

Investigating relative expression of *API* homologous in different organs of black mustard (*Brassica nigra* L.): The effect of hydrogen sulfide (H₂S) on flower stimulation and gene expression

Farkhondeh Rezanejad 

*Corresponding author. Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: frezanejad@uk.ac.ir

Farzad Ganjalikhani Hakemi 

Ph.D. Student, Plant Cell and Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: hakemif92@gmail.com

Azadeh Rafie

MSc Student, Plant Cell and Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: a.rafie92@gmail.com

Abstract

Objective

APETALA1 (*API*) gene plays an important role in promoting transition from vegetative to reproductive phase and determining the flower meristem identity. This research was conducted to investigate the *API* relative expression in the black mustard plant (*Brassica nigra* L.). Also, the effect of hydrogen sulfide on flowering and its relative expression was investigated.

Materials and methods

Total RNA was extracted from the collected samples and used to make cDNA. Specific primers were designed and used for RT-PCR reaction based on the sequence alignment of *API* homologous genes in plants of the same family. The relative expression of *API* was studied in the reproductive phase in different organs such as root, stem, leaf, flower bud, sepal, petal, stamen and pistil. In addition, the effect of NaHS on flowering and relative gene expression in different developmental stages in vegetative shoots, generative shoots and flower buds was investigated. The intensity of expression was measured with ImageJ software and the data were compared with ANOVA statistical analysis and Duncan's test with a confidence factor of 95%.

Results

Studies of the relative expression of *API* gene in different organs of the black mustard in the generative phase indicated that this gene is expressed in flower bud, sepal, petal and leaf, but no expression was observed in the root, stem, stamen and pistil. Also, its relative expression in samples treated with NaHS compared with the control group showed that the beginning of *API* gene expression and consequently the transition to flowering is faster and earlier in plants treated with hydrogen sulfide. Thus, the treated plants had a shorter life cycle and flowered 8 days earlier. The comparison of its expression in vegetative shoots, reproductive shoots and flower buds did not show any significant difference in the same developmental stages, but expression higher levels was observed at the same sampling times in the treated samples compared with controls. No expression was observed in the control samples at the periods that the treated samples showed high expression and were in generative phase and flowering.

Conclusions

The relative expression of *API* gene during developmental stages and its increase in the reproductive stage can confirm its role in the flowering process. NaHS induced flowering and in a 35-day life cycle, treated plants entered the reproductive phase 8 days earlier. Therefore, NaHS treatment, by shortening the vegetative period, stimulated the precocious expression of *API* gene and consequently its flowering.

Keywords: *API*, *Brassica nigra*, Flowering, Hydrogen sulfide, PCR.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Rezanejad F, Ganjalikhani Hakemi F, Rafie A (2023) Investigating relative expression of *API* homologous in different organs of black mustard (*Brassica nigra* L.): The effect of hydrogen sulfide (H₂S) on flower stimulation and gene expression. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (1), 167-188.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (1), 167-188. DOI: 10.22103/jab.2023.20447.1440

Received: January 20, 2023.

Received in revised form: February 28, 2023.

Accepted: February 29, 2023.

Published online: February 30, 2023.


Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant




Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors

بررسی بیان نسبی ژن هم ساخت (هومولوگ) *API* در اندام‌های مختلف خردل سیاه (*Brassica nigra* L.): اثر هیدروژن سولفید (H_2S) بر تحریک گل‌دهی و بیان ژن

فرخنده رضانژاد 

*نویسنده مسئول: استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: frezanejad@uk.ac.ir

فرزاد گنجعلیخانی حاکمی 

دانشجوی دکتری سلولی و تکوینی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: hakemif92@gmail.com

آزاده رفیعی

دانش‌آموخته کارشناسی ارشد سلولی و تکوینی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: a.rafi92@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۳۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۱۲/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰

چکیده

هدف: ژن *APETALA1 (API)* در پیشبرد مرحله‌ی گذر از مرحله رویشی به زایشی و نیز تعیین هویت مریستم گل نقش مهمی ایفا می‌کند. این پژوهش با هدف بررسی بیان نسبی این ژن در گیاه خردل سیاه (*Brassica nigra* L.) انجام شد. همچنین اثر هیدروژن سولفید بر گل‌دهی و بیان نسبی ژن *API* نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: RNA کل از نمونه‌های مورد آزمایش، استخراج و برای ساخت cDNA استفاده گردید. آغازگرهای اختصاصی براساس هم‌راستایی توالی ژن‌های هم ساخت *API* در گیاهان هم‌خانواده، طراحی و برای واکنش RT-PCR مورد استفاده قرار گرفتند. میزان بیان نسبی ژن در مرحله زایشی در اندام‌های مختلف از قبیل ریشه، ساقه، برگ، غنچه گل، کاسبرگ، گلبرگ، پرچم و مادگی مطالعه و بررسی شد. اثر سدیم هیدروژن سولفید (NaHS) نیز بر گل‌دهی و میزان نسبی بیان ژن *API* در مراحل مختلف نمو در شاخساره رویشی، شاخساره زایشی و غنچه گل بررسی شد. شدت بیان با نرم‌افزار ImageJ اندازه‌گیری و داده‌ها با آنالیز آماری ANOVA و آزمون دانکن با سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج: بررسی بیان نسبی ژن *API* در اندام‌های مختلف گیاه خردل سیاه در مرحله زایشی حاکی از بیان آن در غنچه‌ی گل، کاسبرگ، گلبرگ و برگ و عدم بیان آن در ریشه، ساقه، پرچم و مادگی بود. همچنین بررسی بیان نسبی ژن *API* در نمونه‌های تحت تیمار NaHS نسبت به گروه شاهد نشان داد که آغاز بیان ژن *API* و در نتیجه مرحله‌ی گذر به گل‌دهی، در گیاهان تحت تیمار سولفید هیدروژن سریع‌تر انجام می‌شود و گیاهان تیمار شده دارای دوره‌ی رویشی کوتاه‌تری هستند (حدود هشت روز زودتر وارد مرحله زایشی شدند). مقایسه‌ی بیان نسبی ژن *API* در شاخساره‌های رویشی، شاخساره‌های زایشی و غنچه گل، در مراحل نموی یکسان تفاوت معنی‌داری نشان نداد اما میزان بیان در زمان‌های یکسان نمونه‌برداری، بیان بالاتر آن را در نمونه‌های تیمار شده نشان داد بطوری که تا روز بیستم که گیاهان تیمار به مرحله تشکیل گل رسیدند هیچ بیانی در نمونه‌های شاهد مشاهده نشد. **نتیجه‌گیری:** الگوی بیان نسبی ژن *API* طی مراحل نموی و افزایش آن در مرحله زایشی، می‌تواند تأییدکننده‌ی نقش این ژن در فرآیند گل‌دهی باشد. NaHS سبب تحریک گل‌دهی شد و در یک چرخه زندگی ۳۵ روزه، گیاهان تیمار شده، هشت روز زودتر وارد مرحله زایشی شدند. بنابراین، تیمار NaHS، با کوتاه کردن دوره‌ی رویشی، بیان زودرس ژن *API* و در نتیجه گل‌دهی زودرس را تحریک کرد.

کلیدواژه‌ها: خردل سیاه، گل‌دهی، هیدروژن سولفید، *API*، PCR.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: رضائزاد فرخنده، گنجعلیخانی حاکمی فرزاد، رفیعی آزاده (۱۴۰۲) بررسی بیان نسبی ژن هم‌ساخت (هومولوگ) *API* در اندام‌های مختلف خردل سیاه (*Brassica nigra* L.): اثر هیدروژن سولفید (H_2S) بر تحریک گل‌دهی و بیان ژن. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۱)، ۱۶۷-۱۸۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant
Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

گل به‌عنوان ساختار زایشی مؤثر، عامل اصلی موفقیت تکاملی گیاهان گل‌دار است. در چرخه‌ی زندگی نهاندانگان، گذر از مرحله رویشی به زایشی یک مرحله‌ی نموی مهم بوده که تحت تنظیم شدید عوامل ژنتیکی است (Amasino 2010) و نیازمند فعال شدن مجموعه‌ای از ژن‌ها در مریستم رأسی بوده، که بیان این ژن‌ها، مریستم را از حالت رویشی به حالت مریستم گل‌آذین (Inflorescence meristem (IM)) تبدیل می‌کند. تشکیل گل‌ها ناشی از بیان ژن‌های تنظیمی بنام ژن‌های تعیین هویت مریستم گل از جمله *FRUITFULL (FUL)*، *APETALA1 (API)*، *LEAFY (LFY)* در سلول‌های مریستم رأسی است

(Soorya et al. 2022). در این بین، بیان ژن *API*، نقش مهمی در پیشبرد مرحله‌ی گذر از مرحله رویشی به زایشی، تعیین هویت مریستم گل و نیز بنیان‌گذاری اندام‌های گل ایفا می‌کند (Shchennikova 2022).

ژن *API* چندین نقش مهم در آرابیدوپسیس ایفا می‌کند که عبارتند از: موثر بودن در مرحله‌ی گذر از مرحله رویشی به زایشی، تعیین هویت مریستم گل، سرکوب مریستم‌های نابه‌جا در گل‌های جهش‌یافته‌ی *api* و بنیان‌گذاری اندام‌های گل به‌عنوان ژن کلاس A در مدل ABC (دو حلقه‌ی بیرونی اندام‌های گل شامل کاسبرگ و گلبرگ) (Gustafson-Brown et al. 1994). بیان *API* از مرحله‌ی گذر در مریستم رأسی آغاز می‌شود و در پرموردیوم‌های گل به سطح بالایی می‌رسد و تا مراحل بعدی ریخت‌زایی اعضای گل (تشکیل کاسبرگ و گلبرگ)، ادامه می‌یابد. در گل‌های تیپ وحشی *RNA* *API* در اولین مراحل رشد و نمو مریستم گل، بطور یکنواخت در سراسر آن تجمع می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد که *API* در تعیین هویت مریستم گل دخالت دارد اما در مراحل بعد، بیان آن در مرکز گل کاهش می‌یابد و پس از آن به دو حلقه‌ی بیرونی اندام‌های گل محدود می‌شود. غیر فعال شدن این ژن، موجب تبدیل کاسبرگ به براکتی و به‌وجود آمدن گل فاقد گلبرگ و تشکیل همزمان جوانه‌ی گل در محور هر کاسبرگ تغییر شکل یافته، می‌شود؛ (Yamaguchi 2021).

