amount in inflorescence and flowers of bolting clone, respectively. The highest relative expression of the *AsFT2* was observed in the leaves of all clones 12 weeks after culture, which was 3.2 times more in bolting than in non-bolting clones. *AsFT2* was also expressed in the meristem of bolting and semi-bolting clones. It is suggested that *galFY* plays its role in flowering integration and floral identity and *AsFT2* could be a flowering integrator gene in bolting clone. Low expression of *galFY* and *AsFT2* in semi- and non-bolting clones causes vegetative to reproductive transition but inhibits complete scape elongation. So that in the non-bolting garlic scape aborts and in the semi-bolting garlic a very short scape forms among the leaves.

Keywords: Flowering, *LEAFY*, *FLOWERING LOCUS T*, Real-Time PCR

* Corresponding author E-mail: dashti1350@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سیر (*Allium sativum* L.) پس از پیاز دومین گونهٔ مهم از جنس *آلیوم* است. همهٔ رقم‌های تجاری سیر به‌کلی عقیم بوده و به‌صورت غیرجنسی افزونش می‌شوند (Brewster, 2008). از محدودیت‌های افزونش غیرجنسی، محدودیت در برنامه‌های اصلاحی و بررسی‌های ژنتیکی است. شناسایی همگروه‌های مختلف سیر، درک درست از ژن‌های کنترل‌کنندهٔ گلدهی و رابطهٔ متقابل آن‌ها با محیط می‌تواند دانش ما را درزمینهٔ فرایند گلدهی و بازگرداندن قابلیت گلدهی به سیر افزایش دهد (Kamenetsky *et al*., 2004b). نژادگان‌های سیر به سه گروه غیر گل‌ده، نیمه گل‌ده و گل‌ده طبقه‌بندی می‌شوند. در همگروه‌های غیر گل‌ده ساقهٔ گل‌دهنده تشکیل نشده و یا در مراحل اولیه سقط می‌شود. در همگروه‌های نیمه گل‌ده یا به عبارتی نژادگان‌هایی با گلدهی ناقص، توقف نمو ساقهٔ گل‌دهنده اغلب باعث ایجاد ساقهٔ گل‌دهندهٔ بسیار کوتاه در میان‌برگ‌ها می‌شود. در همگروه‌های گل‌دهنده ساقهٔ گل‌دهنده با اندازهٔ مناسب، حاوی گل و سیرچه‌های هوایی تشکیل می‌شود (Takagi, 1990; Kamenetsky *et al*., 2004).

انتقال از مرحلهٔ (فاز) رویشی به زایشی و تشکیل گل‌آذین و گل در گیاهان شامل چندین مرحلهٔ پیوسته است. درمجموع چندین گروه ژنی مسیر گلدهی را در گیاهان کنترل می‌کنند. ژن‌های محرک زمان گلدهی، ژن‌های هویت مریستم گل و ژن‌های هویت اندام گل در گیاه آرابیدوبسیس و گیاهان مدل شناسایی شده‌اند (Glover, 2007). عامل‌های محیطی و درونی مؤثر بر گلدهی با تحریک ژن‌های محرک زمان گلدهی منجر به انتقال گیاه از مرحلهٔ رویشی به زایشی می‌شوند. این ژن‌ها در مریستم انتهایی بیان ژن‌های هویت مریستم گل را افزایش داده و منجر به حفظ و پایداری مریستم گل و گل‌آذین می‌شوند (Blazquez *et al*., 2006).

FLOWERING LOCUS T (*FT*) به‌عنوان یک ژن محرک زمان گلدهی در گیاه آرابیدوبسیس و برخی از گونه‌های گیاهی شناسایی و تأثیر بهاره‌سازی (ورنالیزاسیون) بر بیان آن در برخی از گونه‌های گیاهی بررسی شده است. در همهٔ گونه‌های مورد بررسی بهاره‌سازی بازدارندهٔ بیان ژن‌های بازدارندهٔ گلدهی شده و به دنبال آن بیان ژن *FT* افزایش یافته است. در گیاه آرابیدوبسیس بهاره‌سازی منجر به خاموشی ژن *FLOWERING LOCUS C (FLC)* می‌شود. ژن *FLC* یک عامل نسخه‌برداری مرتبط با تکامل را کد کرده و بازدارندهٔ بیان ژن *FT* می‌شود (Song *et al*., 2012). در چغندر دو نسخه از ژن *FT* (*FT1* و *FT2*) شناسایی شده است. در فرایند بهاره‌سازی با توقف بیان ژن *FT1*، بیان ژن *FT2* افزایش یافته و گلدهی صورت می‌گیرد (Pin *et al*., 2010). در پیاز ۸ رونوشت از ژن *FT* به نام‌های *AcFT1-8* شناسایی شده که هر یک عملکردی متفاوت در رشد رویشی و زایشی پیاز دارند. در ارتباط با گلدهی بیان ژن *AcFT2* پس از رفع نیاز سرمایی در جوانهٔ مرکزی (محل طویل شدن ساقهٔ گل‌آذین) افزایش یافته و منجر به انتقال گیاه از مرحلهٔ رویشی به زایشی می‌شود. این ژن در برگ پیاز در حال گلدهی نیز همچنان بیان می‌شود (Lee *et al*., 2013). نقش *FT* در تکامل زایشی سیر به‌طور کامل مشخص نشده است بااین‌حال نتایج به‌دست‌آمده از توالی‌یابی RNA و تجزیه‌های بیوانفورماتیکی حضور توالی‌هایی از رونوشت ژن *FT* را در اندام‌های رویشی و زایشی یک نژادگان گلدهٔ سیر نشان داده است (Kamenetsky *et al*., 2015). همچنین بیان رونوشت‌های *AsFT1,2,4* در سوخ و جوانهٔ مرکزی پس از انباردهی در دمای ۲ و ۳۳ درجه تغیر می‌کند (Shalom *et al*., 2015).

