

Expression pattern and structural analysis of *AGAMOUS-LIKE 6* (*AGL6*) in Iranian garlic clones (*Allium sativum* L.)

Fahimeh Ghaemizadeh 

Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran. E-mail address: f.ghaemizadeh@basu.ac.ir

Farshad Dashti 

*Corresponding author. Associated Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran. E-mail address: fdashti@basu.ac.ir, dashti1350@yahoo.com.

Amir Mousavi 

Associated Professor, Department of Plant Molecular Biotechnology, National institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran. E-mail address: m-amir@nigeb.ac.ir

Abstract **Objective**

Most of the garlic clones are non-bolting and sterile and propagate asexually; however, some of the clones are bolting, and there are some fertile clones among the bolting ones. A correct understanding of the MADS-BOX genes family expression pattern and structure, including *AGL6*, is a valuable project and will improve garlic breeding programs. So far there are no reports relating *AGL6* identification as a flowering and fertility integrator gene in garlic. So the aim of this study is to investigate the relative expression of *AGL6* in Iranian bolting, semi- and non-bolting garlic clones and to identify its structure and nucleotide sequence.

Materials and methods

At first, the relative expression of the *AGL6* was investigated in the different organs of non-bolting, semi-bolting and bolting Iranian garlic clones using quantitative Real time- PCR. Then the isolation and cloning of the *AGL6* partial sequences from the garlic floret was carried out using RT-PCR. The sequence of the recombinant plasmid was evaluated using BLAST, Vector NTI, ORF finder and MEGA6 software.

Results

According to the obtained results, *AGL6* was expressed in the meristem, inflorescence, tepal and carpel of green and purple flowers of the bolting garlic. But there was no sign of its expression in the stamen. *AGL6* expression level in the meristem of bolting garlic was higher than the meristem of the semi-bolting and non-bolting garlic in all sampling stages, especially in the flowering induction stage. *AGL6* was also expressed in the inflorescence of the semi-bolting and bolting garlic, but its expression in the inflorescence of the semi-bolting garlic was 4 times less than the inflorescence of the bolting garlic. Sequence analysis of the colonized fragment showed the coding region with a 728 bp length, which was registered in the NCBI database with the accession number of OK086759.1. This nucleotide sequence encodes a protein with 243 amino acids and has MADS-box and K-box domains. Results showed the high similarity of the sequence obtained in this research with other *AGL6* gene homologues in other plant species, especially petaloid monocots such as onion, lily, narcissus and saffron in NCBI. Hence, the resulting sequence was named *AsAGL6*.

Conclusions

In this research, for the first time, the expression pattern of a key gene of the flowering and fertility pathway (*AsAGL6*) and its nucleotide structure were determined in garlic. The results of this research can be effectively used in the design of classical and molecular garlic breeding programs.

Keywords: Cloning, Fertilization, Flowering, MADS-BOX gene family, Real -Time PCR

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ghaemizadeh F, Dashti F, Mosavi A (2024). Expression pattern and structural analysis of *AGAMOUS-LIKE 6 (AGL6)* in Iranian garlic clones (*Allium sativum* L.). *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (1), 155-174.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (1), 155-174. DOI: 10.22103/jab.2023.20915.1452

Received: October 27, 2023.

Received in revised form: December 27, 2023.

Accepted: December 28, 2023.

Published online: February 20, 2024.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant




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


© the authors

بررسی الگوی بیان و ساختار ژن *AGAMOUS-LIKE 6 (AGL6)* در همگروه‌های

سیر ایرانی (*Allium sativum* L.)

فهیمة قائمی‌زاده 

استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران. رایانامه: f.ghaemizadeh@basu.ac.ir

فرشاد دشتی 

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران. رایانامه:

dashti1350@yahoo.com, fdashti@basu.ac.ir

امیر موسوی 

دانشیار، گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران. رایانامه: m-

amir@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۱۰/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۷

چکیده

هدف: اکثر کلون‌های سیر، غیر گلده و عقیم بوده و به صورت غیرجنسی تکثیر می‌شوند؛ با این حال برخی از کلون‌ها گلده بوده و انواع زایا تا حدودی در بین آن‌ها یافت می‌شود. درک صحیح از الگوی بیان و ساختار ژن‌های خانواده ژنی MADS-BOX از جمله ژن *AGL6* در گیاه سیر از ارزش بالایی برخوردار بوده و می‌تواند روند برنامه‌های اصلاحی آن را بهبود ببخشد. تاکنون پژوهشی مبنی شناسایی این ژن موثر در گلدهی و باروری سیر صورت نگرفته است. لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی الگوی بیان نسبی ژن *AGL6* در همگروه گلده، نیمه گلده و غیر گلده سیر ایرانی و شناسایی ساختار و توالی نوکلئوتیدی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بدین منظور، ابتدا بیان نسبی این ژن در اندام‌های مختلف همگروه‌های گلده، نیمه گلده و غیر گلده سیر ایرانی و با استفاده از روش RT-PCR کمی بررسی شد. سپس بخشی از توالی کد کننده ژن *AGL6* با استفاده از روش مذکور از بافت گلچه‌های سیر گلده جداسازی و همسانه‌سازی شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی و آنالیز همسانه‌های نو ترکیب با استفاده از نرم افزارهای Vector NTI, BLAST و ORF finder و MEGA6 مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: بر اساس نتایج بدست آمده، *AGL6* در مریستم، گل آذین، تپال و برچه گلچه های سبز و ارغوانی سیر گلده بیان شد. اما اثری از بیان این ژن در پرچم دیده نشد. سطح بیان آن در مریستم سیر گلده در تمامی مراحل نمونه برداری و به ویژه مرحله القا گلدهی بالاتر از مریستم سیر نیمه و غیر گلده بود. *AGL6* در گل آذین سیر نیمه گلده نیز بیان شد اما بیان آن در این مرحله نیز در مقایسه با گل آذین سیر گلده ۴ برابر کمتر بود. نتایج توالی یابی قطعه همسانه سازی شده، وجود ناحیه کدکننده به طول ۷۲۸ جفت باز را نشان داد که با کد دسترسی OK086759.1 در پایگاه NCBI ثبت گردید. این توالی نوکلئوتیدی یک پروتئین با ۲۴۳ اسید آمینه را کد می کند و دارای دومین های MADS-box و K-box می باشد. بررسی ها بیانگر تشابه بالا و همپوشانی زیاد این توالی با سایر همولوگ های ژن *AGL6* در سایر گونه های گیاهی و بویژه تک لپه ای های پتالوئیدی نظیر پیاز، لیلیوم، گل نرگس، زعفران در NCBI بود؛ از این رو توالی حاصل *AsAGL6* نامیده شد.

نتیجه گیری: در این پژوهش برای اولین بار الگوی بیان یک ژن کلیدی مسیر گلدهی و باروری (*AsAGL6*) و ساختار نوکلئوتیدی آن در گیاه سیر مشخص شد. نتایج بدست از این تحقیق می تواند به طور موثری در طراحی برنامه های اصلاحی کلاسیک و مولکولی سیر مورد استفاده قرار گیرند.

کلیدواژه ها: باروری، خانواده ژنی MADS-BOX، کلونینگ، گلدهی، Real-Time PCR.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: قائمی زاده فهیمه، دشتی فرشاد، موسوی امیر (۱۴۰۳) بررسی الگوی بیان و ساختار ژن *AGL6* (*AGAMOUS-LIKE 6*) در همگروه های سیر ایرانی (*Allium sativum* L.). مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۶(۱)، ۱۵۵-۱۷۴.

