بررسی الگوی بیان ژن *galFY* در مراحل مختلف نمو زایشی در برخی از همگروه‌های گلده، نیمه گلده و غیر گلده سیر ایرانی

فهیمه قائمی‌زاده[۱]،فرشاد دشتی[۱*]، علیرضا شافعی نیا [۲]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

[۲] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

[*] نویسنده‌ی مسئول: *Dashti1350@yahoo.com*

چکیده

سیر (*Allium sativum. L*) گیاهی عقیم بوده و به‌صورت غیرجنسی تکثیر می‌شود. درک صحیح از ژن های کنترل کننده گلدهی در انواع ژنوتیپ‌های سیر، مسیر را برای بهبود پتانسیل ژنتیکی باروری و برنامه‌های اصلاحی کلاسیک و مولکولی سیر فراهم می‌کند. این تحقیق با هدف بررسی الگوی بیان ژن *galFY* در همگروهای گلده، نیمه گلده و غیر گلده سیر ایرانی انجام شد. بدین منظور استخراج RNA و به دنبال آن ساخت cDNA از مریستم انتهایی (شامل مریستم رویشی، زایشی و گل‌آذین به‌صورت ماهیانه از آذر ۱۳۹۴ تا اردیبهشت ۱۳۹۵) و غنچه‌های گل در ۲مرحله (سبز تیره و ارغوانی) در ماه‌های خرداد و تیر در ۲ تکرار بیولوژیکی صورت گرفت. بررسی الگوی بیان ژن با استفاده از تکنیک Real-Time PCR در دو تکرار تکنیکی بررسی شد. بر اساس نتایج بدست آمده بیشترین میزان بیان ژن *galFY* در همگروه گلده و ۸ هفته پس از کشت (دی‌ماه) در مرحله انتقال از فاز رویشی به زایشی صورت گرفت. میزان بیان این ژن در همگروه‌های غیر گلده و نیمه گلده نیز ۸ هفته پس از کشت به بیشترین میزان خود رسید اما نسبت به همگروه گلده بسیار کمتر بود. بیان ژن *galFY* در هر سه همگروه طی مراحل بعدی به‌تدریج کاهش یافت. بر اساس این نتایج به نظر می‌رسد که در انواع غیر گلده و نیمه گلده انتقال از فاز رویشی به زایشی صورت می‌گیرد، اما در مراحل بعدی بولتینگ صورت نگرفته و یا به‌صورت ناقص انجام می‌شود. در نهایت ساقه گلدهنده در انواع غیر گلده تشکیل نشده و در انواع نیمه گلده به‌صورت ناقص تشکیل می‌شود.

***واژگان کلیدی:* سیر ایرانی، گلدهی، اصلاح، *LEAFY*، Real-Time PCR**

مقدمه

سیر (*Allium sativum. L*) پس از پیاز دومین گونه مهم از جنس آلیوم است (Brewster, 2008). تمام ارقام تجاری سیر کاملاً عقیم بوده و به‌صورت غیرجنسی تکثیر می‌شوند. از محدودیت‌های تکثیر غیرجنسی، محدودیت در برنامه‌های اصلاحی و مطالعات ژنتیکی می‌باشد. شناسایی انواع ژنوتیپ‌های سیر، درک صحیح از ژن‌های کنترل کننده گلدهی و رابطه متقابل آن‌ها با محیط می‌تواند دانش ما را در زمینه فرایند گلدهی و بازگرداندن قابلیت گلدهی به سیر افزایش دهد (Kamenetsky et al, 2004b).ژنوتیپ‌های سیر به سه گروه غیرگلده، نیمه‌گلده و گلده طبقه‌بندی می‌شوند. در انواع غیرگلده ساقه گلدهنده تشکیل نشده و یا در مراحل اولیه سقط می‌شود. در انواع نیمه گلده یا به عبارتی ژنوتیپ‌هایی با گلدهی ناقص، توقف نمو ساقه گلدهنده اغلب باعث ایجاد ساقه گلدهنده بسیارکوتاه در میان برگ‌ها می‌گردد. در انواع گل دهنده ساقه گلدهنده با سایز مناسب، حاوی گل و سیرچه‌های هوایی تشکیل می‌شود (Kamenetsky et al, 2004b).