بیان *API* از طریق حداقل سه سازوکار مختلف تنظیم می‌شود، یکی از آن‌ها سازوکار ژن *LFY* است که به‌عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی هویت مریستم گل نیز عمل می‌کند. یکی از وظایف مهم *LFY*، تنظیم مستقیم عامل رونویسی *API* از طریق اتصال به ناحیه‌ی تنظیمی و تشویق رونویسی ژن *API* است. *LFY* به شکل یک حلقه‌ی بازخوردی^۱ مثبت، منجر به تنظیم قوی و سریع ژن تعیین هویت مریستم گل می‌شود. اگر چه بیان *API* از طریق *LFY* تنظیم می‌شود اما بطور کامل به آن وابسته نیست و رونوشت‌های *API* در گل‌آذین جهش‌یافته‌های *lfy* قابل شناسایی هستند (Ó'Maoléidigh et al. 2014). به تازگی نشان داده شده است که اجزای مسیر انتقال اکسین، در تنظیم ژن *LFY* موثرند که نقش مهمی در خصوصیات سلول‌های تشکیل دهنده مریستم گل ایفا می‌کنند و در نتیجه منجر به آغاز برنامه‌ی نمو موثر در شکل‌گیری گل و اندام‌های گل می‌شوند. بنابراین مشخصات هویت مریستم گل از طریق تأثیر متقابل بسیاری از ژن‌های تنظیم‌کننده تعیین می‌شود اما *LFY* و *API* به طور یقین در آغاز گل‌دهی مهم‌تر هستند و به خوبی مطالعه شده‌اند (Yamaguchi et al. 2013).

سازوکار دوم برای فعال سازی *API* به کمپلکس پروتئینی تشکیل شده توسط *FLOWERING LOCUS D (FD)* وابسته است که بطور مستقیم به پروموتور *API* و *FLOWERING LOCUS T (FT)* متصل می‌شود (Wigge et al. 2005). ژن *FT* به‌عنوان ژن مؤثر در تحریک گل‌دهی زودرس در گیاهان شناخته شده است. در آرابیدوپسیس، پروتئین *FT*، تحت دوره‌ی نوری روز بلند از برگ‌ها به سمت رأس شاخساره حرکت می‌کند و در آنجا با *FD* تشکیل کمپلکس داده و در فعال سازی ژن‌های تعیین هویت مریستم گل از جمله *API* دخالت می‌کند. مسیره‌های *FT/FD* و *LFY* هر دو بطور مستقل و با هم برای

^۱ Feedback

رسیدن به تنظیم دقیق *API* عمل می‌کنند. در جهش‌های *tki* یا *fd* بیان *API* نسبت به گیاهان تیپ وحشی به شدت به تأخیر افتاده و بیان *API* در گیاهان جهش یافته *fd lfy* و *ft lfy* مشاهده نمی‌شود. بنابراین، یک اثر متقابل قوی بین جهش‌های *ft* و *lfy* وجود دارد (Benlloch et al. 2011; Leijten et al. 2018). سازوکار مسیر سوم که واسطه‌ی فعال‌سازی *API* است، شامل اتصال مستقیم عوامل رونویسی اعضای خانواده‌ی *SPL* به منطقه تنظیمی *API* است. پروتئین‌های *SPL* به توالی‌هایی از DNA که حاوی توالی مرکزی GTAC هستند متصل می‌شوند (Yamaguchi et al. 2009).

ژن *API* نقش دوگانه‌ای در تنظیم نمو مریستم گل (یا به‌عنوان سرکوب‌کننده و یا به‌عنوان فعال‌کننده) ایفا می‌کند؛ این ژن برای سرکوب مستقیم یک گروه از ژن‌های زمان گل‌دهی که تا حدی هویت گل را تعیین می‌کنند و نیز برخی ژن‌های دیگر مورد نیاز است. بدون فعالیت *API* بیان نابه‌جای این ژن‌ها، مریستم گل را به سمت ساختارهای ساقه‌مانند تغییر می‌دهند. مطالعات نشان می‌دهد که بیش از ۸۰ درصد هدف‌های *API* در طی آغاز گل‌دهی مهار می‌شوند؛ بنابراین *API* عمدتاً در طی شروع نمو گل به‌عنوان یک سرکوب‌گر عمل می‌کند (Kaufmann et al. 2010). *API* همچنین به‌عنوان یک فعال‌کننده، در تعیین هویت گلبرگ و کاسبرگ از طریق تنظیم ژن‌های هومئوتیک نقش دارد و این از طریق عدم حضور رونوشت‌های آن‌ها در گل‌های جهش‌یافته‌ی *apl* نشان داده شده است (Sundström et al. 2006). هیدروژن سولفید (H_2S) سال‌های طولانی با اثرات سمی که بر روی سلول‌های زنده داشته، شناخته می‌شد ولی در دهه‌ی اخیر این ماده به‌عنوان مولکول پیامبر جدید معرفی شده که واسطه‌ی انتقال پیام و بروز پاسخ‌های فیزیولوژیک است. هیدروژن سولفید از منابع زنده و غیر زنده تولید می‌شود و می‌تواند طی یک سری از واکنش‌ها اکسید شود و گوگرد دی‌اکسید و سولفات‌هایی از قبیل اسید سولفوریک و سایر ترکیبات گوگردی را به وجود بیاورد (Aroca et al. 2018; Fotopoulos et al. 2013). هیدروژن سولفید به صورت درون‌زاد در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی از قبیل خیار، کدو، کتان و سویا تولید می‌شود. به علاوه زمانی که گیاه با سولفات و یا ترکیبات گوگردی تغذیه می‌شود و نیز در پاسخ به حمله‌ی پاتوژن‌ها و آسیب‌های مکانیکی به ریشه، از برگ‌های خود H_2S متصاعد می‌کند (Wilson et al. 1978). سدیم هیدروسولفید ($NaHS$)، متداول‌ترین ترکیبی است که به‌عنوان دهنده‌ی H_2S در سامانه‌های زیستی بکار می‌رود، اما از سایر ترکیبات مانند GYY4137 (morpholin-4-ium-4-methoxyphenyl (morpholino) phosphinodithioate) که اهمیت فیزیولوژیک دارد به‌عنوان دهنده‌ی H_2S نیز، به کار می‌رود (Wang et al. 2012). H_2S باعث جوانه‌زنی دانه در شرایط طبیعی و تحت تنش می‌شود (Zhang et al. 2010). هیدروژن سولفید همچنین مانع از پیری زودرس در گیاه شده و در جهش‌یافته‌هایی که قابلیت بیوسنتز H_2S را ندارند، ژن‌های موثر در پیری بیان می‌شوند که با تیمار گیاهان با $NaHS$ این اثر برطرف می‌شود (Álvarez et al. 2010). همچنین ترکیب رهاکننده H_2S طول عمر گل‌های شاخه بریده در چندین گونه گیاهی را افزایش داد (Zhang et al. 2011).

گیاه خردل سیاه (*Brassica nigra* L.) که از خانواده‌ی *Brassicaceae* است دارای ۲۰ درصد موسیلاژ و ۳۳-۲۳ درصد روغن قابل استخراج می‌باشد که به مصارف صنعتی و تهیه صابون می‌رسد (Zargari 1997). از پودر دانه خردل سیاه به عنوان ضد درد، ضد التهاب و برای درمان دردهای رماتیسمی و عصبی و رفع خفگی استفاده می‌شود. همچنین گزارش‌هایی مبنی بر موثر بودن دانه‌ی این گیاه در بهبود آسیب‌های کبدی و کلیوی وجود دارد. دوره‌ی رشد رویشی گیاه خردل سیاه (*B. nigra*) تقریباً مشابه با آراییدوپسیس است. یعنی در شرایط دوره‌ی نوری روز بلند، در سن ۲۸ تا ۳۵ روزگی، غنچه‌های گل روی گیاه پدیدار می‌شوند (Rajamurugan et al. 2012). با توجه به اهمیت پدیده‌ی گل‌دهی در گیاهان و از طرفی نقش ژن *API* در گذر به گل‌دهی و نیز نمودارهای گل، بررسی میزان بیان آن در اندام‌های مختلف و نیز اثر عوامل موثر بر گل‌دهی و میزان بیان این ژن تحت اثر آن‌ها، می‌تواند به شناخت سازوکارهای گل‌دهی و موفقیت آن کمک کند. در مطالعات مروری انجام شده، گزارشی مبنی بر اثر احتمالی سولفید هیدروژن (H_2S) بر فرآیند گل‌دهی و ژن‌های موثر در این فرایند مشاهده نشد. بنابراین اثر این ماده بر تحریک گل‌دهی و بیان نسبی ژن *API* در اندام‌های مختلف گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه خردل سیاه (*B. nigra*) و نمونه‌برداری: بذر گیاه خردل سیاه (*B. nigra*) از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شد و بذرها در گلدان‌های با قطر ۶۰ میلی‌متر و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر حاوی پرلیت در شرایط گلخانه‌ای با دمای $25^{\circ}C$ و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت داده شدند. بمنظور بررسی بیان نسبی ژن همساخت *API* در قسمت‌های مختلف گیاه مورد مطالعه، در مرحله زایشی (۳۵ روزگی)، از ریشه، ساقه، برگ، غنچه گل، کاسبرگ، گلبرگ، پرچم و مادگی نمونه‌برداری شد.