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



© the authors

مقدمه

سیر (*Allium sativum* L.) گیاهی با ارزش دارویی و اقتصادی فراوان و از خانواده *Amaryllidaceae* است. بیشتر گیاهان جنس آلیوم به صورت وحشی در ایران، توران و منطقه مدیترانه که دارای زمستان نسبتاً سرد و تابستان داغ و خشک هستند، رشد یافته اند. تنوع بالای سیر در آسیای مرکزی نشان می دهد که این ناحیه مرکز اولیه و منشأ سیر بوده است (Kamenetsky et al. 2007). اگرچه سیر معمولاً غیر بارور بوه و به صورت غیر جنسی تکثیر می شود، اما تنوع کشاورزی و مورفولوژیکی گسترده ای در ویژگی هایی مانند رنگ و اندازه سوخ، ارتفاع گیاه، گلدهی، رنگ گل، تعداد و اندازه سیرچه، نمو سوخیزه هوایی در گل آذین و باروری متناسب با شرایط آگرو کليماتیک نشان می دهد (Simon & Jenderek 2003). بر این اساس همگروه های مختلف سیر

به سه دسته گلده، نیمه گلده و غیر گلده تقسیم می‌شوند. در سیر غیر گلده بولتینگ صورت نگرفته و ساقه گلدهنده تشکیل نمی‌شود. در سیر نیمه گلده به دلیل بولتینگ ناقص ساقه گلدهنده بسیار کوتاه و دارای گل آذین بسیار کوچکی می‌باشد. در گل آذین نیز به جای تشکیل گلچه، ساختارهای پراکنده مانند تشکیل می‌شود. در سیر گلده بولتینگ کامل بوده و ساقه گلدهنده حاوی گل آذین و گلچه می‌باشد (Takagi 1990; Kamenetsky et al. 2004). با این حال تمام ارقام تجاری سیر عقیم بوده و به صورت غیرجنسی تکثیر می‌شوند (Brewster 2008) تکثیر غیر جنسی در سیر منجر به تولید محصول یکنواخت و حفظ صفات کیفی گیاه می‌شود، اما دارای معایبی مانند محدودیت در برنامه‌های اصلاحی و مطالعات ژنتیکی می‌باشد (Kamenetsky et al. 2004). لذا، شناسایی انواع گلده و درک صحیح از ساختار و نقش ژن‌های کنترل کننده گلدهی در بازگرداندن قابلیت گلدهی و باروری به سیر و بهبود برنامه‌های اصلاحی آن اهمیت فراوانی دارد. گلدهی در گیاهان شامل یکسری مراحل پیوسته است که بوسیله چندین گروه ژنی کنترل می‌شود. اغلب این گروه‌های ژنی از خانواده‌ی ژنی MADS-BOX می‌باشند که به صورت پیوسته و در همکاری متقابل، بیان یکدیگر را تنظیم کرده و گلدهی را منجر می‌شوند (Medard & Yanofsky 2001; Glover 2007). ژن‌های مسیر گلدهی شامل ژن‌های کنترل کننده زمان گلدهی (نظیر *Flowering locus T*)، ژن‌های هویت مریستم (نظیر *LEFEAY*) و ژن‌های هویت اندام گل مجموعه ژن‌های مدل (ABCDE) می‌باشند که به ترتیب القا گلدهی، تشکیل مریستم منفرد گل و تشکیل اندام‌های گل را منجر می‌شوند. ژن‌های مسیر گلدهی در برخی گیاهان نیز عملکرد چندگانه داشته و چندین مسیر را کنترل می‌کنند. ژن *AGL6* از خانواده ژنی MADS-BOX و زیرخانواده MIKE-type بوده و بسیاری از مراحل گلدهی در گیاهان را کنترل می‌کند. از نظر ساختاری بالاترین تشابه را با کلاس ژنی E نظیر *SEP* دارد. بیان این ژن علاوه بر مراحل تشکیل مریستم گل منفرد، در اندام‌های رویشی و زایشی گل نیز گزارش شده و در تشکیل گامت‌های نر و ماده موثر است (Dreni & Zhang 2016). در آرابیدوپیس، *AGL6* از دو مسیر جداگانه منجر به القای گلدهی می‌شود. *AGL6* هم از طریق توقف بیان ژن *FLC* (بازدارنده بیان ژن‌های محرک زمان گلدهی) و هم از طریق افزایش بیان *FT* در مسیر فوتوپریودیسم، گلدهی در آرابیدوپیس را القا می‌کند (Yoo et al. 2011). همولوگ *AGL6* در ارکید در انتقال گیاه به فاز زایشی و تشکیل مریستم گل موثر بوده و به طور قابل توجهی در برجه بیان می‌شود (Hsu et al. 2003). در گندمیان *AGL6* به عنوان ژن هویت مریستم گل باعث تشکیل مریستم گل منفرد شده و به عنوان ژن هویت اندام گل در تشکیل لودیکول، پالنا و تخمک موثر است (Reinheimer & Kellogg 2009). تاکنون پژوهش‌هایی در ارتباط با برخی از ژن‌های کنترل کننده مسیر گلدهی در سیر صورت گرفته است. در سیر *gaLFY* شناسایی و نقش آن به عنوان یک ژن محرک زمان گلدهی و ژن هویت مریستم گل در یک ژنوتیپ گلده مشخص شده است (Rotem et al. 2011). در پژوهشی دیگر Kamenetsky et al. (2015) بر اساس نتایج RNA sequencing (RNA seq) و آنالیزهای بیوانفورماتیکی به بررسی و یافتن توالی‌های رونوشت ژن‌های مرتبط با گلدهی در اندام‌های رویشی و زایشی یک ژنوتیپ گلده سیر پرداختند. الگوی بیان ژن‌های مدل ABCDE به عنوان ژن‌های موثر در تشکیل اندام‌های گل در سیر گلده و ژن‌های *AsFT* و *gaLFY* به عنوان

ژن‌های محرک زمان گلدهی در اندام‌های مختلف برخی از همگروه‌های سیر ایرانی نیز مشخص شده است (Ghaemizadeh et al. 2018, 2019). با این حال شناسایی و بررسی ویژگی ساختاری *AGL6* به عنوان ژنی که علاوه بر مسیر گلدهی بر باروری گل‌های سیر نیز موثر باشد تاکنون صورت نگرفته است. به‌علاوه، مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم بیان ژن‌ها) هستند (Barazandeh et al. 2016a; Safaei et al. 2022). DNA یک سلسول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است، اما هیچ‌گاه همه به طور همزمان بیان نمی‌شوند. به طوری‌که در هر لحظه فقط تعداد کمی از آن‌ها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Barazandeh et al. 2016b). تنظیم بیان ژن (بیان ژن یا خاموش و غیر فعال شدن بیان ژن) وابسته مرحله نمو و شرایط محیطی است که موجود در آن رشد می‌کند (Masoudzadeh et al. 2020; Bordbar et al. 2022; Jafari Ahmadabadi et al. 2023). بنابراین، یکی از اقدامات اساسی در به‌نژادی ملکولی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آن‌ها در سطح سلولی است (Mohammadinejad et al. 2022; Shahsavari et al. 2022). در مجموع با توجه به اهمیت نقش *AGL6* در کنترل بسیاری از مراحل گلدهی تک‌لپه‌ای‌ها، بیان نسبی این ژن در همگروه‌های مختلف گلده، نیمه گلده و غیر گلده سیر ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به دلیل بیان بالای این ژن در برچه و تخمک و نقش احتمالی آن در باروری، جداسازی و همسانه‌سازی *AGL6* با هدف تعیین ساختار و ویژگی‌های آن در سیر گلده صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

بررسی بیان نسبی ژن *AsAGL6* در همگروه‌های سیر - 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 جمع‌آوری و در اواسط آبان ماه در مزرعه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا کشت شدند. نمونه‌گیری از مریستم انتهایی هر سه همگروه به صورت ماهیانه از آذر همان سال تا فروردین سال بعد، گل آذین در سیر گلده و نیمه گلده در اردیبهشت سال بعد، گلچه کامل سبز و ارغوانی و اندام‌های گل نظیر تپال، پرچم و برچه سیر گلده در دو مرحله (سبز تیره و ارغوانی) در ماه‌های خرداد و تیر سال بعد در دو تکرار بیولوژیکی صورت گرفت.

Real-Time PCR: RNA کل از بافت گیاهی و با استفاده از کیت تجاری innuPREP (Analytik Jena، آلمان)

استخراج شد. غلظت RNA بر حسب نانوگرم در میکرولیتر پس از هر استخراج، با استفاده از دستگاه نانودرآپ Thermo Scientific (مدل ۲۳۰۰، آمریکا) و در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین گردید. جهت ارزیابی کیفی RNA استخراج شده از روش الکتروفورز RNA روی ژل آگارز یک 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 oligo d(T) صورت گرفت. 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. بدین منظور آغازگر رفت با توالی 5'-TTGGAAGTGTTCACG و آغازگر برگشت با توالی 5'-TACCAGCTCTGTGTTTCACG، با استفاده از نرم افزار Oligo 7 طراحی شدند. از ژن رمزکننده *Actin* (Shalom et al. 2015) به عنوان ژن مرجع استفاده شد. مخلوط واکنش شامل مستر میکس (1x) SYBR green (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۱۰۰ نانوگرم cDNA، ۰/۵ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. برنامه دمایی به صورت ۴۰ چرخه شامل ۵ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۲۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و ۲۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. واکنش‌ها در دو تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی انجام و در هر آزمایش یک کنترل منفی (بدون cDNA) در نظر گرفته شد. در نهایت میزان بیان نسبی ژن با روش $\Delta\Delta CT$ و نرم افزار REST® محاسبه گردید (Livak & Schmittgen 2001; Pfaffl et al. 2002).