انتقال از فاز رویشی به زایشی، تشکیل گل‌آذین، گل و اندام‌های گل در گیاهان شامل یکسری مراحل پیوسته می‌باشد. در مجموع چندین گروه ژنی مسیر گلدهی را در گیاهان کنترل می‌کنند. ژن‌های محرک زمان گلدهی، ژن‌های هویت مریستم گل و ژن‌های هویت اندام گل در آرابیدوبسیس و گیاهان مدل شناسایی شده‌اند. در مجموع این گروه‌های ژنی به‌صورت پیوسته و در همکاری متقابل، بیان یکدیگر را تنظیم کرده و گلدهی را منجر می‌شوند (Glover, 2007). اثر عوامل محیطی و درونی بر

گلدهی شامل چندین مسیر سیگنالی می‌باشـــد که با تحریک ژن‌های محرک زمان گلدهـی نظیر *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) و *SUPPRESSION OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*(*SOC1*) بیان ژن‌های هویت مریستم گل نظیر *LEAFY*، *APETALA1*(*AP1*) را افزایش می‌دهند. بیان این ژن‌ها در مریستم انتهایی ضروری و منجر به انتقال از فاز رویشی به زایشی، حفظ و پایداری مریستم گل و گل‌آذین می‌شود. این ژن‌ها در مرحله انتقال به فاز گلدهی و یا کمی قبل از آن در مریســـــتم انتهایی بیان شده و ژن‌های هویـــت اندام گل (ژن‌های ABC نظیر*APETALA1-3* ، *AP2*، *AGAMUS* و *PISTALATA*) را در نواحی مجزایی از مریستم گل‌آذین فعال می‌کنند. به دنبال آن تمایزیابی پریموردیای گل در نواحی کناری مریستم رخ داده و منجر به تشکیل اندام‌های گل می‌گردد (Blazquez et al, 2006). ژن *LFY* و همولوگ آن *FLORICAULA (FLO)*برای اولین بار به ترتیب در گیاه آرابیدوبسیس و آنتوریوم شناسایی شدند. ژن *LFY* دارای نقش دوگانه است. این ژن هم به‌عنوان ژن هویت مریستم و هم به‌عنوان ژن محرک زمان گلدهی عمل می‌کند. *LFY* در آرابیدوبسیس یک فاکتور نسخه‌برداری متعلق به MADS-box را کد می‌کند که نقش کلیدی در تکامل گیاه دارد. ژن *LFY* به‌عنوان یک پل ارتباطی بین ژن‌های محرک زمان گلدهی و سایر ژن‌های هویت مریستم گل است. بدین مفهوم که یک ارتباط مستقیم بین القا گلدهی، آغازش تک گل‌ها و فعال‌سازی ژن‌های هویت اندام گل را ایجاد می‌کند (Jack, 2004). همولوگ ژن *LFY* به نام *gaLFY* در سیر نیز شناسایی شده است (Rotem et al, 2007). الگوی زمانی بیان این ژن در یک ژنوتیپ گلده نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Rotem et al, 2011). بااین‌حال تاکنون هیچ پژوهشی در ارتباط با روند زمانی و مکانی بیان این ژن در همگروهـای سیر گلده ایرانی و مقایسه آن‌ها با همگروهای سیر نیمه گلده و غیره گلده صورت نگرفته است. این تحقیق با هدف بررسی الگوی بیان ژن *gaLFY* در همگروهای سیر گلده، نیمه گلده و غیر گلده ایرانی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و نمونه‌گیری

برای انجام این پژوهش از ۳ همگروه غیر گلده (همگروه همدان)، گلده (همگروه مازند زابل) و نیمه گلده (همگروه لنگرود)، استفاده شد. سیرچه‌ها در اواسط آبان ماه سال ۱۳۹۴ در مزرعه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا کشت شدند. نمونه‌گیری از مریستم انتهایی (شامل مریستم رویشی، زایشی و گل‌آذین به‌صورت ماهیانه از آذر ۱۳۹۴ تا اردیبهشت ۱۳۹۵) و غنچه‌های گل در ۲مرحله (سبز تیره و ارغوانی) در ماه‌های خرداد و تیر در ۲ تکرار بیولوژیکی صورت گرفت.