تیمار با H_2S و نمونه‌برداری: بمنظور بررسی اثر تحریکی H_2S بر گل‌دهی چهار گروه گلدان کشت شد. روی سه گروه، غلظت‌های متفاوتی از $NaHS$ (۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکرومولار) به صورت یک روز در میان از ۷ روزگی تا زمان ظهور اولین غنچه‌ی گل اسپری شد. گروه چهارم که گروه شاهد بود فقط با آب مقطر اسپری شدند. ضمن بهینه‌سازی مشخص شد غلظت ۱۲۰ میکرومولار اثر بهتری نسبت به دو غلظت دیگر دارد (در تیمار ۱۲۰ میکرومولار $NaHS$ ، گیاهان رشد سریع‌تر و گل‌دهی زودتر نسبت به دو تیمار ۴۰ و ۸۰ میکرومولار $NaHS$ داشتند). بنابراین، آزمایش‌های نهایی و بررسی بیان، در این غلظت H_2S انجام شد. برای انجام این آزمایش‌ها، دو گروه گلدان ۱۵۰ تا‌بی کشت شد. گروه اول با آب مقطر و گروه دوم با محلول ۱۲۰ میکرومولار $NaHS$ همانند روش قبل تیمار شدند. با توجه به اثر تحریکی H_2S بر گل‌دهی، زمان گل‌دهی و نمونه‌برداری‌ها متفاوت بود (H_2S سبب گل‌دهی زودرس شد). بنابراین، شاخساره در مراحل مختلف رویشی و زایشی در ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶ و ۱۸ روزگی از گیاهان

تحت تیمار با NaHS و در ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۲، ۲۴ و ۲۶ روزگی از گیاهان شاهد جمع‌آوری شد. همچنین اولین غنچه‌های گل در ۲۰ روزگی از گیاهان تحت تیمار و ۲۸ روزگی از گیاهان شاهد نیز نمونه‌برداری شدند.

طراحی آغازگر: از آنجایی که در پژوهشی دیگر توالی ژن *API* در خردل سیاه شناسایی و در پایگاه داده NCBI با شماره

دسترسی KT156724 و نام *BniAPI* ثبت شده است (Rafie & Rezanejad 2015) بنابراین برای مطالعه بیان نسبی ژن،

آغازگرها از این توالی و نواحی حفاظت شده آن، طراحی شد، به‌گونه‌ای که آغازگرها روی دو آگرون مختلف از این ژن با استفاده از

نرم‌افزار GeneRunner 6.5 طراحی و سپس برای تشخیص مناسب بودن این دو آغازگر و عدم اتصال آن‌ها به دیگر ژن‌ها، در

نرم‌افزار primer blast بررسی شدند (Ganjalkhani Hakemi et al. 2020) تا بتوان از محصول آن‌ها برای بررسی بیان

نسبی ژن *API* استفاده کرد و از ژن *GAPDH* در سیب زمینی به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد (Guo & Yang 2008). نام و

توالی آغازگرها در جدول ۱ آمده است. در این مطالعه، به دست آمدن تک باند اختصاصی حاصل از PCR روی ژل آگارز بیانگر

طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها می‌باشد. سنتز آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت پیشگام صورت گرفت. طبق دستورالعمل

شرکت، برای تهیه محلول ذخیره، مقدار مشخصی آب دیونیزه استریل به آغازگرهای لیوفیلیزه^۲ اضافه و سپس برای تهیه

محلول کاری، مقداری از محلول ذخیره ۱۰ برابر رقیق و سپس تمامی این محلول‌ها در فریزر و در دمای -20°C نگهداری شدند.

جدول ۱. نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده

Table 1. Name and sequence of primers used

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر (5' → 3') Primer sequence	طول قطعه Amplicon size (bp)
Ex ^r -fr <i>API</i>	GGAGAGAAATCAGAGGCAC	268
Ex-rv <i>API</i>	CCCTAAGAATCTTTCCCT	
Fr- <i>GAPDH</i>	CAAGGACTGGAGAGGTGG	500
Rv- <i>GAPDH</i>	TTCACTCGTTGTCGTACC	

استخراج RNA، ساخت cDNA و انجام RT-PCR: RNA کل با استفاده از محلول استخراج RNA

(GeneAll, RiboEx, Total RNA isolation solution, Korea) از نمونه‌های جمع‌آوری شده، استخراج شد. برای

ارزیابی تعیین غلظت و کیفیت RNA از روش‌های اسپکتوفتومتری با استفاده از دستگاه بیوفتومتر مدل ۶۱۳۱ (Eppendorf

AG Biophotometer, Germany) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد

(Sambrook et al. 2006). با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت فرمنتاز (RevertAid First Strand cDNA)

^۲ Lyophilized

^۳ Expression

Synthesis Kit) از روی RNA استخراجی، رشته‌ی اول cDNA سنتز و در نهایت از آن در PCR بعنوان DNA الگو استفاده شد.

مطالعات بیان نسبی ژن و آنالیز آماری مطالعات مولکولی: برای بررسی بیان نسبی ژن *API* در قسمت‌های

مختلف گیاه مورد مطالعه، مواد مورد نیاز برای انجام PCR از شرکت سیناکلون خریداری و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل PTC (1148 MJ Mini Personal Thermal Cycler BioRad, USA) و برنامه‌ی زمانی و دمایی اشاره شده در جدول ۲ استفاده شد. برای مقایسه‌ی میزان بیان نسبی ژن *API*، داده‌های مربوط به شدت باند تکثیر شده روی ژل آگارز یک درصد در واکنش PCR با استفاده از نرم‌افزار ImageJ بدست آمد. سپس با استفاده از نرم‌افزار SPSS، آنالیز آماری ANOVA با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفته و در نهایت نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند. آزمایش‌های سنجش بیان نسبی ژن، با سه تکرار انجام شد.

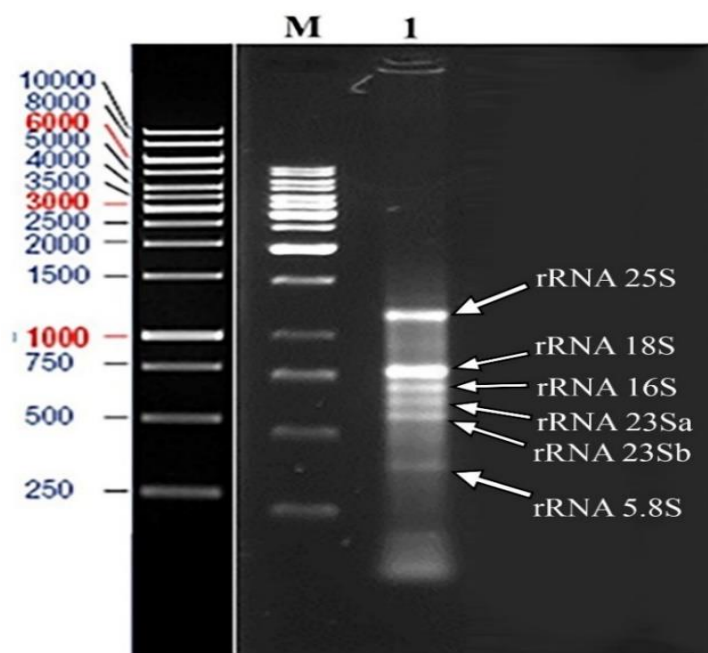
جدول ۲. برنامه زمانی و دمایی برای انجام PCR

Table 2. Time and temperature schedule for PCR

برنامه واکنش PCR PCR reaction program	دما Temperature	زمان Time	چرخه cycle
واسرشتگی اولیه (Primary denaturation)	95°C	4 min	1
واسرشتگی ثانویه (Secondary denaturation)	95°C	30 sec	32
اتصال (Annealing)	57°C	30 sec	
طویل شدن (Elongation)	72°C	30 sec	
طویل شدن نهایی (Final elongation)	72°C	5 min	1

نتایج و بحث

نتایج تعیین کمیت و مناسب بودن RNAهای کل استخراج شده از نمونه‌های مختلف، با استفاده از بیوفلورومتر نشان داد که جذب RNAها در طول موج ۲۶۰ نانومتر به طور متوسط بین ۰/۰۶-۰/۰۵ و نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲/۱-۱/۹ بود. مطالعات نشان می‌دهد که نسبت پایین جذب، می‌تواند نشان‌دهنده‌ی آلودگی به‌وسیله‌ی پروتئین باشد (Okamoto & Okabe 2000). همچنین تعیین کیفیت با الکتروفورز افقی روی ژل آگارز یک درصد و مشاهده باندهای مشخص RNAهای ریبوزومی، نشان‌دهنده‌ی کیفیت مطلوب RNA استخراج شده برای انجام RT-PCR است (شکل ۱) (Micol-Ponce et al. 2018).