جداسازی و همسانه سازی-بررسی‌های بیوانفورماتیکی و طراحی آغازگر: برای طراحی آغازگر، از توالی‌های

کامل ژن *AGL6* در گیاهان تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای ثبت شده در NCBI استفاده شد. بدین منظور ابتدا همردیف‌سازی چندگانه برای توالی‌های کد کننده این ژن در گیاهان مختلف با استفاده از برنامه Clustal W انجام شد. سپس نواحی حفاظت شده در گیاهان مشخص و طراحی آغازگر بر اساس این نواحی صورت گرفت. همچنین در طراحی آغازگر وجود کدون آغاز در آغازگر رفت و کدون خاتمه در آغازگر برگشت در نظر گرفته شد. در نهایت با استفاده از نرم افزار Oligo 7 آغازگر رفت با توالی 5'-CTATGGGAAGGGGAAGAGTTGA و آغازگر برگشت با توالی 5'-TTAAAGAGCCCAACCCAGCATG، به منظور تکثیر قطعه ۷۲۸ جفت بازی طراحی شدند.

جداسازی و همسانه‌سازی محصول واکنش RT-PCR: بدین منظور ابتدا استخراج RNA و ساخت cDNA از

گلچه سیر مطابق بخش ۲، ۱، ۲، انجام شد. به منظور تکثیر بخشی از ژن *AGL6*، واکنش زنجیره ای پلیمرز روی محصول cDNA و با استفاده از آغازگرهای طراحی شده (بخش ۲، ۲، ۱) صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرومولار PCR مستر میکس (1x) (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۱۰۰ نانوگرم cDNA، ۰/۵ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. برنامه دمایی به صورت ۳۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. در نهایت الکتروفور محصول واکنش PCR روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد و تخلیص محصول با استفاده از کیت تجاری GF-1 (Vivantis، مالزی) طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده صورت گرفت. فرایند اتصال (Ligation) برای محصول حاصل از واکنش PCR، در پلاسمید pTG19-T، مطابق کیت تجاری. PCR Cloning Vector (Vivantis، مالزی) انجام شد. سپس تراریختی باکتری *E. coli* سویه DH5 α با روش

ارایه شده توسط Sambrook & Russell (2001) صورت گرفت. غربالگری بر اساس PCR کلونی برای جداسازی کلونی‌های مثبت (حاوی ژن مورد نظر) صورت گرفت. سپس استخراج پلاسمید از کلونی‌های مثبت با روش دستی ارائه شده توسط Sambrook & Russell (2001) با کمی تغییرات انجام شد. غربالگری پلاسمید نوترکیب بر اساس واکنش PCR و تایید قطعه هدف نیز صورت گرفت.

جداسازی و همسانه سازی-توالی‌یابی پلاسمید نوترکیب و شناسایی ساختار بخش توالی‌یابی شده: به

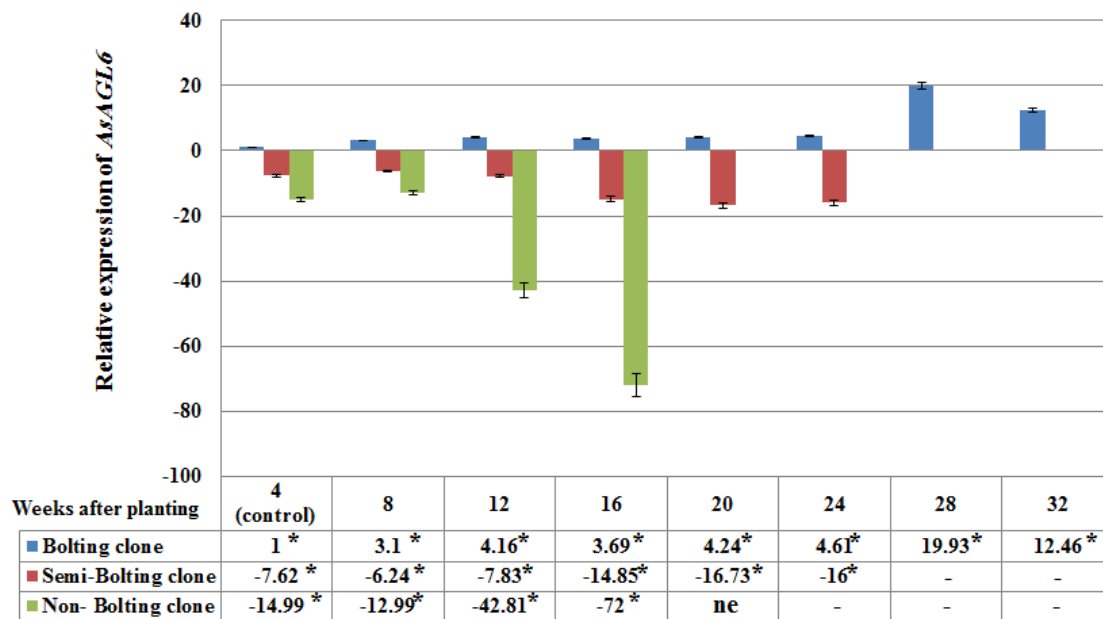
منظور تعیین توالی بخشی از رونوشت ژن مورد نظر، ۲۰ میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب به همراه آغازگرهای عمومی رفت و برگشت M13 توسط شرکت داخلی تکاپوزیست به شرکت Bioneer در کره جنوبی ارسال شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی پلاسمید در هر دو جهت رفت و برگشت با استفاده از نرم افزار Vector NTI سرهم و نواحی مشترک حذف شد. به منظور تعیین چهارچوب باز خوانی (ORF) در توالی بدست آمده، از نرم افزار برخط ORF Finder به آدرس اینترنتی www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html استفاده شد. توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی بدست آمده در این تحقیق با نرم افزار برخط BLAST واقع در پایگاه اطلاعاتی NCBI همردیف سازی و ویژگی‌های ساختاری آن‌ها مشخص گردید. در نهایت بر اساس توالی پروتئین استنباطی این ژن که *AsAGL6* نامیده شده با سایر همسانه‌های ژن *AGL6* در گونه‌های دیگر، درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA6 رسم شد.

نتایج و بحث

بیان نسبی *AsAGL6*: در این پژوهش مریستم سیر گلده در ۴ هفته پس از کاشت (ماه اول از ابتدای آزمایش) به عنوان

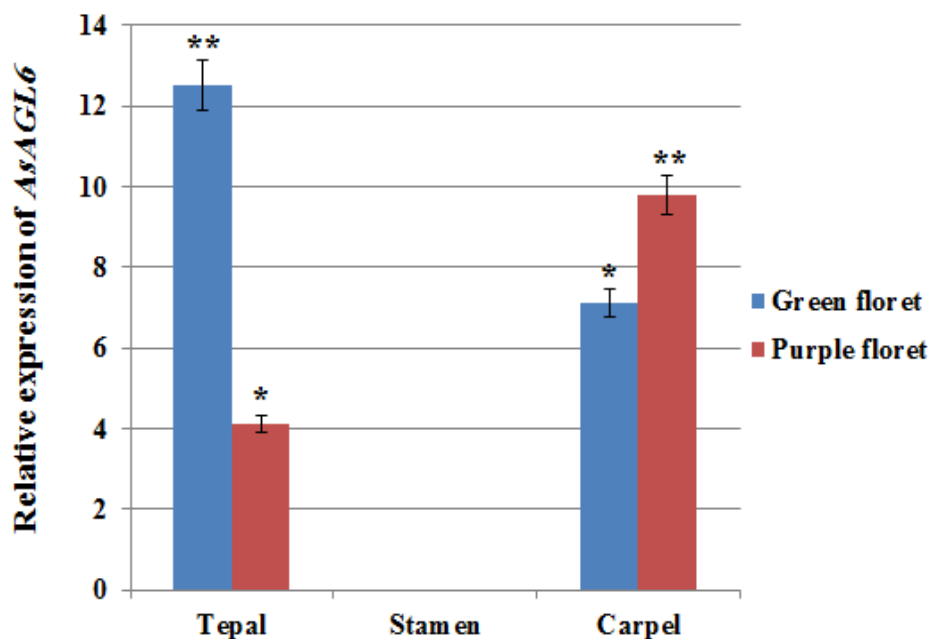
شاهد در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج بدست آمده، بیان نسبی ژن *AsAGL6* طی القا گلدهی و تبدیل مریستم رویشی به زایشی (۸ تا ۲۰ هفته پس از کاشت) در مریستم سیر گلده به طور معنی‌داری افزایش یافت. افزایش بیان نسبی *AsAGL6* در گل آذین و مرحله تمایز یابی گلچه‌ها و اندام‌های گل (۲۴ هفته پس از کاشت) نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۱)؛ اما بالاترین میزان بیان نسبی در گلچه‌ها طی ۲۴ و ۳۲ هفته پس از کاشت (به ترتیب ۱۹/۹۳ و ۱۲/۴۶) صورت گرفت (شکل ۱). بررسی بیان *AsAGL6* در اندام‌های رویشی و زایشی گلچه‌ها نیز نتایج جالبی را نشان داد. *AsAGL6* به طور معنی‌داری در تپال و برچه بیان شد اما اثری از بیان این ژن در پرچم دیده نشد. بیان نسبی *AsAGL6* در تپال گلچه سبز ۱/۷۸ برابر از تپال گلچه ارغوانی بالاتر بود در حالیکه بیان آن در برچه گلچه ارغوانی ۲/۵ برابر برچه گلچه سبز بود (شکل ۲). الگوی بیان نسبی *AsAGL6* در سیر نیمه گلده و غیر گلده در شکل ۱ نشان داده شده است. *AsAGL6* در مریستم سیر نیمه گلده طی القا گلدهی و تبدیل مریستم رویشی به زایشی (۸ تا ۲۰ هفته پس از کاشت) بیان شد. اما بیان آن در تمامی مراحل در مقایسه با سیر گلده به مراتب کمتر بود. *AsAGL6* در گل آذین سیر نیمه گلده نیز بیان شد اما در این مرحله نیز در مقایسه با گل آذین سیر گلده بیان کمتری داشت (۴ برابر کمتر بود). روند