استخراج RNA و ساخت cDNA

RNA کل از بافت گیاهی با استفاده از کیت تجاری innuPREP (آنالیتیک جینا، آلمان) و محلول تجاری RNXplus (سینا ژن ایران) استخراج شد. غلظت RNA پس از هر استخراج، با استفاده از دستگاه نانودراپ و در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین گردید. مقدار کل RNA برحسب نانوگرم در میکرولیتر محاسبه گردید. جهـت ارزیابی کیفی RNA اســـتخراج شده از روش الکتروفورزRNA روی ژل آگـــاروز۱درصد استفاده شد. مشاهده باندهای RNA ریبوزومی(۱۸S و ۲۸S) و عدم آلودگی به DNA کیفیت RNA استخراج شده را تأیید کرد. پس از اطمینان از کیفیت RNA، ساخت cDNA با استفاده از کیت تجاری 2step-RT-PCR (سیناژن، ایران) و با استفاده از پرایمر oligo d(T) انجام و غلظت سنجی cDNA (جهت یکسان‌سازی غلظت نمونه‌ها) با استفاده از دستگاه نانودراپ صورت گرفت.

بررسی بیان نسبی ژن *gaLFY* با روش Real-Time PCR

واکنشReal-Time PCR با استفاده از کیت SYBR green (یکتا تجهیز آزما، ایران) و با دستگاه تشخیص Light-Cycler 98 Real-Time PCR (Roch، آلمان) انجام شد. در این تحقیق از جفت آغازگر *gaLFY* (Rotem et al, 2011) و از ژن رمزکننده *Actin* (Shalom et al, 2015) به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. منحنی استاندارد برای ژن مورد نظر در غلظت‌های مختلف cDNA رسم گردید. مخلوط واکنش شامل مستر میکس (۱ x) SYBR green (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۱۰۰نانوگرم cDNA، ۵ میکرومولاراز هر یک از پرایمرهای مستقیم و معکوس در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفتـه شد.

برنامه دمایی شامل ۱۰ دقیقه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن۴۰چرخه شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۴درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. تمامی واکنش‌ها در ۲ تکرار بیولوژیکی و ۲ تکرار تکنیکی انجام و برای هر ژن در هر آزمایش یک کنترل منفی (بدون cDNA) در نظر گرفته شد. در نهایت میزان بیان نسبی ژن‌ها با روش ΔΔCT شرح داده شده توسط لیواک و همکاران (۲۰۰۱) و نرم‌افزار REST® تهیه شده توسط فافل و همکاران (۲۰۰۲) محاسبه گردید.

نتایج

تغییرات مورفولوژیکی

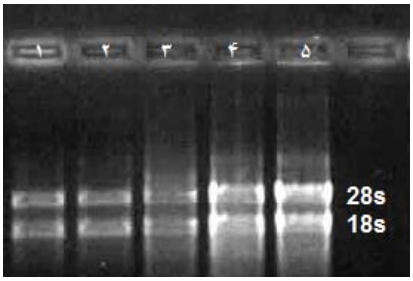
در سه همگروه همدان (غیرگلده)، مازند زابل (گلده) و لنگرود (نیمه‌گلده) الگوی متفاوتی از گلدهی مشاهده شد. در همگروه مازند زابل ساقه گلدهنده در اردیبهشت‌ماه ظاهر شد. گلچه و سیرچه‌های هوائی نیز در خرداد تا اواسط تیرماه بر روی گل‌آذین تشکیل شدند (شکل ۳-۱). در همگروه لنگرود یک ساقه گلدهنده بسیار کوتاه و ناقص فاقد پیازچه هوایی و گلچه تشکیل شد. هیچ اثری از ساقه گلدهنده در همگروه همدان مشاهده نشد. این روند گلدهی در همگروه‌های سیر ایرانی با یافته های عباسی فر (۲۰۱۵) مطابقت داشت.

شکل ۳-۱: مراحل تشکیل گل‌آذین و گل در همگروه سیر گلده (مازند زابل)

الف- تشکیل ساقه گلدهنده، ب- تشکیل گلچه و سیرچه‌های هوایی، ج- گلچه‌ها در مرحله سبز، د- گلچه در مرحله زرد مایل به ارغوانی