ژن *LEAFY (LFY)* برای نخستین بار در گیاه آرابیدوبسیس شناسایی شده است. این ژن نقش دوگانه داشته و هم به‌عنوان یک ژن محرک زمان گلدهی و هم به‌عنوان ژن هویت مریستم گل عمل می‌کند (Jack, 2004). در گیاه آرابیدوبسیس *LFY* به‌عنوان یک ژن هویت مریستم گل نقش مهم‌تری داشته و تحت تأثیر *FT* در مریستم انتهایی بیان می‌شود. این ژن در گیاه علف تالدر مقادیر کمتر به‌عنوان یک ژن محرک زمان گلدهی نیز عمل می‌کند (Jack, 2004). همسان (هومولوگ) *LFY* به نام *AcLFY* در پیاز شناسایی و بیشترین میزان بیان این

Archive of SID

www.SID.ir

ژن در مریستم زایشی مشاهده شده است (Yang, 2016). در سیر نیز همسان *LFY* به نام *galFY* شناسایی و نقش آن به‌عنوان یک ژن محرک زمان گلدهی و ژن هویت مریستم گل در یک نژادگان گل‌ده مشخص شده است (Rotem *et al*., 2011).

درمجموع تاکنون هیچ پژوهشی در ارتباط با الگوی زمانی و مکانی بیان *AsFT* در فرایند تکامل زایشی در همگروه‌های سیر گل‌ده، نیمه گل‌ده و غیر گل‌ده انجام نشده است. همچنین، روند زمانی و مکانی بیان ژن *galFY* در هم‌گروه‌های سیر گلدهٔ ایرانی و مقایسهٔ آن‌ها با همگروه‌های سیر نیمه گل‌ده و غیره گل‌ده مشخص نشده است. این تحقیق برای نخستین بار با هدف بررسی الگوی بیان زمانی و مکانی و درک درست از بیان ژن *galFY* و سه رونوشت از ژن *AsFT (AsFT1,2,4)* در فرایند تکامل زایشی در هم گروهای سیر گل‌ده، نیمه گل‌ده و غیر گلدهٔ ایرانی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و نمونه‌گیری

برای انجام این پژوهش از سه همگروه غیر گل‌ده (همدان)، گل‌ده (مازند زابل) و نیمه گل‌ده (لنگرود) گیاه سیر (*Allium sativum* L.) استفاده شد. سیرچه‌ها از محل اصلی رویش گردآوری و در اواسط آبان ماه سال ۱۳۹۴ در ایستگاه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا کشت شدند. نمونه‌گیری از مریستم انتهایی به‌صورت ماهیانه از آذر ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵، برگ و سوخ به‌صورت ماهیانه از آذر ۱۳۹۴ تا تیر ۱۳۹۵، گل‌آذین در اردیبهشت ۱۳۹۵ و غنچه‌های گل در دو مرحله (سبز تیره و ارغوانی) در ماه‌های خرداد و تیر ۱۳۹۵ در دو تکرار بیولوژیکی صورت گرفت (درمجموع ۴۸ تکرار).

استخراج RNA و ساخت cDNA

RNA کل از بافت گیاهی با استفاده از کیت تجاری innuPREP (analytikjena، آلمان) استخراج شد. غلظت RNA برحسب نانوگرم در میکرولیتر پس از هر استخراج، با استفاده از دستگاه نانودرآپ Thermo scientific (مدل ۲۳۰۰، آمریکا) و در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. برای ارزیابی کیفی RNA استخراج‌شده از روش الکتروفورز RNA روی ژل آگاروز ۱ درصد استفاده شد. پس از اطمینان از کیفیت RNA، ساخت cDNA با استفاده از کیت تجاری 2step-RT-PCR (سیناژن، ایران) و با استفاده از آغازگر oligod(T) انجام و غلظت سنجی cDNA (برای یکسان‌سازی غلظت نمونه‌ها) با استفاده نانودرآپ صورت گرفت.

بررسی بیان نسبی ژن *galFY* و *AsFT* با روش Real-Time PCR

واکنش Real-Time PCR با استفاده از کیت تجاری SYBR green YTA (یکتا تجهیز آزما، ایران) و با دستگاه تشخیص Light-Cycler 98 Real-Time PCR (Roche، آلمان) انجام شد. در این تحقیق، از جفت آغازگر *galFY* (Rotem *et al*., 2011)، جفت آغازگرهای *AsFT1*، *AsFT2* و *AsFT4* و نیز از ژن رمزکننده *Actin* (Shalom *et al*, 2015) به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. منحنی استاندارد برای ژن‌های مورد نظر در غلظت‌های مختلف cDNA رسم شد. کارایی جفت آغازگر با استفاده از رابطهٔ $E=10^{(1/slope)}-1$ محاسبه شد. مخلوط واکنش شامل مستر میکس SYBR green (۱x) (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۱۰۰ نانوگرم cDNA، ۰/۵میکرومولار از هر یک از آغازگرهای مستقیم و معکوس در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. برنامهٔ دمایی شامل ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل ۵ ثانیه دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس، ۲۰ ثانیه دمای ۶۰ درجهٔ سلسیوس و ۲۰ ثانیه دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس در نظر گرفته شد. همهٔ واکنش‌ها در دو تکرار بیولوژیکی و دو تکرار فنی انجام و برای هر ژن در هر آزمایش یک کنترل منفی (بدون cDNA) در نظر گرفته شد. پس از استخراج نتایج خام از دستگاه Real-Time PCR، تکرارهایی که افزونش غیراختصاصی (بیش از یک پیک در منحنی ذوب) داشتند از داده‌های آزمایش حذف شدند. در نهایت میزان بیان نسبی ژن‌ها با روش ΔΔCT و نرم‌افزار REST® محاسبه شد (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl *et al*., 2002).