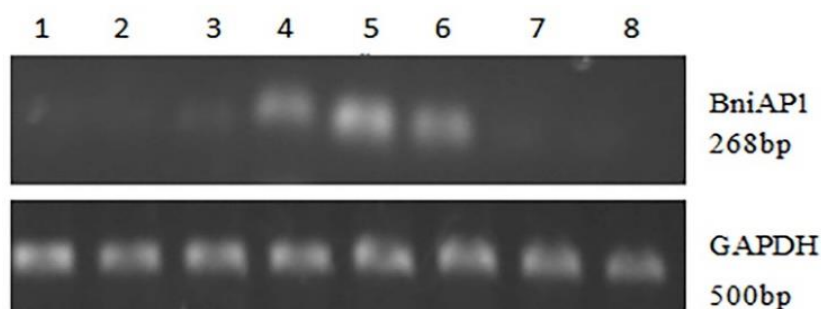
شکل ۱. نیمرخ الکتروفورزی RNA کل استخراج شده خردل سیاه (*B. nigra*). در این شکل فقط RNA کل استخراج شده از غنچه گل نشان داده شده است. 1: RNA کل با باندهای واضح rRNAهای ریبوزومی. M: نشانگر (مارکر) مولکولی (Thermo Scientific DNA 1kb)

Figure 1. Electrophoretic profile of total RNA extracted from black mustard (*B. nigra*). In this figure, only the total RNA extracted from the flower bud has been shown. 1: Total RNA with distinct bands of ribosomal RNAs. M: molecular marker (Thermo Scientific DNA 1kb)

بیان نسبی ژن *API* در بخش‌های مختلف گیاه در مرحله زایشی: تک نوار^۴ اختصاصی قطعه‌ی ۲۶۸ نوکلئوتیدی حاصل از RT-PCR روی ژل آگارز یک در صد، در درجه‌ی اول بیانگر طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و مناسب بودن غلظت مواد بکار رفته در PCR است. همچنین برنامه‌ی PCR مناسب (بخصوص دمای اتصال) از جمله عوامل موفقیت در کسب تک باند اختصاصی است (Sambrook et al. 2006). نتایج حاصل از بیان نسبی ژن *API* در اندام‌های مختلف در مرحله زایشی (۳۵ روزگی)، با استفاده از RT-PCR، نشان داد که این ژن (قطعه‌ی ۲۶۸ نوکلئوتیدی) در برخی اندام‌ها شامل غنچه‌ی گل، کاسبرگ و گلبرگ بیان شد و به‌میزان کم‌تر در برگ نیز، بیان شد اما بیان آن در ساقه، ریشه، پرچم و مادگی مشاهده نشد (شکل ۲). نتایج حاصل از سنجش بیان نسبی ژن با استفاده از نرم افزار ImageJ و SPSS، نتایج بدست آمده از الکتروفورز را تایید کرد (شکل ۳). بطور کلی اگر چه پرموردیوم گل، کاسبرگ و گلبرگ مورد انتظارترین مکان برای بیان ژن *API* هستند اما گزارش‌های

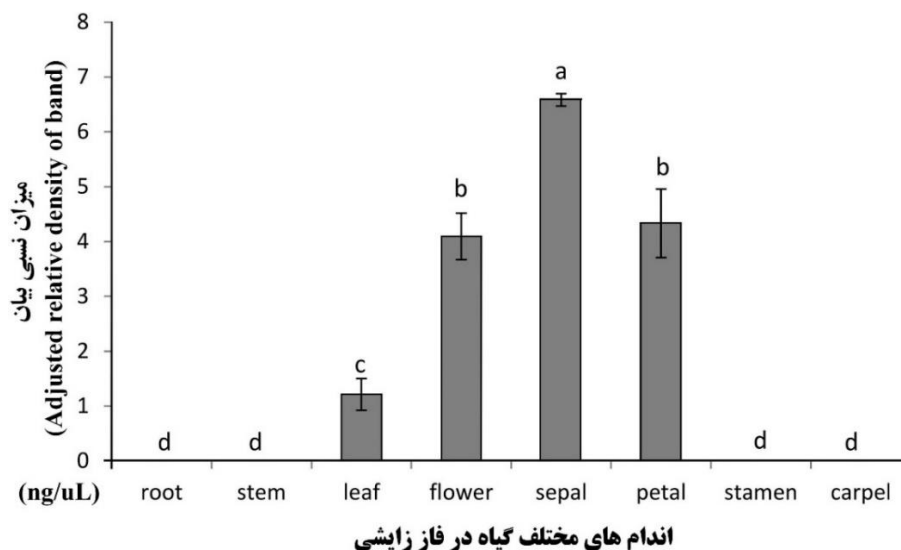
^۴ Band

معدودی وجود دارد که بیان این ژن را در برخی اندام‌های رویشی در مرحله زایشی نیز نشان می‌دهد؛ آزمایش‌های RT-PCR نشان می‌دهد که *CsAPI* (همولوگ *API* در زعفران (*Crocus sativus*)) در کاسبرگ، گلبرگ، پرچم، مادگی و برگ نیز بیان می‌شود (Tsaftaris et al. 2004). نتایج مشابهی در آراییدوپسیس (Alejandra Mandel et al. 1992)، کلم (*Brassica oleraceae*) (Shiraishi et al. 1993) و گیلاس (*Prunus avium*) (Wang et al. 2013) گزارش شده است. مشخص شده است که ژن *BoiAPI* در کاسبرگ‌ها، گلبرگ‌ها و در پریموردیوم‌های پرچم گیاه کلم، بیان می‌شود (shakib & insverce 2011)؛ بطور کلی اگرچه غنچه‌ی گل، کاسبرگ و گلبرگ مورد انتظارترین مکان برای بیان ژن *API* هستند اما *PaAPI* که همولوگ ژن *API* در گیلاس است، در همه اندام‌های گیاه بالغ در مرحله زایشی به جز ریشه بیان شد (Wang et al. 2013). ژن *API* یکی از ژن‌های خانواده MADS-box است که به پروموتور *SEP3* که یکی از ژن‌های تعیین هویت اندام گل و محرک تشکیل گل‌پوش است، متصل می‌شود و بیان آن به سرعت پس از فعال شدن *API* افزایش می‌یابد (Sridhar et al. 2006) بنابراین بیان این ژن حاکی از آن است که نقش عمده‌ای در تبدیل مریستم رویشی به مریستم گل و نیز در آغاز نمو و تعیین هویت پریموردیوم‌ها و اعضای زایشی مانند کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها در مراحل اولیه‌ی نمو گل دارد (shakib & insverce 2011).



شکل ۲. بیان نسبی ژن *API* در بخش‌های مختلف خردل سیاه (*B. nigra*) در مرحله‌ی زایشی (۳۵ روزگی).
 ۱: ریشه، ۲: ساقه، ۳: برگ، ۴: غنچه‌ی گل، ۵: کاسبرگ، ۶: گلبرگ، ۷: پرچم، ۸: مادگی. در تمامی واکنش‌ها بیان نسبی ژن قطعه تقریباً ۵۰۰ نوکلئوتیدی *GAPDH*، به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است

Figure 2. *API* relative expression in different parts of black mustard (*B. nigra*) in reproductive stage (35 days old). 1 to 8 are: 1: root, 2: stem, 3: leaf, 4: flower bud, 5: sepal, 6: petal, 7: stamen, 8: pistil. In all reactions, the relative expression of *GAPDH* (approximately 500 nucleotide) is considered as a positive control

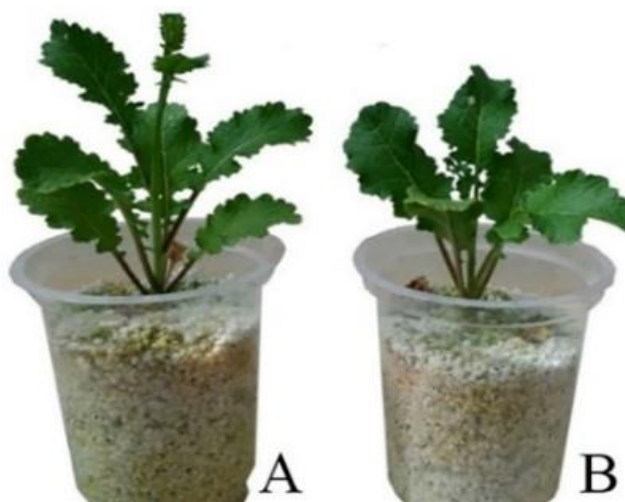


شکل ۳. بیان نسبی ژن *API* در اندام‌های مختلف خردل سیاه (*B. nigra*) در مرحله زایشی (۳۵ روزگی). برای هر آزمایش سه تکرار در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و $P < 0.05$ بیانگر اختلاف معنی‌دار است. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن میانگین‌ها است

Figure 3. *API* relative expression in different parts of black mustard (*B. nigra*) in reproductive stage (35 days old). Three replicates were used for each experiment. Comparison of means with Duncan's test and $P < 0.05$ indicates a significant difference. Different letters indicate the significance of the means