استخراج و کیفیت و کمیت سنجی RNA

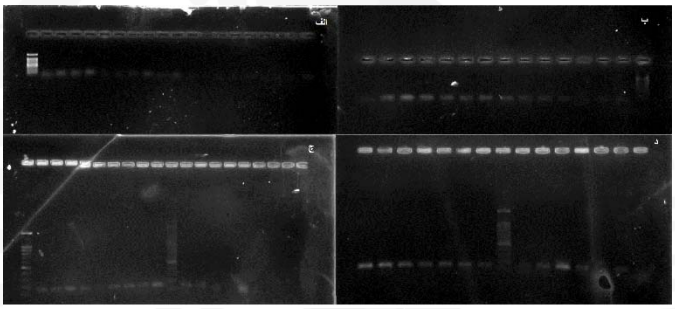
در این آزمایش استخراج RNA، با استفاده از کیت تجاری innuPREP (آنالیتیک جینا، آلمان) و محلول تجاری RNXplus (سینا ژن ایران) انجام گرفت. تأیید استخراج RNA و کیفیت‌سنجی RNAهای استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. وضوح باندهای ۲۸Sو ۱۸S RNA ریبوزومی در شکل ۳-۲ نشان‌دهنده استخراج موفق RNA کل می‌باشد. کمیت RNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری گردید. نتایج کمیت سنجی RNA نشان داد که حداکثر مقدار جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام گرفته که نشان دهنده کیفیت مطلوب RNA استخراج شده است. بر اساس نتایج بدست آمده از کیفت و کمیت سنجی بهترین RNA استخراج شده در ارتباط با گل‌آذین و گلچه‌ها با محلول تجاری RNXplus و در ارتباط با مریستم با استفاده از کیت تجاری innuPREP حاصل شد.



شکل۳-۲-نتایج استخراج و کیفیت‌سنجی RNA بر روی ژل آگاروز یک درصد. چاهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴و ۵ به ترتیب نشان دهنده RNA استخراج شده از مریستم در آذرماه، مریستم در بهمن‌ماه، مریستم در اسفندماه، گل‌آذین و گلچه‌ها می‌باشد.

ساخت و سنجش کیفیت و کمیت cDNA

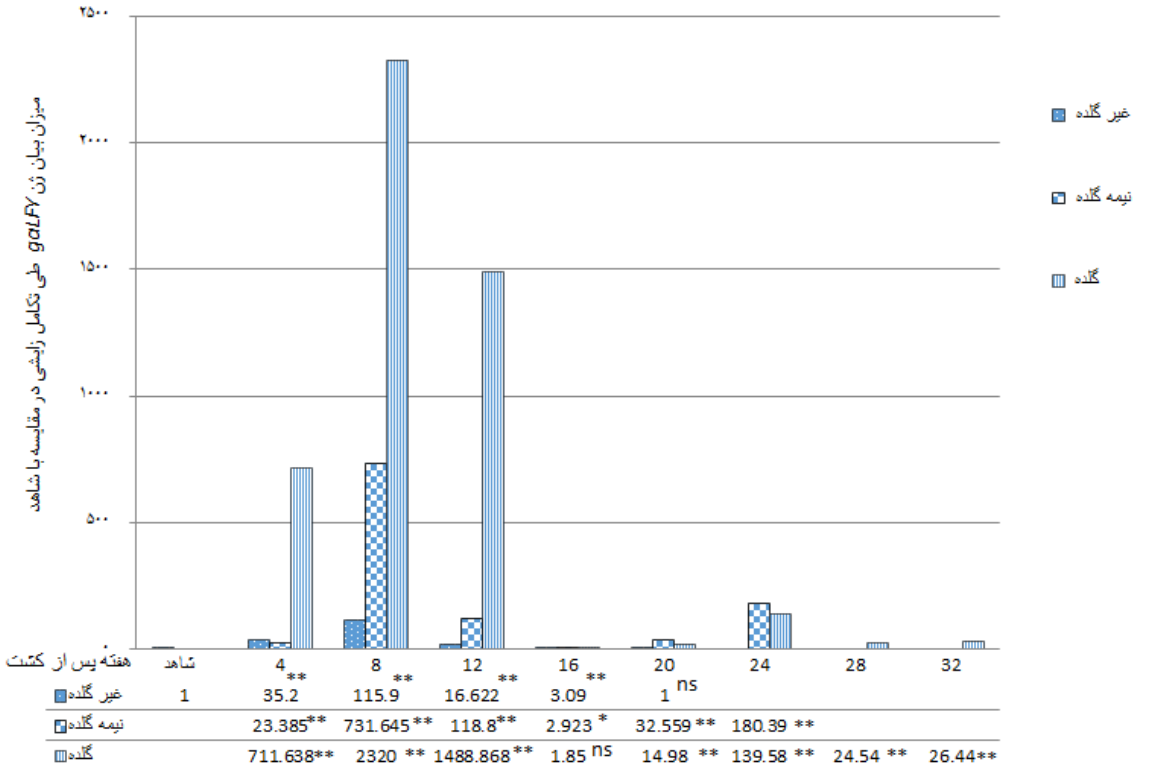
به‌منظور اطمینان از ساخت cDNA، محصول بدست آمده از واکنش ساخت cDNA به میزان ۱:۲۰ رقیق گردید و غلظت cDNA با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بیشترین جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر دیده می‌شود که نشان دهنده کیفیت مطلوب cDNA ساخته شده می‌باشد. در مرحله بعد به‌منظور حصول اطمینان از تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد مطالعه، واکنش PCR با آغازگر *galFY* و *Actin* انجام شد (شکل ۳-۳).