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج و بحث

تفاوت ریخت‌شناختی

در سه همگروه گل‌ده، نیمه گل‌ده و غیر گل‌ده الگوی متفاوتی از گلدهی مشاهده شد. در همگروه گل‌ده ساقهٔ گل‌دهنده در اردیبهشت‌ماه ظاهر شد. گلچه و سیرچه‌های هوایی نیز در خرداد تا اواسط تیرماه روی گل‌آذین تشکیل شدند (شکل ۱). در همگروه نیمه گل‌ده یک ساقهٔ گل‌دهندهٔ بسیار کوتاه و ناقص بدون پیازچهٔ هوایی و گلچه تشکیل شد. هیچ اثری از ساقهٔ گل‌دهنده در همگروه غیر گل‌ده مشاهده نشد. این روند گلدهی در همگروه‌های سیر ایرانی با یافته‌های Abbasifar (2014) همخوانی داشت. دامنهٔ گسترده‌ای از تنوع ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) از نظر توانایی گلدهی در سیر مشاهده شده است. نژادگان‌های سیر در توانایی‌شان برای تولید ساقهٔ گل‌دهنده، طول ساقهٔ گل‌دهنده، تشکیل چتر و صفات گل (زمان، شمار، اندازه، رنگ و باروری) بسیار متفاوت هستند. این تنوع چشمگیر در میان همگروه‌های سیر از نظر توانایی گلدهی به دلیل انتقال از فرایند تولیدمثل جنسی به غیرجنسی است. عامل‌های اقلیمی نیز در تنوع مشاهده شده و صفات ریخت‌شناختی مؤثر است به‌طوری‌که شرایط آب و هوایی می‌تواند در تشکیل ساقهٔ گل‌دهندهٔ سیر مؤثر باشند (Ethoh & Simon, 2002; Kamenetsky *et al*., 2004b).

نتایج تغییر بیان ژن *galFY* در هم‌گروه‌ها

بنابر نتایج به‌دست‌آمده بیان نسبی ژن *galFY* در هر سه همگروه هشت هفته پس از کشت (دی‌ماه) به بیشترین میزان خود رسید. بیان نسبی این ژن در هر سه همگروه با افزایش زمان به‌تدریج کاهش و در همگروه گل‌ده و نیمه گل‌ده ۲۴ هفته پس از کشت (در گل‌آذین) دوباره افزایش یافت. بیان آن در همگروه گل‌ده تا پایان گلدهی در گل‌ها با مقادیر کمتر یافت شد (شکل ۲). مقایسهٔ بیان نسبی ژن *galFY* در هم‌گروه‌ها نشان داد، بیشترین میزان بیان نسبی ژن به ترتیب در همگروه گل‌ده، نیمه گل‌ده، و غیر گل‌ده وجود دارد. روند بیان نسبی ژن *galFY* و مقایسهٔ آن در هم‌گروه‌ها در شکل ۲ آورده شده است. منحنی استاندارد، شیب‌خط و کارایی جفت آغازگر برای ژن *galFY* در شکل ۳ آورده شده است.

شکل ۱. مراحل تشکیل ساقهٔ گل‌دهنده و گل در همگروه سیر گل‌ده (مازند زابل)

a) تشکیل ساقهٔ گل‌دهنده، b) تشکیل گل و سیرچه‌های هوایی، c) گل‌ها ۲۸ هفته پس از کشت و d) گل‌ها ۳۲هفته پس از کشت، در مراحل c و d) سیرچه‌های هوایی حذف شده‌اند.

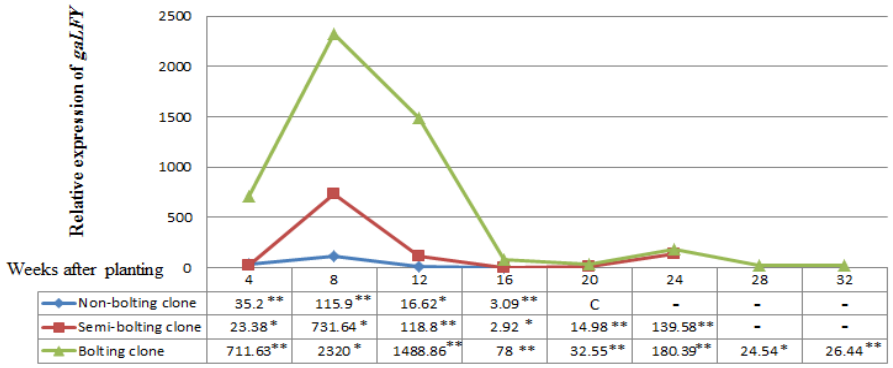
Figure 1. Stages of scape elongation and flower formation in bolting garlic clone (Mazand Zabol), a Scape elongation, b Flower and bulbil formation, c and d Flowers 28 and 32 weeks after planting, respectively. Bulbils were removed in c and d.

Archive of SID

www.SID.ir

همسان *LFY/FLO* به نام *NFL* در گیاه پیازی *Narcissus tazetla* شناسایی شده است (Noy-Porat *et al.*, 2010). در سیر نیز همانند دیگر گیاهان پیازی همسان *LFY* در انتقال به مرحلهٔ زایشی، تشکیل ساقهٔ گل‌دهنده و تکامل گل‌ها دخالت دارد (Rotem *et al.*, 2007). بنابر نتایج Rotem *et al.* (2011) بیشترین میزان بیان ژن *galFY* در نژادگان گل‌ده ۳۰۲۸# ۷ هفته پس از کشت (در بهمن‌ماه) در مرحلهٔ انتقال از مرحلهٔ رویشی به زایشی صورت می‌گیرد. همچنین بیان آن در دیگر مراحل گلدهی مانند تشکیل گل‌آذین و گل‌ها افزایش یافت. یافته‌های به‌دست‌آمده از این پژوهش نیز نشان داد، بیان *galFY* نه‌تنها ۸ هفته پس از کشت به بیشترین میزان خود می‌رسد بلکه در تشکیل گل‌آذین مؤثر بوده و در گل‌ها نیز یافت می‌شود.