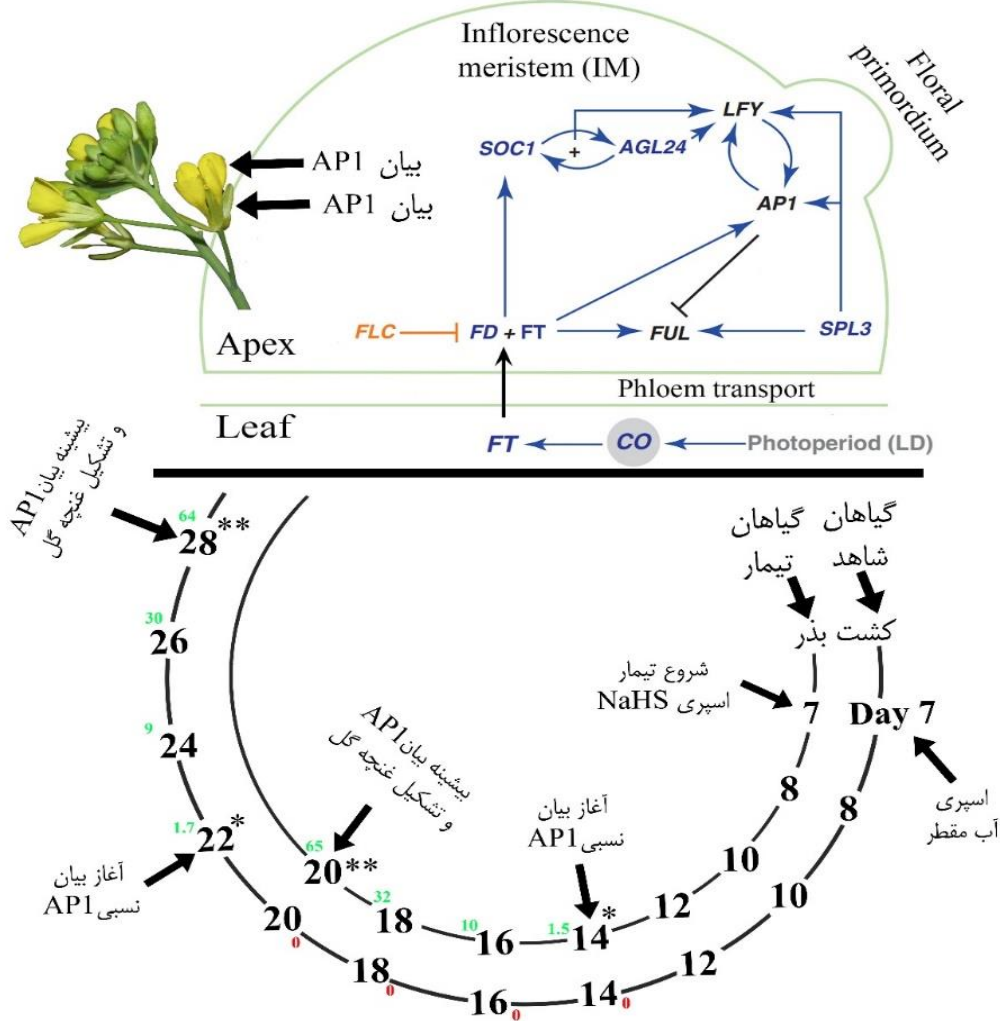
ر شد گیاه و تشکیل غنچه‌های گل در تیمار هیدروژن سولفید: نتایج حاصل از میزان رشد رویشی و تشکیل غنچه‌های گل در گیاهان شاهد و تحت تیمار نشان داد که غلظت ۱۲۰ میکرومولار اثر بهتری نسبت به دو غلظت دیگر دارد (در تیمار ۱۲۰ میکرومولار NaHS، گیاهان رشد سریع‌تر و گل‌دهی زودتر نسبت به دو تیمار ۴۰ و ۸۰ میکرومولار NaHS داشتند). همچنین مشخص شد که گیاهان تحت اثر NaHS نسبت به گروه شاهد حدود هشت روز زودتر وارد مرحله زایشی شدند بنابراین، دارای دوره‌ی رویشی کوتاه‌تری بودند (شکل‌های ۴ و ۵). مطالعات انجام شده روی اثر H_2S بر گل‌دهی و دوره رویشی گیاهان محدود است، به‌رحال مطالعاتی روی فرآیندهای فیزیولوژیکی که تحت تاثیر H_2S قرار می‌گیرند، انجام شده است، برای مثال در گوجه‌فرنگی مشخص شده است که H_2S در تشکیل و نمو ریشه‌های جانبی مؤثر است که این عمل با دخالت اکسین انجام می‌شود، زیرا استفاده از مهارکننده H_2S ، تشکیل ریشه‌های جانبی را بلوکه می‌کند (Fang et al. 2014). همچنین H_2S باعث رویش بالاتر دانه در شرایط طبیعی و تحت تنش می‌شود و تیمار بذرهای گندم با NaHS، در صد جوانه‌زنی را در شرایط طبیعی و تنش فلزاتی از قبیل آلومینیوم، کروم و کادمیوم افزایش می‌دهد (Zhang et al. 2010). هیدروژن سولفید فتوسنتز را در گیاه

Spinacia oleracea افزایش داده است؛ تیمار گیاه با غلظت‌های پایین NaHS محتوی کلروفیل و تیغه‌های گرانی را افزایش داده و از این طریق باعث تکامل کلروپلاست شده است (Chen et al. 2011). بنظر می‌رسد تغییر شرایط فیزیولوژیک گیاه، دلیل رشد رویشی بیشتر و گل‌دهی زودتر و فعال‌سازی ژن‌های موثر آن‌ها باشد. سولفید هیدروژن (H_2S) یک انتقال‌دهنده گازی گیاهی است که نقش‌های فیزیولوژیک مهمی در رشد، نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی ایفا می‌کند. مطابق مطالعات کتابخانه‌ای ما، مطالعات منتشر شده‌ای درباره اثر این ترکیب روی بیان ژن *API* وجود ندارد. مطالعات اخیر (Ma et al 2021) روی نوعی کلم (*Brassica*) نشان داده است که علامت (سیگنال) دهی H_2S ، زمان گل‌دهی را تنظیم و سبب افزایش آن می‌شود. این اثر از طریق تضعیف توانایی اتصال ژن *BraFLC* به برخی از پروموتورهای ژن‌های محرک گل‌دهی انجام می‌شود. از آنجایی که *FLC* به‌عنوان یک ژن بازدارنده گل‌دهی است و از بیان ژن‌هایی مانند *FT* و *SOC1* که باعث افزایش گل‌دهی در گیاهان می‌شود، جلوگیری می‌کند، کاهش بیان این ژن تحت اثر سولفید هیدروژن، اثر تحریکی این ترکیب بر گل‌دهی را تایید می‌نماید (Ma et al. 2021). به هر حال، هنوز مشخص نشده است که کاهش بیان ژن *BraFLC* در تنظیم کدامیک از فاکتورهای مهم موثر در تحریک گل‌دهی اثر دارد و نیاز به مطالعات بیشتر دارد.



شکل ۴. رشد و تشکیل گل‌آذین در خردل سیاه (*B. nigra*) در ۲۰ روزگی، (A) تحت تیمار NaHS و (B) گروه شاهد. گیاهان تحت تیمار NaHS گل‌آذین را تشکیل داده و دارای غنچه‌های گل هستند اما گیاهان شاهد هنوز در مرحله‌ی رویشی قرار دارند

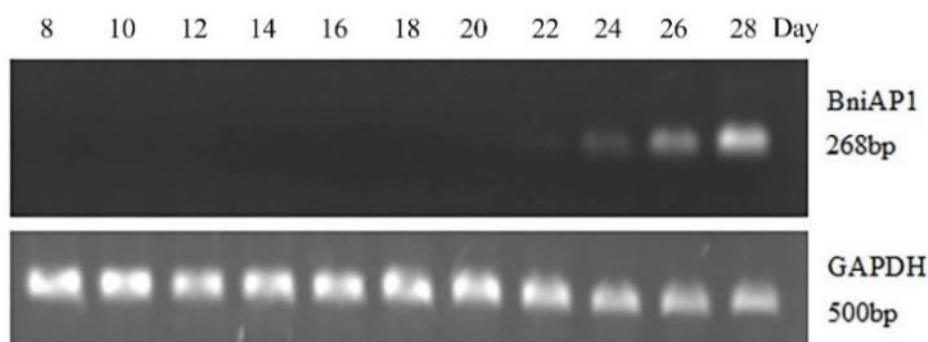
Figure 4. The growth and inflorescence formation in black mustard plant (*B. nigra*) at 20 days after planting, (A) treated with NaHS and (B) control. Inflorescence and flower buds have produced in NaHS-treated plants. Control plants are still in the vegetative stage



شکل ۵. طرح‌واره شبکه ژنی گل‌دهی (برگرفته از (Wellmer & Riechmann 2010)) و اثر تیمار NaHS روی گل‌دهی و بیان نسبی API در خردل سیاه (*B. nigra*). مقایسه زمان بیان نسبی ژن API در گیاهان گروه شاهد و تحت اثر NaHS از زمان شروع بیان (مرحله گذر) این ژن تا تشکیل غنچه گل. *, زمان آغاز بیان نسبی ژن API, **, زمان بیشینه بیان و تشکیل غنچه گل. میزان بیان در مرحله آغاز و مراحل بعدی تا تشکیل غنچه در هر دو نمونه شاهد و تیمار از نظر آماری یکسان است (نشان داده شده بوسیله اعداد با رنگ سبز در این شکل و شکل ۱۰). همانطور که در شکل دیده می‌شود زمان آغاز و دوره بیان این ژن، در نمونه‌های شاهد و تیمار متفاوت است، 0 = هیچ بیانی دیده نمی‌شود

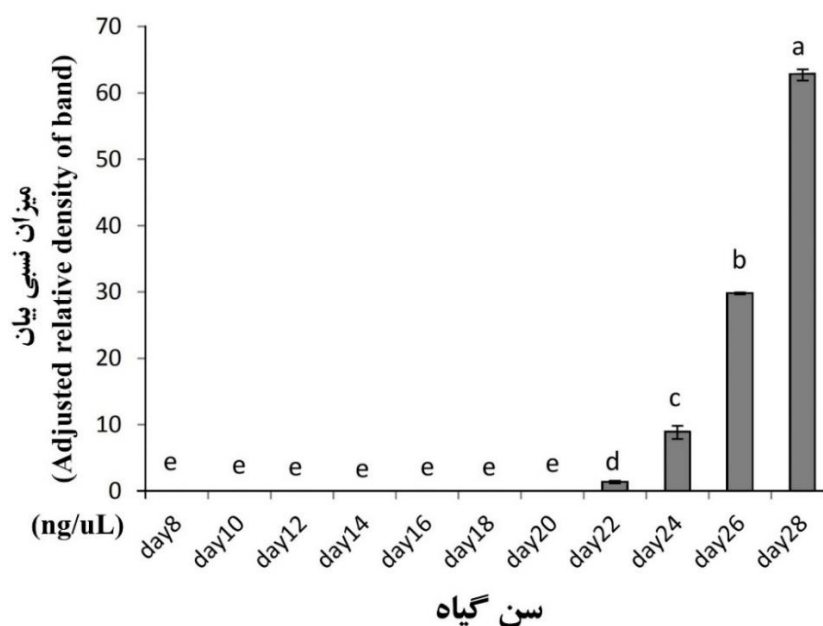
Figure 5. Schematic diagram of flowering gene network (taken from (Wellmer & Riechmann 2010)) and effect of NaHS treatment on flowering and relative expression of API in black mustard (*B. nigra*). Comparison of relative expression time of API gene in plants of control and exposed to NaHS, from the time of the beginning of expression (transition stage) of this gene to the formation of flower buds. *, the beginning relative expression of API gene, **, the time of maximum expression and flower bud formation. The levels of expression in the initial stage and subsequent stages until flower bud formation are the same in both control and treatment samples statistically (the expression levels are shown as green digits, Figure 10), as seen in this figure, the start time of gene expression and period of its expression are different in control and treatment samples, 0 = No expression is seen