شکل۳-۳-نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *galFY* (شکل الف و ب) و ژن *Actin* (شکل ج و د). واکنش‌های مربوط به چاهک‌هایی در شکل ج و د به دلیل عدم تکثیر مناسب ژن *Actin* در آزمایش Real-Time PCR استفاده نشدند.

نتایج تغییر بیان ژن *galFY* در همگروه‌ها

در این پژوهش الگوی زمانی بیان ژن*galFY* از آذرماه (۴ هفته پس از کشت) تا تیرماه (۳۲ هفته پس از کشت) در سه همگروه گلده، غیرگلده و نیمه‌گلده مورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان نسبی ژن *galFY* با تکنیک Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش، مرحله ۸ برگی از همگروه غیر گلده به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از استخراج نتایج خام از دستگاه Light-Cycler 98 Real-Time PCR، تکرارهایی که دارای تکثیر غیراختصاصی (بیش از یک پیک در منحنی ذوب) بودند از داده‌های آزمایش حذف شدند. سپس میزان بیان نسبی داده‌های خام با استفاده از نرم‌افزار REST® محاسبه گردید. بر اساس نتایج بدست آمده بیان نسبی ژن *galFY* در هر سه همگروه ۸ هفته پس از کشت (دی‌ماه) به بیشترین میزان خود رسید. بیان نسبی این ژن با افزایش زمان به‌تدریج کاهش یافت. این روند در همگروه‌های غیر گلده و نیمه گلده نیز مشاهده شد (شکل ۳-۴) . مقایسه میزان بیان نسبی ژن *galFY* در همگروه‌ها نشان داد که بیشترین میزان بیان نسبی ژن به ترتیب در همگروه گلده، نیمه گلده، و غیر گلده وجود دارد. نتایج نشان داد بیان نسبی ژن *galFY* در همگروه گلده و نیمه گلده به ترتیب ۲۳۲۰ و ۷۳۱/۶ برابر نسبت به همگروه غیر گلده طی ۸ هفته پس از کشت افزایش یافته است. روند بیان نسبی ژن *galFY* و مقایسه آن در همگروه‌ها در شکل ۳-۴ آورده شده است.



شکل۳-۴- مقایسه نسبی بیان ژن *galFY* در همگروه‌های گلده، نیمه گلده و غیر گلده سیر ایرانی (شاهد: مرحله ۸ برگی در همگروه غیر گلده)

بحث

ژن *galFY* یک ژن کنترل کننده زمان گلدهی و یک ژن هویت مریستم گل است. همولوگ ژن *LFY/FLO* به نام *NFL* در گیاه پیازی *Narcissus tazetla* شناسایی شده است(Noy-Porat et al. 2010). در سیر نیز همانند سایر گیاهان پیازی همولوگ ژن *LFY* در تشکیل ساقه گلدهنده و تکامل گل‌ها دخالت دارد (Rotem et al, 2007 Noy-Porat et al. 2010,). بر اساس نتایج روتم و همکاران (۲۰۱۱) بیشترین میزان بیان ژن *galFY* در ژنوتیپ گلده ۳۰۲۸#، ۷ هفته پس از کشت (در بهمن‌ماه) در مرحله انتقال از فاز رویشی به زایشی صورت می‌گیرد. یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن *galFY* ۸ هفته پس از کشت (دی‌ماه) صورت می‌گیرد. همگروه‌های گلده، نیمه گلده و غیر گلده از لحاظ نمو زایشی با یکدیگر متفاوت هستند (Abbasifar, 2015). تفاوت در روند نمو زایشی در این همگروه‌ها می‌تواند به دلیل تفاوت در الگوی بیان ژن‌ها باشد. بر اساس نتایج این تحقیق میزان بیان ژن *galFY* در همگروه‌های غیر گلده و نیمه گلده ۸ هفته پس از کشت افزایش یافت اما از انواع گلده بسیار کمتر بود. بر اساس این نتایج به نظر می‌رسد که در انواع غیر گلده انتقال از فاز رویشی به زایشی صورت می‌گیرد اما در مراحل بعدی بولتینگ صورت نگرفته و ساقه گلدهنده تشکیل نمی شود. در انواع نیمه گلده بیان ژن کمی بیشتر از انواع غیر گلده بود. در این همگروه نیز به نظر می‌رسد انتقال از فاز رویشی به زایشی صورت گرفته اما در مراحل بعدی بولتینگ به‌صورت ناقص رخ داده و ساقه گلدهنده به‌صورت صحیح تشکیل نمی‌شود. در مجموع چندین گروه ژنی به‌صورت پیوسته و در همکاری متقابل، بیان یکدیگر را تنظیم کرده و گلدهی را منجر می‌شوند (Glover, 2007). در نهایت باید مطالعات بسیاری جهت درک صحیح از این ژن‌ها و بازگرداندن قابلیت گلدهی به سیر صورت گیرد.