همگروه‌های گل‌ده، نیمه گل‌ده و غیر گل‌ده از لحاظ نمو زایشی با یکدیگر متفاوت هستند (Abbasifar, 2014). تفاوت در روند نمو زایشی در این هم‌گروه‌ها می‌تواند به دلیل تفاوت در الگوی بیان ژن‌ها باشد. بنابر نتایج این تحقیق بیان *galFY* در همگروه‌های غیر گل‌ده و نیمه گل‌ده ۸ هفته پس از کشت افزایش یافت اما از همگروه‌های گل‌ده بسیار کمتر بود. بر پایهٔ این نتایج به نظر می‌رسد که در همگروه‌های غیر گل‌ده انتقال از مرحلهٔ رویشی به زایشی صورت می‌گیرد اما در مراحل بعدی تشکیل ساقهٔ گلدهنده (بولتینگ) صورت نگرفته و ساقهٔ گل‌دهنده تشکیل نمی‌شود. در همگروه‌های نیمه گل‌ده بیان ژن کمی بیشتر از همگروه‌های غیر گل‌ده بود. در این همگروه نیز به نظر می‌رسد انتقال از مرحلهٔ رویشی به زایشی صورت گرفته اما در مراحل بعدی بولتینگ به‌صورت ناقص رخ داده و ساقهٔ گل‌دهنده به‌صورت درست تشکیل نمی‌شود. در نهایت با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان *galFY* را به‌عنوان یک ژن القاکنندهٔ زمان گلدهی در همگروه‌های گل‌ده، نیمه گل‌ده و غیر گل‌ده در نظر گرفت. نکتهٔ قابل توجه در این پژوهش افزایش دوبارهٔ بیان نسبی *galFY* در گل‌آذین (۲۴ هفته پس از کشت) و گل‌های همگروه گل‌ده است. افزایش بیان نسبی *galFY* در مریستم و گل‌آذین همگروه گل‌ده، نشان از نقش آن به‌عنوان یک ژن هویت مریستم گل می‌تواند باشد، چراکه روند گلدهی در این همگروه به‌طور کامل صورت گرفت. این یافته با نتایج تحقیقات Rotem *et al.* (2011) نیز همخوانی دارد. ژن *galFY* در گل‌آذین و ساقهٔ گلدهٔ سیر نیمه گل‌ده که به‌صورت ناقص تشکیل شده بود نیز بیان شد. اما با توجه به تشکیل ساقهٔ گلدهنده ناقص همگروه نیمه گل‌ده، تحقیقات تکمیلی مبنی بر تأیید نقش *galFY* به‌عنوان ژن هویت مریستم در این همگروه نیاز است.



شکل ۲. بیان نسبی *galFY* در سیر گلده، نیمه‌گلده و غیرگلده. نمونه‌ها طی چهار تا ۲۰ هفته پس از کشت از مریستم هر سه همگروه، ۲۴ هفته پس از کشت از گل‌آذین سیر گلده و نیمه گلده و ۲۸ تا ۳۲ هفته پس از کشت از گل سیر گلده تهیه شده‌اند. شاهد (C) مریستم سیر غیرگلده ۲۰ هفته پس از کشت و در مرحله ۸ برگی می‌باشد، خط تیره (-) نشان‌دهنده عدم وجود مریستم در زمان نمونه برداری است (* معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱).

Figure 2. Relative expression of *galFY* in the bolting, semi-bolting and non-bolting garlic clones. Samples were collected 4 to 20 weeks after planting are meristem of all clones, 24 weeks after planting are inflorescence of bolting and semi-bolting clones and 28-32 weeks after planting are flowers of bolting clone. (Control: Meristem of non-bolting clone, 16 weeks after planting at the time of eighth leaf (C), (-) shows the absence of meristem at the sampling time, ** and * show that results are significant at the 0.01 and 0.05 levels respectively).