بیان نسبی ژن API در گیاهان شاهد و تحت اثر تیمار هیدروژن سولفید: بیان نسبی API در گیاهان گروه شاهد در روزهای ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۲، ۲۴، ۲۶ و ۲۸ و در گیاهان تحت تیمار NaHS، در روزهای ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸ و ۲۰ با استفاده از سرشاخه‌های انتهایی بررسی و مقایسه شد (شکل‌های ۹-۵). چرخه زندگی گیاه حدود یک ماه است، همان‌طور که در مواد و روش‌ها ذکر شد. دلیل دوره زمانی بیشتر در گیاهان شاهد، این بود که در زمان‌هایی که گیاهان تیمار، بیان نسبی ژن را نشان دادند و وارد مرحله گل‌دهی شدند، گیاهان شاهد، هیچ بیانی نداشتند و آثاری از ظهور گل نیز دیده نشد. بنابراین، در روزهای ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸ و ۲۰ که در گیاهان تیمار، بیان شروع (روز ۱۴)، و سپس در روزهای ۱۶ تا ۲۰ افزایش یافت (بیشینه در روز ۲۰)، در گیاهان شاهد هیچ بیانی دیده نشد. در این گیاهان (شاهد)، بیان از ۲۲ روزگی شروع شد که میزان بیان در این روز، از نظر آماری مساوی میزان بیان در روز ۱۴ گیاهان تیمار بود (مشخص شده بوسیله ستاره و اعداد با رنگ سبز در شکل ۵ و مقایسه شده در شکل ۱۰). بنابراین زمان شروع بیان، افزایش و نیز بیشینه آن در دو گروه متفاوت است (مشخص شده بوسیله اعداد با رنگ سبز در شکل ۵ و مقایسه شده در شکل ۱۰). همان‌طور که در این شکل‌ها دیده می‌شود میزان بیان در شروع یعنی روز ۱۴ در تیمار و ۲۲ در شاهد از نظر آماری یکسان و به نسبت پایین است. سپس میزان بیان در روزهای ۱۶، ۱۸ و ۲۰ در گیاهان تیمار، به ترتیب با روزهای ۲۴، ۲۶ و ۲۸ در گیاهان شاهد از نظر آماری مساوی بود (شکل‌های ۵ و ۱۰). بیشینه بیان که در این مرحله با تشکیل غنچه‌های گل مشاهده شدند، به ترتیب در روز ۲۰ نمونه‌های تیمار و ۲۸ نمونه‌های شاهد مشاهده شد که در دو گروه مورد آزمایش از نظر آماری یکسان بود (شکل‌های ۵ و ۱۰). مهمترین نقش API، گذر به گل‌دهی، تعیین هویت مریستم گل و همچنین تعیین هویت دو حلقه‌ی بیرونی اندام‌های گل به‌عنوان ژن کلاس A در مدل ABC(DE) می‌باشد (Yamaguchi 2021). مطالعات مشخص کرده است که ژن LFY با ژن API در تعامل بوده و با فعال کردن ژن API و با همکاری یکدیگر در فرآیند گذر به گل‌دهی شرکت می‌کنند (Peer et al. 2021). هر دو ژن‌های LFY و API جزء ژن‌های میانجی گل‌دهی بوده و بیان هر دو به‌صورت مستقیم تحت تأثیر قرار می‌گیرد، یعنی با سرکوب ژن LFY، بیان ژن API هم کاهش می‌یابد (Turck et al. 2008). با بررسی‌های انجام شده در گیاه آرابی‌دوپسیس مشخص شده است که دایمرهای API/AP2 و SEP/API تترامری را تشکیل می‌دهند که در تشکیل کاسبرگ‌ها و دایمرهای AP3/API و SEP/API با ایجاد تترامر در تشکیل گلبرگ‌ها نقش دارند (Irish 2010).



شکل ۶. میزان بیان نسبی ژن *API* در خردل سیاه (*B. nigra*) در گروه شاهد. در تمامی واکنش‌ها بیان نسبی ژن *GAPDH* به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است.

Figure 6. *API* relative expression level in black mustard (*B. nigra*) in the control group. In all reactions, *GAPDH* relative expression is considered as a positive control.

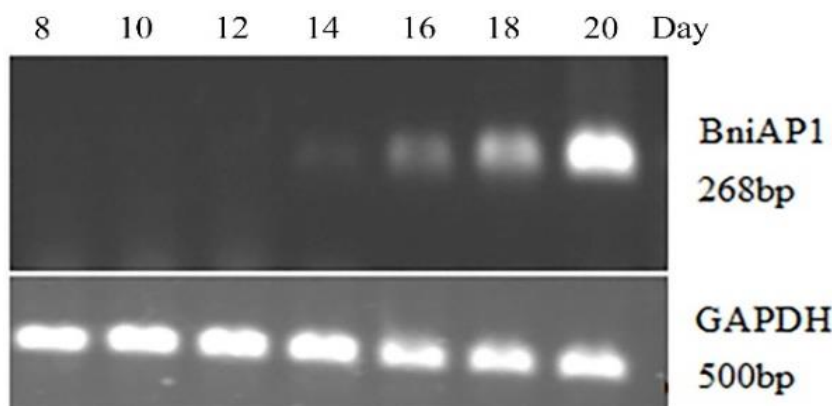


شکل ۷. میزان بیان نسبی ژن *API* در زمان‌های مختلف خردل سیاه (*B. nigra*) در گروه شاهد. برای هر آزمایش سه تکرار در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت و $P < 0.05$ بیانگر اختلاف معنی‌دار است. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن میانگین‌ها است.

Figure 7. *API* relative expression at different ages of black mustard (*B. nigra*) in the control. Three replicates were considered for each experiment. Comparison of means with Duncan's test and $P < 0.05$ indicates a significant difference. Different letters indicate the significance of the means.

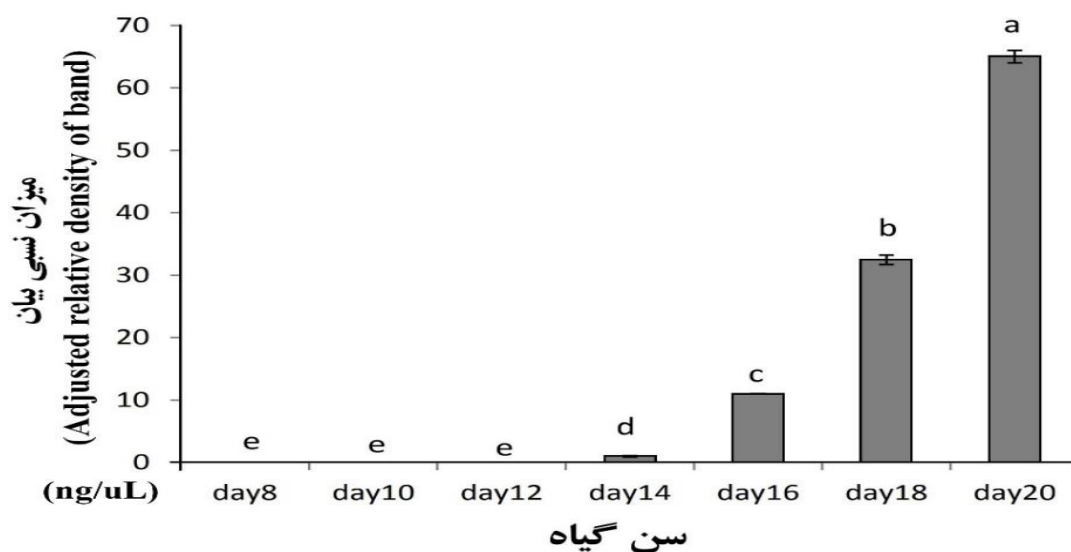
در گیاهان تحت تیمار در قسمت مریستم روی‌شی، در زمان‌های ۸، ۱۰ و ۱۲ روزگی بیانی مشاهده نشد. در ۱۴ روزگی باند بسیار کم‌رنگی دیده شد که نشان‌دهنده مرحله‌ی گذر به گل‌دهی می‌باشد. در ۱۶ و ۱۸ روزگی به ترتیب باندهای درخشان‌تری مشاهده شد و در ۲۰ روزگی که همراه با پیدایش غنچه‌های گل بود، باندی بسیار درخشان‌تر از مراحل قبل مشاهده گردید و میزان بیان بالاتر بود (شکل‌های ۸ و ۹). *API* یکی از ژن‌های موثر در مرحله‌ی گذر و همچنین تعیین هویت مریستم گل می‌باشد و

نقش مهمی را در مراحل اولیه نمو گل ایفا می‌کند (Yamaguchi 2021). بیان آن به تدریج پیش از آغاز گل‌دهی افزایش می‌یابد و تا مراحل بعدی ریختزایی گل (تشکیل کاسبرگ و گلبرگ) ادامه می‌یابد (Sridhar et al. 2006).