بیان نسبی *AsAGL6* در مریستم سیر غیر گلده در مقایسه با سیر گلده و نیمه گلده روند کاهشی داشت. در تمامی زمان‌های مورد بررسی این ژن در مریستم بیان شد اما بیانی به مراتب کمتر از سیر گلده و نیمه گلده داشت. اثری از بیان ژن در مریستم سیر غیر گلده در ۲۰ هفته پس از کاشت مشاهده نشد. کمترین میزان بیان نیز در ۱۶ هفته پس از کاشت صورت گرفت که به ترتیب ۲۰ و ۴/۸۴ برابر کمتر از سیر گلده و نیمه گلده بود.



شکل ۱. بیان نسبی ژن *AsAGL6* در اندام‌های مختلف سیر گلده، نیمه گلده و غیر گلده. نمونه شاهد (مرحله رشد رویشی)، نمونه‌های ۸ تا ۲۰ هفته پس از کاشت مربوط به مرحله تشکیل مریستم زایشی، ۲۴ هفته پس از کاشت مربوط به مرحله گل‌آذین و نمونه‌های ۲۸ و ۳۲ هفته پس از کاشت به ترتیب مربوط به گلچه‌های سبز و ارغوانی می‌باشند. خط تیره نشان دهنده عدم تشکیل اندام گیاه جهت ارزیابی، ne عدم بیان ژن، * و ** به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد می‌باشند

Figure 1. Relative expression of *AsAGL6* in different organs of bolting, semi-bolting and none-bolting garlic clones. Control (Vegetative phase), 8 to 20 weeks after planting samples are reproductive meristem, 24 weeks after planting samples are inflorescence and 28-32 weeks after planting are green and purple flowers.(- shows that organ was not form to evaluate, ne: shows that gene wasn't expressed in the organ, ** and * show that results are significant at the 0.01 and 0.05 levels respectively)



شکل ۲. بیان نسبی *AsAGL6* در اندام های مختلف تپال، پرچم و کارپل (برچه) سیر گلده. * و ** به ترتیب نشان دهنده معنی داری در سطح ۵ و ۱ درصد می باشند. نمونه شاهد، مریستم سیر گلده در ۴ هفته پس از کاشت می باشد

Figure 2. Figure 1. Relative expression of *AsAGL6* in tepal, stamen and carpel of bolting garlic. ** and * show that results are significant at the 0.01 and 0.05 levels respectively. Control, meristem of bolting garlic 4 weeks after planting)

پژوهش های متفاوتی در ارتباط با نقش *AGL6* در تکلیف های آنها و دولپه ای ها صورت گرفته است. در آراییدوبسیس، بیان *AGL6* پس از مواجهه با نور به عنوان محرک گلدهی به طور قابل توجهی در مریستم افزایش می یابد (Koo et al. 2010). در اרקیده، این ژن در انتقال گیاه به فاز زایشی و تشکیل مریستم گل موثر بوده است (Hsu et al. 2003). در پژوهش حاضر نیز بیان این ژن ۸ تا ۲۰ هفته پس از کاشت در مریستم گلده افزایش یافت. بر اساس گزارش Rotem و همکاران (2011)، در این زمان القا گلدهی و تبدیل مریستم رویشی به زایشی سیر صورت می گیرد. در مرحله القا گلدهی، *AsAGL6* هم در مریستم سیر نیمه گلده و هم غیر گلده بیان شد. اما بیان آن ها بسیار کمتر از سیر گلده بود. همگروه های مختلف سیر از لحاظ نمو زایشی و گلدهی با یکدیگر متفاوت هستند (Abbasifar 2014). این تفاوت می تواند به دلیل الگوی متفاوت در بیان مجموعه ای از ژن های کنترل کننده گلدهی باشد. بر پایه این نتایج به نظر می رسد در مریستم سیر غیر گلده، انتقال به فاز زایشی صورت می گیرد، اما بولتینگ صورت نگرفته و ساقه گلدهنده خارج نمی شود. در سیر نیمه گلده نیز یکی از دلایل بولتینگ ناقص می تواند به دلیل پایین بودن بیان

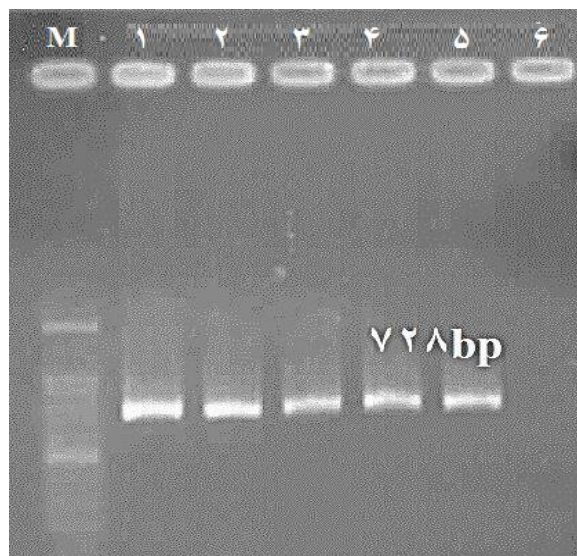
ژن *AsAGL6* باشد. مقایسه بیان *galFY* در همگروه‌های گلده، نیمه و غیر گلده سیر نیز نشان داده است که کاهش بیان این ژن طی القا گلدهی می‌تواند از بولنتینگ جلوگیری کند (Ghaemizadeh et al. 2018). در پژوهش حاضر، بیان نسبی *AsAGL6* در گل‌آذین نابالغ نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت و در گلچه‌ها به بالاترین میزان خود رسید. در سیر، آغاز تمایز یابی اندام‌های گل ۲۴ هفته پس از کاشت آن و در گل‌آذین صورت می‌گیرد (Rotem et al. 2011). با توجه به بیان *AsAGL6* در گل‌آذین و گلچه‌های سیر به نظر می‌رسد که عملکرد این ژن در تشکیل اندام‌های گل نیز موثر باشد. این نتایج با یافته‌های سایر محققان مبنی بر نقش این ژن در تشکیل اندام‌های زایشی گل در آراییدوبسیس، برنج و ارکیدها نیز همخوانی دارد (Li et al. 2010; Hsu et al. 2003; Koo et al. 2010). بیان نسبی *AsAGL6* در گل‌آذین سیر نیمه گلده از سیر گلده بسیار کمتر بود. تشکیل ساختارهای براکنه در گل‌آذین و عدم تشکیل گلچه در سیر نیمه گلده نیز می‌تواند به دلیل کاهش بیان ژن‌های موثر در گلدهی باشد (Ghaemizadeh et al. 2018). *AGL6* علاوه بر القا گلدهی در تشکیل اندام‌های گل نیز موثر است. نقش این ژن در تشکیل تخمک و باروری در گیاهان مختلف مشخص شده است. این ژن به طور قابل توجهی در اندام‌های رویشی گل، برچه و تخمک بیان می‌شود. در گندمیان، *AGL6* در تشکیل لودیکول، پالنا و تخمک موثر است (Reinheimer & Kellogg 2009). در تک لپه‌ای‌های پتالوتیدی نظیر ارکیدها، ژن مذکور به طور قابل توجهی در برچه بیان می‌شود (Hsu et al. 2003). در پژوهش حاضر، این ژن در اندام رویشی و برچه سیر گلده بیان شد. که با نتایج نامبردگان مطابقت دارد. همچنین بیان بالای آن بویژه در برچه گلچه ارغوانی می‌تواند به دلیل نقش احتمالی آن در نمو تخمک در مراحل انتهایی گلدهی باشد.