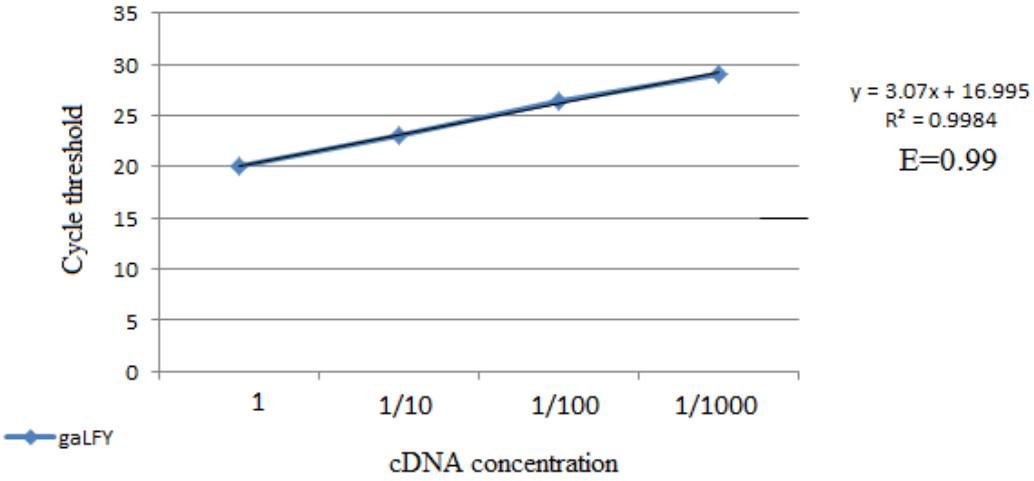
Archive of SID

www.SID.ir

نتایج تغییر بیان ژن *AsFT1*، *AsFT2* و *AsFT4* در همگروه‌ها

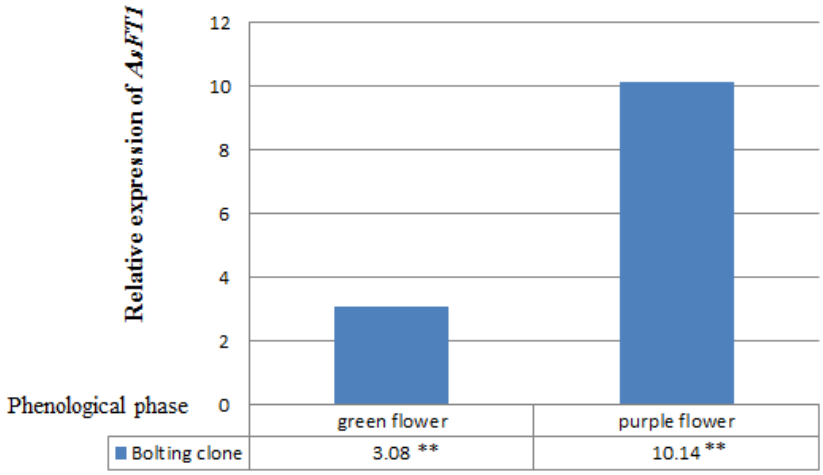
بیان *AsFT1* در همگروه گل‌ده ۳۲ هفته پس از کشت (در گل‌ها) به بیشترین میزان خود رسید (شکل ۴). نشانه‌ای از بیان این ژن در مریستم، برگ و سوخ هم‌گروه‌ها (۴ تا ۳۲ هفته پس از کشت) مشاهده نشد. بیشترین میزان بیان *AsFT4* در سوخ‌های هر سه همگروه ۱۶ هفته پس از کشت صورت گرفت اما در مریستم، برگ، گل‌آذین و گل طی زمان‌های مورد بررسی در هیچ‌یک از هم‌گروه‌ها بیان نشد (شکل ۵).

بیان *AsFT2* در برگ (هر سه همگروه)، مریستم و گل‌آذین (همگروه گل‌ده و نیمه گل‌ده) و گل‌ها (همگروه گل‌ده) افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. بیشترین میزان بیان این ژن در برگ همگروه گل‌ده، ۱۲ هفته پس از کشت مشاهده شد. هیچ اثری از بیان این ژن در و سوخ در زمان‌های مورد بررسی در هیچ‌یک از هم‌گروه‌ها مشاهده نشد (شکل ۶). منحنی استاندارد، شیب‌خط و کارایی جفت آغازگر برای ژن‌های *AsFT1*، *AsFT2* و *AsFT4* در شکل ۷ آورده شده است.



شکل ۳. منحنی استاندارد، شیب‌خط و کارایی جفت آغازگر (E) برای ژن *galFY*

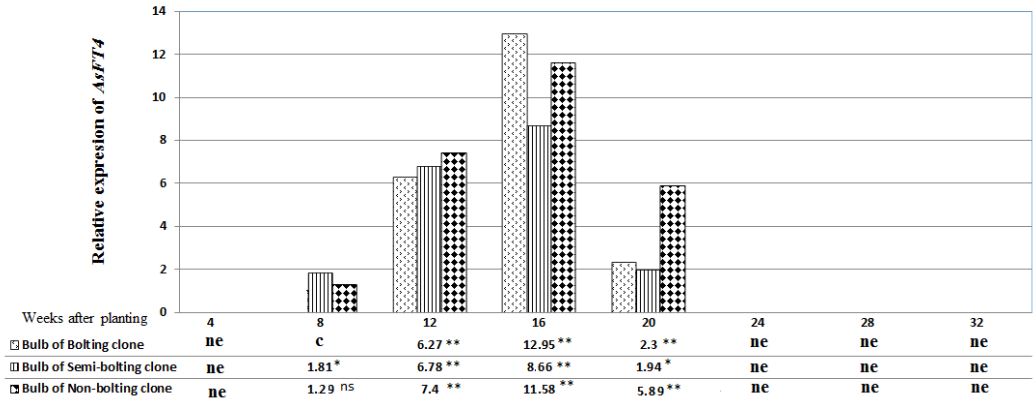
Figure 3. Standard curve, slope and primer efficiency (E) for *galFY*



شکل ۴. بیان نسبی *AsFT1* در گلچه‌های سیر گلده ایرانی، نمونه‌گیری از گلچه سبز ۲۸ هفته پس از کشت و از گلچه ارغوانی ۳۲ هفته پس از کشت صورت گرفت. شاهد گل‌آذین سیر گلده ۲۴ هفته پس از کشت می‌باشد، (** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱).

Figure 4. Relative expression of *AsFT1* in the flowers of bolting garlic clone, Green and purple flowers were collected 28 and 32 weeks after planting respectively. Inflorescence at 24 weeks after planting is as a control, ** shows that results are significant at the 0.01 level).

www.SID.ir



شکل ۵. بیان نسبی *AsFT4* در سوخ همگروه‌های گلده، نیمه گلده و غیر گلده سیر ایرانی، (شاهد: سوخ ۸ هفته پس از کشت در همگروه گلده (c)، ne عدم بیان ژن در اندام مورد بررسی، ns غیرمعنی‌دار، * معنی‌دار در سطح ۰/۰۵و ** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱).

Figure 5. Relative expression of *AsFT4* in the bulbs of bolting, semi-bolting and none-bolting garlic clones (Control: bulb of bolting clone eight weeks after planting (c) , ne: shows that gene didn't express in the organ, ** and *show that results are significant at the 0.01 and 0.05 level respectively and ns shows that results aren't significant