شکل ۸. میزان بیان نسبی ژن *API* در خردل سیاه (*B. nigra*) تحت تیمار NaHS در زمان‌های مختلف. در تمامی واکنش‌ها بیان نسبی ژن *GAPDH* به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است.

Figure 8. *API* relative expression levels in black mustard (*B. nigra*) treated with NaHS at different ages. In all reactions, *GAPDH* relative expression is considered as a positive control.



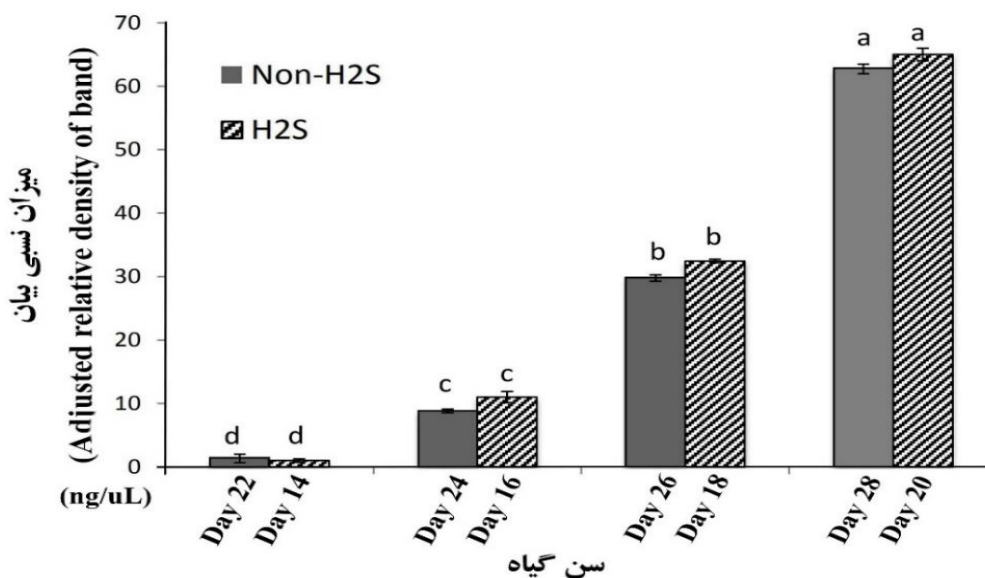
شکل ۹. میزان بیان نسبی ژن *API* در خردل سیاه (*B. nigra*) تحت تیمار NaHS در زمان‌های مختلف. برای هر آزمایش سه تکرار در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت و $P < 0.05$ بیانگر اختلاف معنی‌دار است. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن میانگین‌ها است.

Figure 9. relative expression level of *API* gene in black mustard (*B. nigra*) treated with NaHS at different ages. Three replicates were used for each experiment. Means were compared with Duncan's test in $P < 0.05$. Different letters show significancy.

نتایج حاصل از بیان نسبی ژن در گیاهان شاهد و تحت تیمار نشان داد که گیاهان تحت اثر NaHS نسبت به گروه شاهد حدود هشت روز زودتر وارد مرحله زایشی شدند، بنابراین، دارای دوره‌ی رویشی کوتاه‌تری بودند. میزان بیان نسبی در گیاهان تحت اثر NaHS در ۱۴، ۱۶، ۱۸ و ۲۰ روزگی با گروه شاهد در ۲۲، ۲۴، ۲۶ و ۲۸ روزگی (برای مثال روز ۱۴ تیمار با روز ۲۲ شاهد و ...) برابر بود و تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. قابل توجه است که در روزهای ۱۴-۲۰ که بیان در گیاهان تحت تیمار بالا و روند نموی در حال تمایز بود هیچ بیانی در نمونه‌های شاهد مشاهده نشد بنابراین می‌توان گفت در زمان یکسان پس از کشت (روزهای ۲۰-۱۴ با فواصل دو روز)، میزان بیان در نمونه‌های تیمار بالاتر و در نتیجه، گل‌دهی تحریک می‌شود اما در مراحل نموی یکسان، میزان بیان تفاوت ندارد (شکل ۱۰). بنابراین، آغاز بیان ژن *API* که در مرحله‌ی گذر رخ می‌دهد و یکی از نشانه‌های گذر به مرحله زایشی می‌باشد، در گیاهان تحت اثر تیمار زودتر مشاهده گردید. به نظر می‌رسد که تیمار NaHS زمان بیان ژن‌های محرک گل‌دهی را جلو انداخته و بیان پیش‌رس این ژن‌ها از جمله *API*، گل‌دهی را تحریک می‌کند بنابراین روی زمان گذر به گل‌دهی و شروع بیان ژن موثر است. از آنجایی که فرآیندهای مختلف تکوینی مانند گل‌دهی، تحت اثر هورمون‌های مختلف یا تعادل بین آن‌ها قرار می‌گیرد، بنابراین بنظر می‌رسد که NaHS، ژن‌هایی که مسئول حفظ مرحله رویشی هستند را مهار کرده، در نتیجه ژن‌های مسئول مرحله زایشی شروع به فعالیت می‌کنند. احتمال دیگر این است که NaHS بر یکی از ژن‌هایی که در ورود به مرحله گذر موثر هستند اثر گذاشته و عواملی را که موجب خاموشی آن‌ها می‌شود، مهار و سبب تحریک زودرس مرحله زایشی شده باشد. همچنین، ممکن است NaHS باعث افزایش سطح گلوکاتینون شده و در نتیجه گیاهان تحت تیمار، سریع‌تر وارد مرحله زایشی شده‌اند (Peer et al. 2021; Shchennikova 2022; Yamaguchi 2021). از آنجایی که مولکول H_2S می‌تواند به صورت علامت (سیگنال) در گیاه فعالیت کند، می‌تواند بطور مستقل و یا در هماهنگی با مولکول‌های دیگر برای تنظیم عملکردهای مختلف گیاهان تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی عمل کند.

با مطالعات انجام شده روی رونوشت ژن‌های *miRNA* مشخص شده است که ارتباط‌هایی بین هیدروژن سولفید و مسیر اکسین وجود دارد که در رشد و افزایش ریشه دخالت می‌کنند (Mishra et al. 2021). در پژوهشی دیگر گزارش شده است که دو سیستمین دسولفیدراز به نام‌های *L-cysteine desulfhydrase* (CDes) و *D-cysteine desulfhydrase*، به‌عنوان مسئول اصلی تخریب سیستمین به‌منظور تولید H_2S شناسایی شدند. با افزایش تنش خشکی، بیان ژن‌های سیستمین دسولفیدراز در گیاه آرابیدوپسیس افزایش یافته و بطور قابل توجهی باعث افزایش تولید H_2S می‌شود و با آبیاری مجدد کاهش می‌یابد. بعلاوه در آرابیدوپسیس، پس از تیمار با NaHS مقاومت بالاتری به تنش خشکی مشاهده شد (Jin et al. 2011). در گندم، H_2S آسیب ناشی از SO_2 را کاهش داده و باعث بهبود تحمل یخ‌زدگی شده است. همچنین، پا سخ آنتی‌اکسیدانی این ترکیب در برابر مس، کروم و سایر تنش‌های اسمزی، در برخی گونه‌ها گزارش شده است (Jin et al. 2011). بر اساس مرور منابع انجام شده، هیچ گزارش منتشر شده‌ای را در مورد اثر هیدروژن سولفید بر گل‌دهی و نیز بیان ژن‌های محرک در گل‌دهی از جمله *API* گزارش

نشده است. بنابراین نیاز به مطالعات بیشتر درباره اثر NaHS روی این مسیرها و ژن‌های موثر می‌باشد؛ در پژوهشی Zhou et al (2012) گزارش کردند که هورمون‌های مورد آزمایش آن‌ها (NO و H₂O₂)، موجب افزایش بیان ژن *LcLFY* در گیاه سرخالوی چینی (*Litchi chinensis*) شد و گذر به مرحله زایشی را تسریع کرد. اما از آن‌جا که ژن *API* در پایین‌دست ژن‌هایی که موجب آغاز گذر به گل‌دهی می‌شوند، قرار دارد، بنظر نمی‌رسد که NaHS تسریع گل‌دهی را از طریق ژن‌های پایین‌دست *API* انجام داده باشد.



شکل ۱۰. مقایسه‌ی میزان بیان نسبی ژن *API* در گیاهان گروه شاهد و تحت اثر NaHS از زمان شروع بیان (مرحله گذر) این ژن تا تشکیل غنچه گل. برای هر آزمایش سه تکرار در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت و $P < 0.05$ بیانگر اختلاف معنی‌دار است. حروف مشابه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارند. ستون‌های سیاه رنگ و هاشورخورده به ترتیب نشان‌دهنده میزان نسبی بیان در نمونه‌های شاهد و تحت تیمار NaHS هستند.

Figure 10. Comparison of relative levels of *API* gene expression in plants of the control and exposed to NaHS since transition phase until the formation of flower bud. Three replicates were considered for each experiment. Means were compared with Duncan's test in $P < 0.05$. Different letters are significant. Black and hatched columns represent the levels of relative gene expression in control and NaHS-treated plants.