همسانه سازی ژن *AsAGL6* – غربالگری پلاسمیدهای نو ترکیب: نتایج بدست آمده از الکتروفورز محصول PCR

روی cDNA حاصل از پلاسمیدهای نو ترکیب حاوی ژن *AsAGL6* در شکل ۳ نشان داده شده است. وجود قطعه‌ی تکثیری به طول ۷۲۸ جفت باز نشان از غربالگری مثبت پلاسمید نو ترکیب می‌باشد.

بررسی توالی نوکلئوتیدی، آمینواسیدی و موتیف‌های ساختاری ژن *AsAGL6*: نتایج توالی‌یابی و بررسی با

برنامه BLAST نشان داد که قطعه همسانه‌سازی شده در جهت اصلی، کدکننده ژن *AGL6* می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی بدست آمده به طول ۷۲۸ جفت باز بوده و با کدون آغاز ATG شروع و با کدون پایانی TAG خاتمه می‌یابد. همچنین توالی نوکلئوتیدی بدست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI با کد دسترسی OK086759 ثبت گردید. توالی نوکلئوتیدی حاصل، ۹۹ درصد تشابه با توالی نوکلئوتیدی *AGL6* در گیاه پیاز (*Allium cepa* L.) متعلق به تیره نرگسیان (*Amaryllidaceae*) داشت. نتایج حاصل، با توالی های نوکلئوتیدی ژن همسان *AGL6* در سایر تک‌لپه‌ای‌های پتالوتیدی نظیر لیلیوم، گل نرگس و زعفران نیز تشابه بالای ۹۰ درصد را نشان داد (شکل ۴).



شکل ۳. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نوترکیب روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک های ۱ تا ۵، تکثیر قطعه ۷۲۸ جفت بازی که مربوط به رونوشت ژن *AsAGL6* است؛ چاهک ۶، کنترل منفی شامل ناقل پلاسمیدی غیرنوترکیب؛ M، نشانگر وزنی 1kb (Fermentas)

Figure 3. Electrophoresis of recombinant plasmid PCR product on 1% agarose gel. Lanes 1-5 present amplification of the 728 bp fragment corresponding to *AsAGL6* gene and lane 6 presents negative control of non-recombinant plasmid vector; M, weight marker 1kb (Fermentas)

Description	Scientific Name	Query Cover	E value	Accession
Allium sativum AGL6-like MADS-box protein (AGL6) mRNA, complete cds	Allium sativum	100%	0.0	OK086759.1
Allium cepa AGL6-like MADS-box protein (AGL6) mRNA, complete cds	Allium cepa	99%	0.0	KF170021.1
Asparagus officinalis MADS box protein (AOM3) mRNA, complete cds	Asparagus offici...	99%	1e-168	AY383559.1
Narcissus tazetta var. chinensis MADS box protein mRNA, complete cds	Narcissus tazett...	99%	4e-161	EU081900.1
Agapanthus praecox ApMADS3 mRNA for MADS-box transcription factor SEP1, complete cds	Agapanthus pra...	99%	1e-160	AB079261.1
Hippeastrum hybrid cultivar Jewel AGL6-like protein 1 (AGL6.1) mRNA, complete cds	Hippeastrum hy...	99%	2e-159	OK042267.1
Narcissus tazetta var. chinensis MADS-box protein mRNA, complete cds	Narcissus tazett...	99%	6e-159	EF517294.1
Hyacinthus orientalis MADS-box protein (AGL6) mRNA, complete cds	Hyacinthus orie...	99%	2e-152	AY591333.1
Bambusa oldhamii MADS-box protein mRNA, complete cds	Bambusa oldhamii	99%	2e-151	EF517293.1
Phyllostachys edulis MADS-box protein mRNA, complete cds	Phyllostachys e...	99%	3e-150	EU327784.1
Crocus sativus MADS-box transcription factor AGL6b (AGL6b) mRNA, complete cds	Crocus sativus	99%	2e-145	EF041506.1
Crocus sativus MADS-box transcription factor AGL6a (AGL6a) mRNA, complete cds	Crocus sativus	99%	8e-145	EF041505.1

شکل ۴. نتایج حاصل از همردیفی توالی نوکلئوتیدی ژن *AsAGL6* با سایر توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در پایگاه NCBI

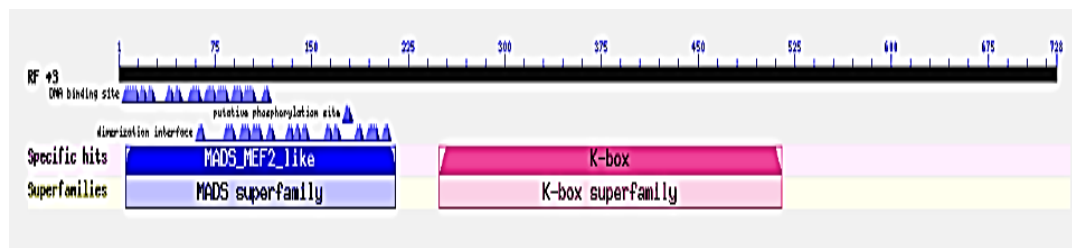
Figure 4. The results of *AsAGL6* gene nucleotide sequence aligning with other nucleotide sequences available in the NCBI database

بررسی توالی اسیدآمینهای نشان داد که بخشی از ژن *AsAGL6* به طول ۷۲۸ جفت باز، یک پروتئین به طول ۲۴۳ اسید آمینه را کد می‌کند. جستجو از طریق BLAST توالی پروتئینی بدست آمده با سایر توالی بدست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان داد که توالی حاضر دارای درصد تشابه بالای ۹۹ درصد با توالی پروتئینی مربوط به ژن همسان *AGL6* در تک لپه‌ای‌هایی نظیر پیاز، لیلیوم، گل نرگس، زعفران، آناناس و مارچوبه دارد (شکل ۵). نتایج همچنین نشان داد که توالی پروتئینی *AsAGL6* همانند سایر پروتئین‌های ژن همسان *AGL6*، دومین‌های پروتئینی حفاظت شده‌ای دارد. نوکلئوتیدهای ۷ تا ۱۹۷ کد کننده دومین MADS-box و نوکلئوتیدهای ۲۴۳ تا ۵۰۹ کد کننده دومین Keratin-like K-box می‌باشند (شکل های ۶ و ۷). این ساختار بدست آمده در مورد ژن *AsAGL6* در سیر با ساختار ژن همسان *AGL6* در سایر گیاهان، مشابه بود به طوری که در آن‌ها نیز ابتدا دومین MADS-box و سپس دومین K-box وجود دارد (شکل ۸). بر اساس نتایج حاصل از درخت فیلوژنی، توالی *AsAGL6* در سیر با پیاز که هر دو متعلق به جنس *Allium* بوده و در خانواده *Amaryllidaceae* قرار دارند بالاترین میزان شباهت و قرابت ژنتیکی را نشان داد (شکل ۹). درخت فیلوژنی، تشابه بالای توالی پروتئینی *AsAGL6* را با توالی پروتئین ژن همسان *AGL6* در سایر تک لپه‌ای‌های پتالوئیدی نیز نشان داد. همچنین تمام گیاهان قرار گرفته در گروهی که *Allium sativum* در آن قرار داشتند متعلق به راسته *Asparagales* بودند. درحالی‌که با پروتئین ژن همسان *AGL6* در گونه‌های گیاهی متعلق به *Magnoliales* در دو گروه متفاوت قرار گرفتند (شکل ۹).

Description	Scientific Name	Query Cover	E value	Accession
AGL6-like MADS-box protein [Allium sativum]	Allium sativum	99%	4e-179	UVH33477.1
AGL6-like MADS-box protein [Allium cepa]	Allium cepa	99%	8e-169	AGV31154.1
AGL6-like protein 1 [Hippeastrum hybrid cultivar]	Hippeastrum hybrid cultivar	99%	2e-148	UYD62371.1
MADS box protein [Asparagus officinalis]	Asparagus officinalis	99%	1e-146	AAQ83835.1
MADS-box transcription factor AGL6a [Crocus sativus]	Crocus sativus	99%	3e-144	ABK35281.1
MADS box protein [Narcissus tazetta subsp. chinensis]	Narcissus tazetta subsp. chinensis	99%	4e-144	ABX47015.1
MADS-box protein [Narcissus tazetta subsp. chinensis]	Narcissus tazetta subsp. chinensis	99%	4e-144	ABS82744.1
MADS-box protein [Hyacinthus orientalis]	Hyacinthus orientalis	99%	6e-143	AAT88088.1
MADS-box protein [Bambusa oldhamii]	Bambusa oldhamii	99%	7e-143	ABS82743.1
MADS-box transcription factor [Ananas comosus]	Ananas comosus	99%	3e-142	AGG68164.1
MADS-box transcription factor AGL6b [Crocus sativus]	Crocus sativus	99%	1e-141	ABK35282.1
MADS-box transcription factor 6-like [Ananas comosus]	Ananas comosus	99%	1e-141	XP_020084133.1
MADS-box transcription factor 6 [Phoenix dactylifera]	Phoenix dactylifera	99%	2e-141	XP_008797646.1