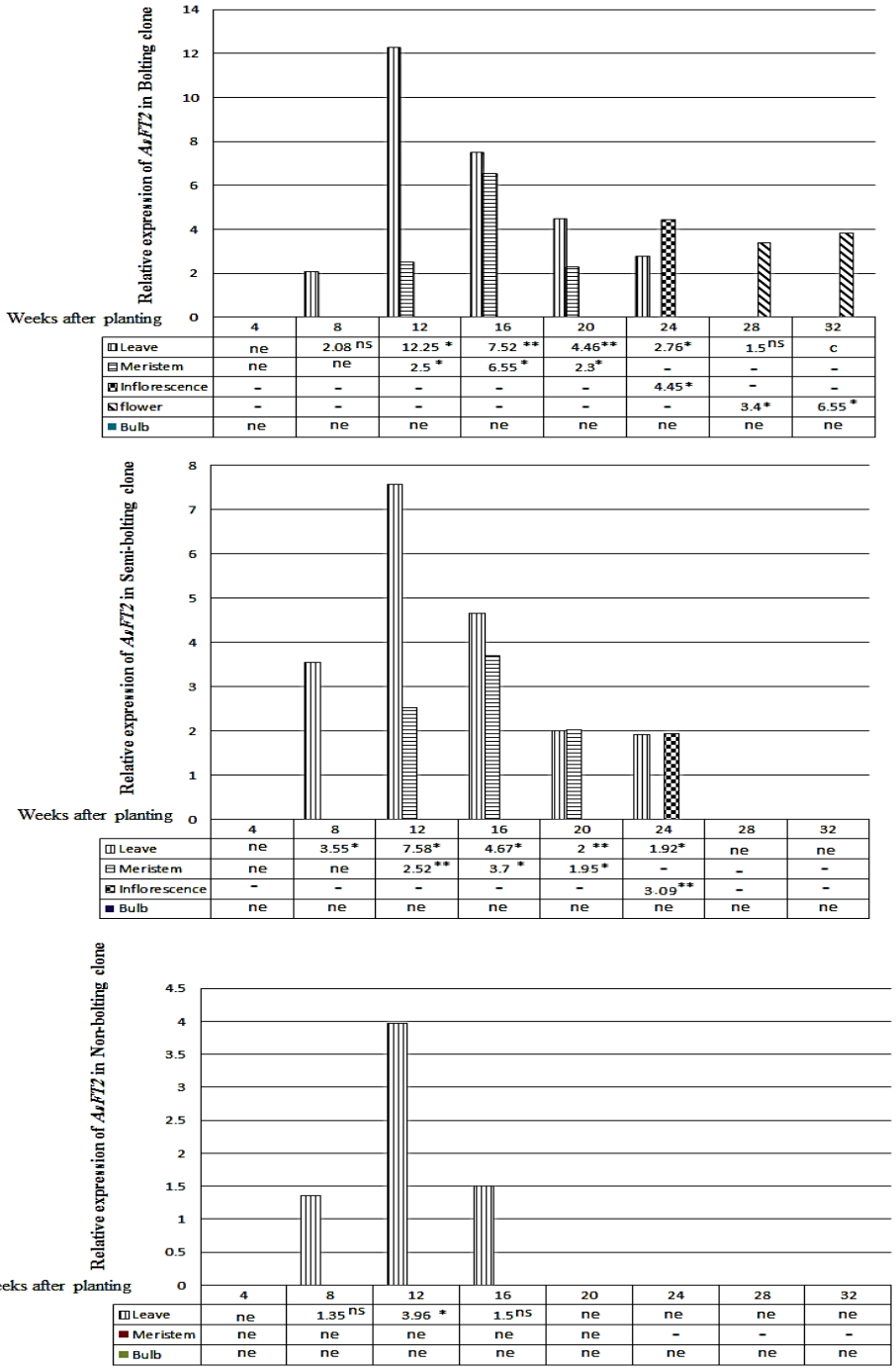
FT به‌عنوان یک ژن کلیدی در بسیاری از مراحل نموی گیاهان مانند گلدهی در پیاز و گیاه علف تال، تشکیل غده در گیاهان تیرهٔ سیب‌زمینی (*Solanaceae*) و تشکیل سوخ در پیاز شناسایی شده است (Andre´s & Coupland, 2012; Abelenda *et al.*, 2013). در ارتباط با گلدهی، *FT* به‌عنوان یک ژن محرک زمان گلدهی نقش کلیدی در انتقال گیاه از مرحلهٔ رویشی به زایشی دارد. بیان این ژن تحت تأثیر سیگنال‌های محیطی مانند طول روز، سرما، هورمون و سازوکار خودگردان صورت گرفته و منجر به گلدهی می‌شود. بااین‌حال زمان و مکان بیان *FT* متناسب با نوع و سازوکار تولید آن در گیاهان مختلف متفاوت است (Glover, 2007). به‌طور مثال در گیاه علف تالبیان *FT* در طول روز بلند با بیان *Constant (CO)* (یک ژن حساس به تغییرپذیری طول روز) در برگ اما در فرایند بهاره‌سازی با کاهش بیان *FLC* در برگ صورت می‌گیرد (Song *et al.*, 2012). درحالی‌که در پیاز بهاره‌سازی‌شده باعث بیان *AcFT2* در جوانهٔ مرکزی و انتقال گیاه به مرحلهٔ زایشی می‌شود (Lee *et al.*, 2013). در این تحقیق، بیان ژن *AsFT2* ۱۲ هفته پس از کشت در برگ‌های بالغ سیر پس از بهاره‌سازی افزایش یافت. این نتیجه با یافته‌های Lee *et al.* (2013) مبنی بر بیان *AcFT2* در جوانهٔ مرکزی پیاز مغایرت داشت اما همسان با نتایج Song *et al.* (2012) در ارتباط با بیان FT در برگ آرابیدوبسیس پس از بهاره‌سازی بود. بیان *FT2* در برگ چغندر ورنالیزه شده نیز افزایش میابد که با یافته‌های این پژوهش همخوانی دارد (Pin *et al.*, 2010). لذا به نظر می‌رسد *AsFT2* به‌عنوان یک ژن محرک زمان گلدهی در سیر پس از بهاره‌سازی در برگ بیان شده و به مریستم انتهایی منتقل می‌شود. در گیاه علف تالنیز محصول *FT* پس از بیان در برگ از طریق پروتئین *FLOWERING LOCUS D (FD)* به مریستم انتهایی منتقل می‌شود (Song *et al.*, 2012). حضور *AcFT2* در مریستم انتهایی همگروه گلده و نیمه گلده نشان‌دهندهٔ انتقال این ژن به مریستم انتهایی است. *AcFT2* در مریستم انتهایی منجر به‌بیان‌دیگر ژن‌های هویت مریستم گل شده و روند گلدهی ادامه می‌یابد. در همگروه گلده و نیمه گلده بقایای ژن در گل‌آذین و در همگروه نیمه گلده در گل‌ها باقی می‌ماند. این نتیجه با یافته‌های Kamenetsky *et al.* (2015) مبنی بر بیان ژن *FT* در گل و گل‌آذین سیر همخوانی دارد.