منابع

Abbasifar, A. 2014. Study of the sexual organs development and possibility of seed production In Iranian garlic clones. PhD Thesis, agricultural faculty. Bu-Ali sina university, p 175. (in Persian).

Blazquez, M., Ferrandiz, C., Madueno, F. and Parcy, F. 2006. "How floral meristems are built". Plant Molecular Biology; 60:855–870.

Brewster, J. L. 2008. "Onions and Other Vegetable Alliums". CAB International Wallingford, UK, P.432.

Glover, B. 2007. Understanding of flowers and flowering: an integrated approach. Oxford university. p.304.

Jack, T. **2004**. "Molecular and genetic mechanisms of floral control". Plant Cell; 16: 1–17.

Kamenetsky, R., London Shafir, I., Zemah, H., Barzilay, A. and Rabinowitch, H.D. 2004 b."Environmental control of garlic growth and florogenesis". Journal of the American Society for Horticultural Science; 129:144–151.

Noy-Porat T, Kamenetsky R, Eshel A, Flaishman MA 2010. Temporal and spatial expression patterns of the LEAFY homologue NLF during florogenesis in Narcissus tazetta. Plant Sci;. 178:105–113

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:e36-e36.

Rotem, N., Shemesh, E., Peretz,Y., Akad, F., Edelbaum, O., Rabinowitch, H. D. and 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.

Rotem, N., David-Schwartz, R., Peretz ,Y., Rabinowitch, H. D., Flaishman, M. and Kamenetsky, R. 2011. "Flower development in garlic: the ups and downs of gaLFY expression.Planta" ;. 233: 1063–1072.

Shalom, S. R., Gillett, D., Zemach, H., Kimhi, S., Forer, I., Zutahy, Y., and Eshel, D. 2015. Storage temperature controls the timing of garlic bulb formation via shoot apical meristem termination. Planta; 242(4), 951-962.

Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2− ΔΔCT Methods; 25:402-408.

Expression Analysis of *gaLFY* During Reproductive Development in Bolting, Semi-Bolting and Non- Bolting Iranian Garlic Clones

Fahimeh Ghaemizadeh [1], Farshad Dashti [1]*, Ali Reza Shafeinia [2]
[1]Department of Horticulture, Bu-Ali Sina University, Hamedan
[2]Department of Agronomy and Plant Breeding, Ramin Agriculture and Natureal Resource University. Khuzestan
*Corresponding Author: Dashti1350@yahoo.com

Abstract

Garlic cultivars (*Allium sativum* L) are sterile and thus propagated only vegetatively. A thorough understanding of the genetic coding of florogenesis will improve our knowledge of flowering processes, and facilitate classic and molecular breeding and fertility restoration in garlic. In the present work, we studied the temporal expression patterns of *gaLFY* during several sequential stages of garlic flower development in bolting, semi-bolting and non-bolting Iranian garlic clones. RNA Was extracted from shoot apices including reproductive meristems and inflorescences (Additionally, flower buds and flowers at the same developmental stages) .After cDNAs construction, the expression of *gaLFY* was assayed using Real-Time PCR in two technical replications. Our results indicate a strong expression of the *gaLFY* in 8 weeks after culture which coincided with meristem transition in bolting, semi and non- bolting clones. The relative expression of the *gaLFY* was low in semi and non-bolting clones, when compared with bolting clone. In all clones *gaLFY* expression declined after 8 weeks of culture. In general, although a low expression of the *gaLFY* in semi and non-bolting clones occurs during the transition of the apical meristem from the vegetative to the reproductive stage, but in the non-bolting clone, the inflorescence is either not visible, or its initials abort at the early stages of differentiation and in semi-bolting clone the inflorescence is developed abnormally.

***Keywords*: Iranian garlic, Flowering, *LEAFY*, Breeding, Real-Time PCR**