شکل ۵. نتایج حاصل از هم ردیفی اسیدآمینهای قطعه تکثیر شده برای ژن *AsAGL6* با سایر توالی‌های پروتئینی موجود در پایگاه NCBI

Figure 5. The results of *AsAGL6* amino acid with other protein sequences available in the NCBI database



شکل ۶. ساختار شماتیک از دومین های حفاظت شده در پروتئین *AsAGL6*

Figure 6. Schematic structure of conserved domains in *AsAGL6* protein

1 ATG GGA AGG GGA AGA GTT GAA CTG AAA AGA ATT GAG AAC AAG ATT AAC AGA CAA GTT ACT TTC TCG AAA AGA AGA AAC GGT TTG TTA AAG AAA
Met Gly Arg Gly Arg Val Glu Leu Lys Arg Ile Glu Asn Lys Ile Asn Arg Gln Val Thr Phe Ser Lys Arg Arg Asn Gly Leu Leu Lys Lys
M G R G R V E L K R L E N K I N R O V T F S K R R N G L L K K

94 GCT TAT GAA CTC TCT GTT CTT TGT GAT GCT GAA GTT GCA CTT ATC ATT TTT TCC AGT AGA GGC AAG CTC TAC GAT TTT GGA AGT GTT GGC ACA AGC
Ala Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Leu Ile Ile Phe Ser Ser Arg Gly Lys Leu Tyr Asp Phe Gly Ser Val Gly Thr Ser
A Y E L S V L C D A E V A L I I F S S R G K L Y D F G S V G T S

190 AAA ACA CTC GAG CGA TAC CAG AGA TGT TGT TAC ACT TCT CAA GAC GCT ACA ATT GCA GAT CGT GAA ACA CAG AGC TGG TAC CAA GAG GTA TCA AAA
Lys Thr Leu Glu Arg Tyr Gln Arg Cys Cys Tyr Thr Ser Gln Asp Ala Thr Ile Ala Asp Arg Glu Thr Gln Ser Trp Tyr Gln Glu Val Ser Lys
K T L E R Y Q R C C Y T S Q D A T I A D R E T Q S W Y Q E V S K

286 CTG AAG GCA AAA TTT GAG TCC CTA CAG CGT TCT CAA AGA CAT TTG CTC GGC GAA GAC CTG GGA CCG TTG AGT GTT AAA GAA TTG CAA CAG TTG GAA
Leu Lys Ala Lys Phe Glu Ser Leu Gln Arg Ser Gln Arg His Leu Leu Gly Glu Asp Leu Gly Prc Leu Ser Val Lys Glu Leu Gln Gln Leu Glu
L K A K F E S L Q R S Q R H L L G E D L G P L S V K E L Q Q L E

382 CGTCAA CTTGAA GCT TCC TTA TCA CAG GCT CGG CAA AGA AAG ACT CAA ATA ATG ATG GAC CAA ATG GAA GAA CTT CGT AAG AAG GAG CGC CAT CTT
Arg Gln Leu Glu Ala Ser Leu Ser Gln Ala Arg Gln Arg Lys Thr Gln Ile Met Met Asp Gln Met Glu Glu Leu Arg Lys Lys Glu Arg His Leu
R Q L E A S L S Q A R Q R K T Q I M M D O M E E L R K K E R H L

478 GGGGAA ATC AAT AAG CAG CTG AAA ACG AAG CTA GAG CAT GAA GGT GCA ACA TTC AGA GCA ATT CAA AGT CCA TGG GAG TCT AAC GTG CAA ATC GAT
Gly Glu Ile Asn Lys Gln Leu Lys Thr Lys Leu Glu His Glu Gly Ala Thr Phe Arg Ala Ile Gln Ser Pro Trp Glu Ser Asn Val Gln Ile Asp
G E I N K Q L K T K L E H E G A T F R A I Q S P W E S N V Q I D

574 GGA AAT-TAC GCT ATG AAT CAT TCT CAG TCT AAT GCA ATG GAT TGT GAG CCA ACT TTG GAA ATT GGA AAC AGG TAC CAG TTC TCT CAG CCT GAA TCC TCA
Gly Asn Tyr Ala Met Asn His Ser Gln Ser Asn Ala Met Asp Cys Glu Pro Thr Leu Glu Ile Gly Asn Arg Trp Gln Phe Ser Gln Pro Glu Ser Ser
G N Y A M N H S Q S N A M D C E P T L E I G N R Y Q F S Q P E S S

676 ATG CCA AGA AAC AAT GGT GGA GGG AAC AAT TTC ATG CTG GGT TGG GCT CTT TAAA 728
Met Pro Arg Asn Asn Gly Gly Gly Asn Asn Phe Met Leu Gly Trp Ala Leu ***
M P R N N G G G N N F M L G W A L

شکل ۷. توالی نوکلئوتیدی، آمینواسیدی و موتیف های ساختاری ژن *AsAGL6* نوکلئوتیدهای ۷ تا ۱۹۷ کد

کننده دومین MADS-box و نوکلئوتیدهای ۲۴۳ تا ۵۰۹ کد کننده دومین K-box می باشند

Figure 7. Nucleotide sequence, amino acid and structural motifs of *AsAGL6* gene. Nucleotides 7 to 197 encode the MADS-box domain and nucleotides 243 to 509 encode the K-box domain