نتیجه‌گیری: بیان ژن *API* در بخش‌های مختلف گیاه در مرحله زایشی بررسی شد. نتایج، نشان‌دهنده‌ی بیان این ژن در غنچه‌ی گل، کاسبرگ و گلبرگ و عدم بیان آن در پرچم و مادگی بود. بنابراین این الگوی بیانی می‌تواند تأییدکننده‌ی نقش این ژن، در فرآیند گل‌دهی باشد. به هر حال، در این مرحله هیچ بیانی در ساقه و ریشه مشاهده نشد اگر چه بیان کمی در برگ دیده

شد. همچنین نتایج نشان داد که گیاهان تحت اثر NaHS در حدود هشت روز سریع‌تر از گیاهان شاهد وارد مرحله زایشی شدند و دارای دوره‌ی رویشی کوتاه‌تری بودند. آغاز بیان ژن *API* نیز در گیاهان تحت اثر NaHS زودتر مشاهده شد اما میزان بیان تفاوت معنی‌داری را نشان نداد و بر این اساس می‌توان بیان کرد که NaHS ارتباطی با میزان بیان ژن *API* ندارد و از طریق فعالیت در سایر مسیرهای تنظیمی باعث کوتاه‌کردن دوره‌ی رویشی گیاه و سریع‌تر شدن ورود گیاه به مرحله‌ی زایشی می‌شود.

سپاسگزاران: از معاونت محترم پژوهشی و بخش زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان به خاطر حمایت مالی در

اجرای پژوهش حاضر سپاسگزار می‌شود.

منابع

- رفیعی آزاده، رضائزاد فرخنده (۱۳۹۴) شناسایی، توالی‌یابی و تعیین پروتئین استنباطی ژن هم‌ساخت *APETALA1 (API)* در خردل سیاه (*Brassica nigra*). زیست‌شناسی تکوینی ۷(۳)، ۸-۱.
- زرگری علی (۱۳۷۶) گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران. جلد ۱ صفحه ۲۲۶.
- شکیب علی‌محمد، اینزورث چهرلز (۱۳۸۹) بررسی بیان چهار همسانه ژنی عضو خانواده MADS-box در گیاه دوپایه ترشک (*Rumex acetosa L.*) مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱(۱)، ۱-۱۸.
- گنجعلی‌خانی حاکمی فرزاد، رضائزاد فرخنده، اسدی خانوکی محسن (۱۳۹۹) شناسایی و بررسی بیان ژن هم‌ساخت *CURLY LEAF* طی مراحل نمو اندام‌های رویشی و زایشی در خردل سیاه (*Brassica nigra L.*). پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۳۳(۳)، ۴۵۶-۴۶۷.

References

- Alejandra Mandel M, Gustafson-Brown C, Savidge B, et al. (1992) Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* 360(6401), 273–277.
- Álvarez C, Calo L, Romero LC, et al. (2010) An O-Acetylserine(thiol)lyase Homolog with 1-Cysteine Desulphydrase Activity Regulates Cysteine Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 152(2), 656–669.
- Amasino R (2010) Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J* 61(6), 1001–1013.
- Aroca A, Gotor C, Romero LC (2018) Hydrogen sulfide signaling in plants: emerging roles of protein persulfidation. *Front Plant Sci* 9, 1369.
- Benlloch R, Kim MC, Sayou C, et al. (2011) Integrating long-day flowering signals: A *LEAFY* binding site is essential for proper photoperiodic activation of *APETALA1*. *Plant J* 67(6), 1094–1102.
- Chen J, Wu FH, Wang WH, et al. (2011) Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *J Exp Bot* 62(13), 4481–4493.
- Fang T, Cao Z, Li J, et al. (2014) Auxin-induced hydrogen sulfide generation is involved in lateral root formation in tomato. *Plant Physiol Biochem* 76, 44–51.

- Fotopoulos V, Christou A, Manganaris G (2013) Hydrogen sulfide as a potent regulator of plant responses to abiotic stress factors. In: *Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress*. CRC Press pp. 353–373.
- Ganjalkhani Hakemi F, Rezanejad F, Asadi Khanouki M (2020) Identification and the survey of gene expression *CURLY LEAF* homologous during developmental stages in vegetative and reproductive organs of *Brassica nigra* L. *Cell Mol Res (IJBio)* 33(3), 456–467 (In Persian).
- Guo JL, Yang Q (2008) Molecular cloning and expression analysis of a *LFY* homologous gene from potato. *Plant Mol Biol Rep* 26(4), 324–334.
- Gustafson-Brown C, Savidge B, Yanofsky M (1994) Regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Cell* 76(1), 131–143.
- Irish VF (2010) The flowering of *Arabidopsis* flower development. *Plant J* 61(6), 1014–1028.
- Jin Z, Shen J, Qiao Z, et al. (2011) Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* 414(3), 481–486.
- Kaufmann K, Wellmer F, Muiñ JM, et al. (2010) Orchestration of floral initiation by *APETALA1*. *Science* 328(5974), 85–89.
- Leijten W, Koes R, Roobeek I, et al. (2018) Translating Flowering Time from *Arabidopsis thaliana* to Brassicaceae and Asteraceae Crop Species. *Plants* 7(4), 111.
- Ma X, Zhang Liping, Pei Z, et al. (2021) Hydrogen sulfide promotes flowering in heading Chinese cabbage by S-sulphydration of *BraFLCs*. *Hortic Res* 8(1), 1–11.
- Micol-Ponce R, Sarmiento-Mañús R, Ruiz-Bayón A, et al. (2018) *Arabidopsis* RIBOSOMAL RNA PROCESSING7 Is Required for 18S rRNA Maturation. *Plant Cell* 30(11), 2855.
- Mishra V, Singh P, Tripathi DK, et al. (2021) Nitric oxide and hydrogen sulfide: an indispensable combination for plant functioning. *Trends Plant Sci* 26(12), 1270–1285.
- Okamoto T, Okabe S (2000) Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *Int J Mol Med* 5(6), 657–659.
- Ó'Maoiléidigh DS, Graciet E, Wellmer F (2014) Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. *New Phytol* 201(1), 16–30.
- Peer LA, Bhat MY, Ahmad N, et al. (2021) Floral induction pathways: Decision making and determination in plants to flower-A comprehensive review. *J Appl Biol Biotechnol* 9(2), 7–17.
- Rafie A, Rezanejad F (2015) Identification, sequencing and determination of deduce protein *APETALA1* (*API*) homologous gene in *Brassica nigra*. *Dev Biol* 7(3), 1–8 (In Persian).
- Rajamurugan R, Selvaganabathy N, Kumaravel S, et al. (2012) Polyphenol contents and antioxidant activity of *Brassica nigra* (L.) Koch. leaf extract. *Nat Prod Res* 26(23), 2208–2210.
- Sambrook J, Russell D, Sambrook J (2006) *The condensed protocols: from molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.
- shakib A, insverce C (2011) Expression study of four gene clones belonging to MADS- box family in the dioecious plant sorrel (*Rumex acetosa* L.). *Agric Biotech* 1–17.
- Shchennikova A v. (2022) Photoperiod-Dependent Mechanisms of Flowering Initiation in *Arabidopsis thaliana* L. and *Zea mays* L. *Russ J Plant Physiol* 69(3), 1–11 (In Persian).

- Shiraishi H, Okada K, Shimura Y (1993) Nucleotide sequences recognized by the *AGAMOUS* MADS domain of *Arabidopsis thaliana* in vitro. *Plant J* 4(2), 385–398.
- Soorya S, Sukumaran Swapna T, Krishnan K, et al. (2022) A short review on identification of ABCDE genes in monocot plants. *J Trop Life Sci* 12(3), 423–433.
- Sridhar V, Surendrarao A, Liu Z (2006) *APETALA1* and *SEPALLATA3* interact with *SEUSS* to mediate transcription repression during flower development. *Dev* 133(16), 3159–3166.
- Sundström JF, Nakayama N, Glimelius K, et al. (2006) Direct regulation of the floral homeotic *APETALA1* gene by *APETALA3* and *PISTILLATA* in *Arabidopsis*. *Plant J* 46(4), 593–600.
- Tsaftaris AS, Pasentsis K, Iliopoulos I, et al. (2004) Isolation of three homologous *API*-like MADS-box genes in crocus (*Crocus sativus* L.) and characterization of their expression. *Plant Sci* 166, 1235–1243.
- Turck F, Fornara F, Coupland G (2008) Regulation and identity of florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage. *Annu Rev Plant Biol* 59, 573–594.
- Wang J, Zhang X, Yan G, et al. (2013) Over-expression of the *PaAPI* gene from sweet cherry (*Prunus avium* L.) causes early flowering in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 170(3), 315–320.
- Wang Y, Li L, Cui W, et al. (2012) Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant Soil* 351(1–2), 107–119.
- Wellmer F, Riechmann JL (2010) Gene networks controlling the initiation of flower development. *Trends Genet* 26(12), 519–527.
- Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, et al. (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309(5737), 1056–1059.
- Wilson LG, Bressan RA, Filner P (1978) Light-dependent Emission of Hydrogen Sulfide from Plants. *Plant Physiol* 61(2), 184–189.
- Yamaguchi A, Wu MF, Yang L, et al. (2009) The MicroRNA-Regulated SBP-Box Transcription Factor *SPL3* Is a Direct Upstream Activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1*. *Dev Cell* 17(2), 268–278.
- Yamaguchi N (2021) *LEAFY*, a Pioneer Transcription Factor in Plants: A Mini-Review. *Front Plant Sci* 12, 701406.
- Yamaguchi N, Wu MF, Winter CM, et al. (2013) A Molecular Framework for Auxin-Mediated Initiation of Flower Primordia. *Dev Cell* 24(3), 271–282.
- Zargari A (1997) Medicinal Plants. In: Vol. 1 Tehran University p. 226. (In persian)
- Zhang H, Hu SL, Zhang ZJ, et al. (2011) Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants. *Postharvest Biol Technol* 60(3), 251–257.
- Zhang H, Wang MJ, Hu LY, et al. (2010) Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination under osmotic stress. *Russ J Plant Physiol* 57(4), 532–539.
- Zhou B, Li N, Zhang Z, et al. (2012) Hydrogen peroxide and nitric oxide promote reproductive growth in *Litchi chinensis*. *Biol Plant* 56(2), 321–329.