در این پژوهش، بیان ژن *AsFT4* در سوخ سیر سرما دیده هر سه همگروه (طی ۸ تا ۲۰ هفته پس از کشت) به‌طور قابل توجهی افزایش یافت اما اثری از بیان این ژن در اندام‌های زایشی مانند گل‌آذین و گل‌ها دیده نشد. در پیاز نیز بیان ژن *AcFT4* تنها در

Archive of SID

www.SID.ir

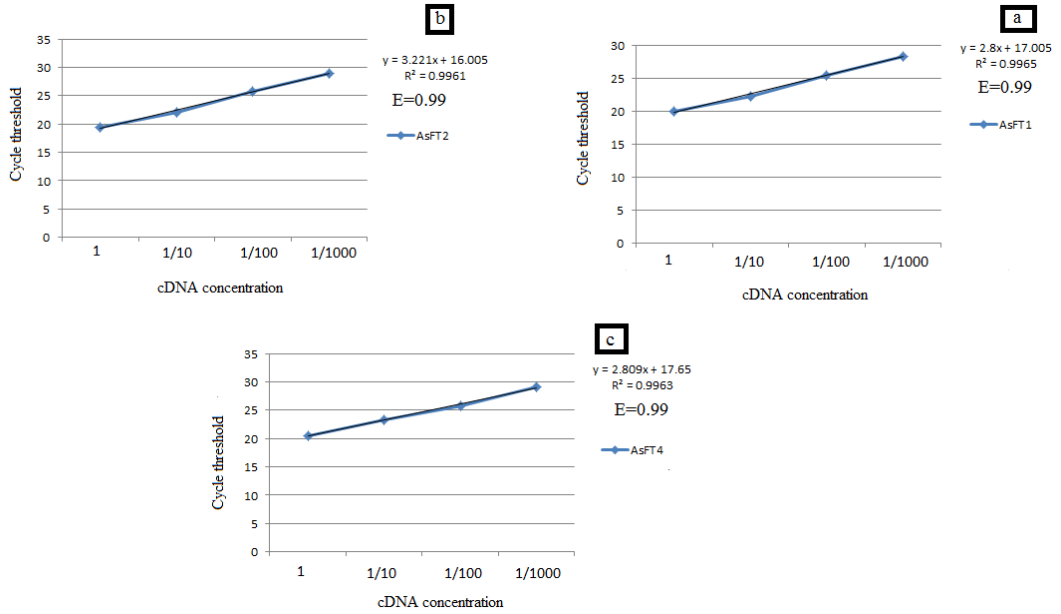
اندام رویشی (سوخ) صورت می‌گیرد (Lee *et al.*, 2013). درمجموع به نظر می‌رسد *AsFT4* نقشی در تکامل زایشی سیر نداشته باشد. *AsFT1* نیز در مقادیر پایین در گل‌آذین و گل‌ها بیان شد، اما اثری از بیان این ژن در دیگر اندام‌های مورد بررسی دیده نشد.



شکل ۶. بیان نسبی *AsFT2* در اندام‌های مختلف سه همگروه گلده، نیمه گلده و غیر گلده سیر ایرانی، (شاهد: برگ همگروه گلده ۲۸ هفته پس از کشت(c)، ne عدم بیان ژن در اندام مورد بررسی، خط تیره (-) نشان‌دهنده عدم تشکیل اندام مورد نظر در زمان نمونه برداری، nsغیرمعنی‌دار، * معنی‌دار در سطح ۰/۰۵و ** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱).

Figure 6. Relative expression of *AsFT2* in the different organs of bolting, semi-bolting and none-bolting garlic clones (Control: leaf of bolting clone 28 weeks after planting (c), ne: shows that gene didn't express in the organ, - shows the absence of organ at the time of sampling, ** and * show that results are significant at the 0.01 and 0.05 level respectively and ns shows that results aren't significant).

www.SID.ir



شکل ۷. منحنی استاندارد، شیب‌خط و کارایی جفت آغازگر (E) برای ژن‌های *AsFT1* (a)، *AsFT2* (b) و *AsFT4* (c)

Figure 7. Standard curve, slope and primer efficiency (E) for *AsFT1* (a), *AsFT2* (b) and *AsFT4* (c).