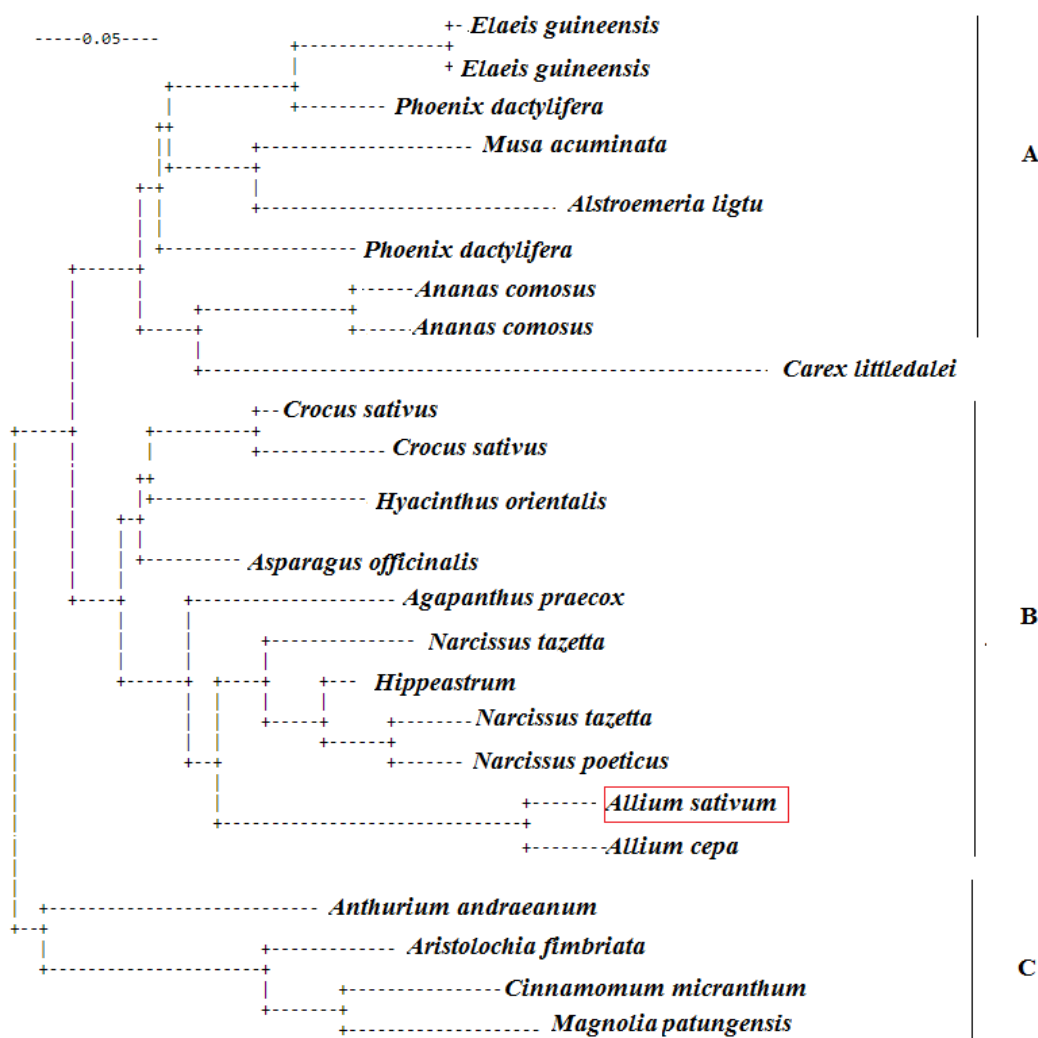
<i>AsAGL6</i>		MGRGRVELKRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAYELSVL	CDAEVALII	FSSRGKLYDFGSV	182
1	AGV31154.1	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAYELSV	CDAEVALII	FSSRGKLYDFGSV	60
2	AAQ83835.1	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAYELSVL	CDAEVALII	FSSRGKLYDFGSV	60
3	ABK35281.1	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAYELSVL	CDAEVALII	FSSRGKLYDFGSV	60
4	ABX47015.1	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAYELSVL	CDAEVALII	FSSRGKLYDFGSV	60
5	AAT88088.1	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAYELSVL	CDAEVALII	FSSRGKLYDFGSV	60
6	ABS82743.1	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAYELSVL	CDAEVALII	FSSRGKLYDFGSV	60
<i>AsAGL6</i>		GTSTKTLERYQRCCYTSQD	ATIADRETQSWY	QEVSKLAKFESLQRSQRHLLGEDLGPLSV	362
1	AGV31154.1	GTSTKTLERYQRCCYTSQD	ATIADRETQSWY	QEVSKLAKFESLQRSQRHLLGEDLGPLSV	120
2	AAQ83835.1	GTSTKTLERYQRCCYTSQD	AAIASHETQSWY	QEVSKLAKFESLQRSQRHLLGEDLGPLSV	120
3	ABK35281.1	GTSTKTLERYQRCCYTSQD	STIADRETQSWY	QEVSKLAKFESLQRSQRHLLGEDLGPLSV	120
4	ABX47015.1	GTSTKTLERYQRCCYTSQD	AAIADRETQSWY	QEVSKLAKFESLQRSQRHLLGEDLGPLSV	120
5	AAT88088.1	GTSTKTLERYQRCCYTSQD	AAIADRETQSWY	QEVSKLAKFESLQRSQRHLLGEDLGPLSV	120
6	ABS82743.1	GTSTKTLERYQRCCYTSQD	AAIADRETQSWY	QEVSKLAKFESLQRSQRHLLGEDLGPLSV	120
<i>AsAGL6</i>		KELQQLEERQLEASLSQARQRT	-QIMLDQMEELRKKERHLGEINK	QKTKLEHEGATFRAI	542
1	AGV31154.1	KELQQLEERQLEASLSQARQRT	-QIMLDQMEELRKKERHLGEINK	QKSKLEHEGATFRAI	180
2	AAQ83835.1	KELQQLEERQLEASLSQARQRT	-QIMLDQMEELRKKERHLGEINK	QKAKLEHEGATFRAI	180
3	ABK35281.1	KELQQLEERQLEASLSQARQRT	-QIMLDQMEELRKKERHLGEINK	QKKNLEHEGATFRAI	180
4	ABX47015.1	KELQQLEERQLEASLSQARQRT	-QIMLDQMEELRKKERHLGEINK	QKIKLEHEGATFRAI	180
5	AAT88088.1	KELQQLEERQLEASLSQARQRT	-QIMLDQMEELRKKERHLGEINK	QKSRLEHEGATFRAI	180
6	ABS82743.1	KELQQLEERQLEASLSQARQRT	-QIMLDQMEELRKKERHLGEINK	QKTKLEHEGANLGA	180
<i>AsAGL6</i>		QSFWESEAGVGN	AFSMHPSQSSAMDC	PTLQIGY-HHLVQPEAALPRNSG	GENNFMLGWV L
1	AGV31154.1	QSFWESEAGVGN	AFSMHPSQSSAMDC	PTLQIGY-HHLVQPEAALPRNSG	GENNFMLGWV L
2	AAQ83835.1	QSFWESEAGVGN	AFSMHPSQSSAMDC	PTLQIGY-HHLVQPEAALPRNSG	GENNFMLGWV L
3	ABK35281.1	QSFWESEAGVGN	AFSMHPSQSSAMDC	PTLQIGY-HHLVQPEAALPRNSG	GENNFMLGWV L
4	ABX47015.1	QSFWESEAGVGN	AFSMHPSQSSAMDC	PTLQIGY-HHLVQPEAALPRNSG	GENNFMLGWV L
5	AAT88088.1	QSFWESEAGVGN	AFSMHPSQSSAMDC	PTLQIGY-HHLVQPEAALPRNSG	GENNFMLGWV L
6	ABS82743.1	QSFWESEAGVGN	AFSMHPSQSSAMDC	PTLQIGY-HHLVQPEAALPRNSG	GENNFMLGWV L

شکل ۸. هم‌ردیفی توالی اسیدآمیننه بخش توالی‌یابی شده مربوط به ژن *AsAGL6* با برخی پروتئین‌های موجود در Genbank، (۱ تا ۶ به ترتیب کد دسترسی برای پروتئین *AGL6* در *Asparagus Allium cepa*، *Asparagus officinalis*، *Crocus sativus*، *Narcissus tazella*، *Hyacinthus orientalis*، *Bambusa oldhamii* می‌باشند. (اسیدآمیننه‌های مشابه، با کادر مشخص شده‌اند)

Figure 8. Alignment of the amino acid sequence of the sequenced part of *AsAGL6* gene with some proteins in Genbank (1 to 6 are accession numbers for *AGL6* protein in *Allium cepa*، *Asparagus officinalis*، *Crocus sativus*، *Narcissus tazella*، *Hyacinthus orientalis*، *Bambusa oldhamii* respectively (similar amino acids are marked with a box)

AGL6 یک ژن از خانواده ژنی *MADS-BOX* و از انواع *MIKE-type* می‌باشد. علت این نامگذاری به دلیل وجود نواحی حفاظت شده ویژه‌ای نظیر *MADS-box* و *K-box* می‌باشد (Dreni & Zhang 2016). دومین *MADS-box* فاکتورهای نسخه‌برداری را کد می‌کند که با اتصال به نواحی ویژه‌ای در ژن‌های پایین دست، آن‌ها را فعال کرده و در مراحل نمو گیاه موثر است. دومین *K-box* به صورت گروهی با فاکتورهای بیانی *SRF*، در تشکیل مولتیمر پروتئینی موثر است (Marchler – Baure et al. 2016). در پژوهش حاضر با توجه به طول قطعه تکثیر، دومین‌های *MADS* و *K-box* به صورت حفاظت

شده در ژن *AsAGL6* وجود دارند. این توالی‌های حفاظت شده در ژن‌های همسان *AGL6* در سایر گونه‌ها از جمله *Allium cepa*، *Crocus sativus*، *Narcissus tazella* و *Hyacinthus orientalis* نیز وجود دارد (Tsaftaris et al. 2007; Wang et al. 2006).



شکل ۹. درخت فیلوژنی گونه‌های مختلف گیاهی بر اساس میزان شباهت در توالی پروتئین همسان *AsAGL6*.
 A: گیاهان متعلق به راسته‌های *Arecales*، *Liliales*، *Zingiberiales* و *Poales*; B: گیاهان متعلق به راسته *Asparagales* و C: گیاهان متعلق به راسته *Magnoliales* می‌باشند.

Figure 9. Phylogeny tree of different plant species based on the degree of similarity in the homologous protein sequence of *AsAGL6*. A: Plants belonging to *Arecales*, *Liliales*, *Zingiberiales* and *Poales* orders, B: Plants belonging to *Asparagales* order and C: Plants belonging to *Magnoliales*

از نظر ساختاری، این ژن بیشترین تشابه ساختاری و عملکردی را با ژن‌های کلاس E نظیر *SEP*، (موثر در تشکیل اندام‌های مختلف گل) دارد (Kim et al. 2013). بر اساس مقایسه فیلوژنتیک *AGL6* در گیاهان مذکور، تشابه بالای این ژن به ژن‌های کلاس E مشاهده شد، که می‌تواند نشان‌دهنده تشابه ساختاری *AsAGL6* با ژن‌های کلاس E نیز باشد. در عین حال، بررسی‌های فیلوژنتیکی ژن *AsAGL6* نیز تشابه بالای ساختاری این ژن با تک‌لپه‌ای‌های پتالوئیدی را نشان داد. در مجموع با توجه به تشابه ساختاری *AsAGL6* با سایر همولوگ‌های *AGL6* در گونه‌های گیاهی و بویژه تک‌لپه‌های پتالوئیدی، می‌توان عملکرد مشابهی را نیز متصور شد.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده در این تحقیق از دو جنبه حائز اهمیت است. در این پژوهش برای اولین بار الگوی بیان ژن *AsAGL6* به عنوان یک ژن مهم از خانواده ژنی MADS-BOX در همگروه‌های مختلف سیر مشخص شد. نتایج نشان داد بیان نسبی *AsAGL6* در سیر گلده بالاتر از سیر نیمه و غیر گلده است. بالاترین تفاوت در سطح بیان ژن در مریم‌ستم و طی مرحله القا گلدهی صورت گرفت. بنابراین این احتمال وجود دارد که تفاوت در سطح بیان این ژن در همگروه‌ها، یکی از دلایل تفاوت‌های مورفولوژیکی در تشکیل ساقه گل‌دهنده و گل‌دین در همگروه‌های سیر باشد. بیان نسبی *AsAGL6* در اندام‌های گل نیز صورت گرفت و بیان قابل توجهی از آن در تپال و برچه (محل نمو تخمک) صورت گرفت. از سوی دیگر ساختار نوکلئوتیدی ژن *AsAGL6* برای اولین بار در سیر مشخص و توالی بدست آمده با کد دسترسی OK086759.1 در پایگاه NCBI ثبت گردید. وجود دومین‌های MADS-box و K-box در توالی نوکلئوتیدی و بررسی‌های فیلوژنتیکی بدست آمده بالاترین تشابه ساختاری را با ژن‌های مشابه در تک‌لپه‌ای‌ها نشان داد. در مجموع با توجه به اهمیت این ژن در فرایند باروری گل و بیان بالای *AsAGL6* در گلچه و بویژه برچه، به نظر می‌رسد نتایج این تحقیق بتواند گام موثری در توسعه برنامه‌های باروری و اصلاحی سیر باشد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا به خاطر همکاری در اجرای پژوهش حاضر و از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- جعفری احمدآبادی سید علی اصغر، عسکری‌همت حشمت‌اله، محمدآبادی محمدرضا و همکاران (۱۴۰۲) تاثیر شاهدهانه بر بیان ژن DLK1 در بافت قلب بره‌های کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۱)، ۲۱۷-۲۳۴.
- شکری سمیرا، خضری امین، محمدآبادی محمدرضا، خیرالدین حمید (۱۴۰۲) بررسی بیان ژن MYH7 در بافت‌های ران، دست و راسته بره‌های پرواری نژاد کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۲)، ۲۱۷-۲۳۶.

قائم‌زاده فهیمه، دشتی فرشاد، شافعی نیا علیرضا (۱۳۹۷) بررسی الگوی بیان ژن‌های *AsFT* و *gaLFY* در فرایند تکامل زایشی در اندام‌های مختلف برخی از همگروه‌های سیر ایرانی (*Allium sativum* L.). مجله علوم باغبانی ایران (۱) ۴۹، ۲۶۹-

۲۷۸

References

- Abbasifar A (2014) Study of the sexual organs development and possibility of seed production In Iranian garlic clones. PhD thesis, Bu -Ali Sina University. pp- 20-67 (In Persian).
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016a) Predicting CpG Islands and Their Relationship with Genomic Feature in Cattle by Hidden Markov Model Algorithm. Iran J Appl Anim Sci 6 (3), 571-579 .
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016b) Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. Czech J Anim Sci 61, 487.
- Bordbar F, Mohammadabadi M, Jensen J, et al. (2022) Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in Simmental beef cattle using Illumina Bovine Bead chip and next-generation sequencing. Animals 12 (9), e1103.
- Brewster J L (2008) Onions and Other Vegetable *Alliums*. CAB International Wallingford, UK, P. 432.
- Dreni L, Zhang D (2016) Flower development: the evolutionary history and functions of the *AGL6* subfamily MADS-box genes. J Exp Bot 67(6), 1625-1638.
- Ghaemizadeh F, Dashti F, Shafeinia A (2018) Expression Analysis of *gaLFY* and *AsFT* during reproductive development in different organs of some Iranian Garlic (*Allium sativum* L.) Clones. Iran J Horticult Sci 49(1), 271-280.
- Ghaemizadeh F, Dashti F, Shafeinia A (2019) Expression pattern of ABCDE model genes in floral organs of bolting garlic clone. Gene Expr Pat 34, e119059.
- Hsu H, Huang CH, Chou L, Yang L (2003) Ectopic Expression of an Orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) *AGL6-like* Gene Promotes Flowering by Activating Flowering Time Genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol 44(8), 783-794
- Hsu HF, Chen WH, Shen YH, et al. (2021) Multifunctional evolution of B and AGL6 MADS box genes in orchids. Nat commun 12(1), 1-12.
- Jafari Ahmadabadi SAA, Askari-Hemmat H, Mohammadabadi M, et al. (2023) The effect of Cannabis seed on DLK1 gene expression in heart tissue of Kermani lambs. Agric Biotechnol J 15 (1), 217-234 (In Persian).

- Kamenetsky R, London SI, Zemah H, et al. (2004) Environmental control of garlic growth and florigenesis. *J Ame Soc Hortic Sci* 129, 144–151.
- Kamenetsky R (2007) Garlic: botany and horticulture. *Horticultural Reviews-Westport Then New York* 33:123.
- Kamenetsky R, Faigenboim A, Mayer ES, et al. (2015) Integrated transcriptome catalogue and organ-specific profiling of gene expression in fertile garlic (*Allium sativum* L.). *BMC* 16(1), 12.
- Kim S, Soltis PS, Soltis DE (2013) *AGL6*-like MADS-box genes are sister to *AGL2*-like MADS-box genes. *J Plant Biol* 56(5), 315-325.
- Koo SC, Bracko O, Park MS, et al. (2010) Control of lateral organ development and flowering time by the Arabidopsis thaliana MADS-box Gene *AGAMOUS-LIKE6*. *The Plant J* 62(5), 807-816.
- Li H, Liang W, Jia R, et al. (2010) The *AGL6-like* gene *OsMADS6* regulates floral organ and meristem identities in rice. *Cell Res* 20(3), 299-313.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methods. *Methods* 25, 402-408.
- Marchler-Bauer A, Bo Y, Han Let al. (2017) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acid Res* 45(D1), 200-203.
- Masoudzadeh, S.H., Mohammadabadi, M.R., Khezri, A., et al. (2020) *Dlk1* gene expression in different Tissues of lamb. *Iran J Appl Anim Sci* 10, 669-677 .
- Medard Ng & Yanofsky MF (2001) Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat Rev Gen* 2(3), 186-195.
- Mohammadinejad F, Mohammadabadi M, Roudbari Z, Sadkowski T (2022) Identification of Key Genes and Biological Pathways Associated with Skeletal Muscle Maturation and Hypertrophy in *Bos taurus*, *Ovis aries*, and *Sus scrofa*. *Animals* 12 (24), 3471.
- Pfaffl MW, Horgan GW, 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 Res* 30(9), 36-36.
- Reinheimer R, Kellogg E (2003) Evolution of *AGL6-like* MADS Box Genes in Grasses (*Poaceae*): Ovule Expression Is Ancient and Palea Expression Is New. *P Cell* (21), 2591–2605.
- Rotem N, David-Schwartz R, Peretz Y, et al. (2011) Flower development in garlic: the ups and downs of *gaLFY* expression. *Planta* 233, 1063–1072.

- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M, et al. (2022) An *Origanum majorana* Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and Carcass Characteristics in Lambs. *Animals* 13 (1), e14.
- Sambrook J, Russell D W (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. *Q Rev Biol* 76(3), 348-349.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2022) Effect of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Seed Powder Consumption on Insulin-like Growth Factor 1 Gene Expression in the Liver Tissue of Growing Lambs. *Gene Express* 21 (2), 21-26.
- Shalom SR, Gillett D, Zemach H, et al. (2015) Storage temperature controls the timing of garlic bulb formation via shoot apical meristem termination. *Planta* 242(4), 951-962.
- Simon PW & Jenderek MM (2003) Flowering, seed production and the genesis of garlic breeding. *Plant Breed Rev* 23, 211-244.
- Takagi H (1990) Biochemistry, food science, and minor crops. In: Onions and allied crops. Brewster JL, Rabinowitch HD (eds). CRC press, Boca Raton, Florida. 3: 109-146.
- Tsaftaris AS, Polidoros AN, Pasentsi K, Kalivas A (2007) Cloning, structural characterization, and phylogenetic analysis of flower MADS-box genes from crocus (*Crocus sativus* L.). *Sci World J* 7, 1047-1062.
- Wang ZK, Gao J, Li LB, Peng ZH (2006) Isolation and characterization of the AGAMOUS homologous gene NTAG in Chinese narcissus (*Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem). *Forestry Stud China* 8(1), 21-26.
- Yoo SK, Wu X, Lee JS, Ahn JH (2011) AGAMOUS-LIKE 6 is a floral promoter that negatively regulates the *FLC/MAF* clade genes and positively regulates *FT* in Arabidopsis. *Plant J* 65(1), 62-76.