در مقایسه سه همگروه روند همسانی از بیان ژن‌ها مشاهده شد با این تفاوت که بیان *AsFT2* در همگروه گل‌ده بیشترین میزان خود را داشت. در همگروه نیمه گل‌ده در مقایسه با همگروه گل‌ده بیان ژن کاهش یافت و در همگروه غیر گل‌ده به کمترین میزان خود رسید. بنابراین همسان به آنچه در ارتباط با *gaLFY* گفته شد، انتقال از مرحلهٔ رویشی به زایشی در همگروه نیمه گل‌ده رخ می‌دهد اما با توجه به سطوح پایین بیان *AsFT2* و یا بدون بیان دیگر ژن‌های مرتبط با گلدهی، تشکیل ساقهٔ گلدهنده به‌صورت ناقص انجام می‌شود. در ارتباط با همگروه غیر گل‌ده اثری از *AsFT2* در مریستم انتهایی ۲۰ هفته پس از کشت مشاهده نشد. لذا، به نظر می‌رسد با وجود بیان *AsFT2* در برگ، انتقال محصول ژن به مریستم انتهایی انجام نشده است. بررسی بیان *FD* به‌عنوان منتقل‌کنندهٔ *FT* به مریستم انتهایی در درک بهتر نقش این ژن در همگروه غیر گل‌ده مؤثر است.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش برای نخستین بار الگوی زمانی و مکانی بیان *AsFT2* در سیر گل‌ده، نیمه‌گل‌ده و غیرگل‌ده مشخص شد. نتایج نشان داد، *AsFT2* در آغاز، در برگ سیر گل‌ده و نیمه گل‌ده و پس از آن در مریستم انتهایی این دو همگروه بیان می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد *AsFT2* به‌عنوان یک محرک زمان گلدهی در سیر گل‌ده و نیمه گل‌ده است اما به دلیل بیان پایین آن در سیر نیمه گل‌ده، تشکیل ساقهٔ گل‌دهنده به‌صورت ناقص صورت می‌گیرد. در ارتباط با میزان بیان *gaLFY* در همگروه‌های مختلف سیر نیز، برای نخستین بار نتایج قابل توجهی به دست آمد. نتایج نشان داد *gaLFY* در آغاز، در مریستم سیر گل‌ده و نیمه گل‌ده بیان می‌شود اما به دلیل سطوح پایین بیان آن در سیر نیمه گل‌ده تشکیل ساقهٔ گل‌دهنده به‌صورت ناقص صورت گرفته و باعث ایجاد یک ساقهٔ گل‌دهندهٔ بسیار کوتاه در میان‌برگ‌ها می‌شود. همچنین به نظر می‌رسد، بیان *gaLFY* در مریستم و گل‌آذین سیر گل‌ده می‌تواند در تعیین هویت مریستم گل نیز مؤثر باشد. در سیر غیر گل‌ده، *AsFT2* در مقادیر بسیار کم در برگ بیان شد اما اثری از بیان آن در مریستم انتهایی دیده نشد. لذا به نظر می‌رسد این ژن تأثیری در القای گلدهی ندارد؛ اما به دلیل بیان *gaLFY* در مریستم انتهایی، به‌احتمال القای گلدهی و انتقال به مرحلهٔ زایشی در این همگروه صورت گرفته هرچند که سطوح پایین بیان آن بازدارندهٔ تشکیل ساقهٔ گل‌دهنده می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES

1. Abbasifar, A. (2014). *Study of the sexual organs development and possibility of seed production In Iranian garlic clones*. Ph.D. thesis. Faculty of Agriculture Bu-Ali Sina University, Iran. (in Farsi)
2. Abelenda, J. A., Navarro, C. & Prat, S. (2013). Flowering and tuberization: a tale of two nightshades. *Trends in Plant Sci*ence, 19, 115-122.
3. Andre´s, F. & Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*, 13, 627-639.
4. Blazquez, M., Ferrandiz, C., Madueno, F. & Parcy, F. (2006). How floral meristems are built. *Plant Molecular Biology*, 60, 855-870.
5. Brewster, J. L. (2008). *Onions and Other Vegetable Alliums*. CAB International Wallingford.
6. Etoh, T. & Simon, P. W. (2002). Diversity, fertility and seed production of garlic. In: H. D. Rabinowitch & L. Currah (eds), *Allium crop sciences: recent advances*. (pp. 101–117.). Wallingford, UK: CAB International.
7. Glover, B. (2007). *Understanding of flowers and flowering: an integrated approach*. Oxford University.
8. Jack, T. (2004). Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell*, 16, 1-17.
9. Kamenetsky, R., London Shafir, I., Zemah, H., Barzilay, A. & Rabinowitch, H. D. (2004). Environmental control of garlic growth and florogenesis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129, 144-151.
10. Kamenetsky, R., Faigenboim, A., Mayer, E. S., Michael, T. B., Gershberg, C., Kimhi, S. & Sherman, A. (2015). Integrated transcriptome catalogue and organ-specific profiling of gene expression in fertile garlic (*Allium sativum* L.). *Biomed Centeral Genomics*, 16(1), 12.
11. Lee, R., Baldwin, S., Kenel, F., McCallum, J. & Macknight, R. (2013). *FLOWERING LOCUS T* genes control onion bulb formation and flowering. *Nature Communications*, 4, 2884.
12. Livak K.J & Schmittgen T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2− ΔΔCT Methods. *Methods*, 25,402-408.
13. Noy-Porat, T., Kamenetsky, R., Eshel, A. & Flaishman, M. A. (2010). Temporal and spatial expression patterns of the *LEAFY* homologue *NLF* during florogenesis in *Narcissus tazetta*. *Plant Science*, 178, 105-113.
14. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, 36-36.
15. Pin, P. A., Benlloch, R., Bonnet, D., Wremerth-Weich, E., Kraft, T., Gielen, J. J. & Nilsson, O. (2010). An antagonistic pair of *FT* homologs mediates the control of flowering time in sugar beet. *Science*, 330, 1397-1400.
16. Rotem, N., Shemesh, E., Peretz, Y., Akad, F., Edelbaum, O., Rabinowitch, H. D. & Kamenetsky, R. (2007). Reproductive development and phenotypic differences in garlic are associated with expression and splicing of *LEAFY* homologue *gaLFY*. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1133-1141.
17. Rotem, N., David-Schwartz, R., Peretz, Y., Rabinowitch, H. D., Flaishman, M. & Kamenetsky, R. (2011). Flower development in garlic: the ups and downs of *gaLFY* expression. *Planta*, 233, 1063-1072.
18. Song, J., Angel, A., Howard, M. & Dean, C. (2012). Vernalization a cold-induced epigenetic switch. *Journal of Cell Science*, 125, 3723-3731.
19. Shalom, S. R., Gillett, D., Zemach, H., Kimhi, S., Forer, I., Zutahy, Y. & Eshel, D. (2015). Storage temperature controls the timing of garlic bulb formation via shoot apical meristem termination. *Planta*, 242(4), 951-962.
20. Takagi, H. (1990). Biochemistry, food science, and minor crops. In: J.L Brewster & H. D. Rabinowitch (eds), *Onions and allied crops*. (pp. 109–146). CRC press, BocaRaton, Florida.
21. Yang, C., Ye, Y., Song, C., Chen, D., Jiang, B. & Wang, Y. (2016). Cloning and functional identification of the *AcLFY* gene in *Allium cepa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(4), 1100-1105.

Archive of SID

www.SID.ir