

Expression Pattern of *AsFLC* Gene and Its Relationship with the *AsSOC1*, *AsAP1* and *AsAP2* Genes During Vernalization in Bolting, Semi- and Non-bolting Iranian Garlic (*Allium sativum* L.)

F. Ghaemizadeh¹, F. Dashti^{1*}

1- Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

(* - Corresponding author's Email: fdashti@basu.ac.ir)

How to cite this article:

Received: 15 June 2024

Revised: 16 October 2024

Accepted: 16 October 2024

Available Online: 16 October 2024

Ghaemizadeh, F., & Dashti, F. (2025). Expression pattern of *AsFLC* gene and Its relationship with the *AsSOC1*, *AsAP1* and *AsAP2* genes during vernalization in bolting, semi- and non-bolting Iranian Garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Horticultural Science*, 39(2), 217-233. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/jhs.2024.88467.1352>

Introduction

At present, garlic (*Allium sativum* L.) production is completely dependent on asexual propagation, but a wide diversity of bolting and scape formation is observed in garlic. Based on their ability to produce flowering stem (scape), garlic clones are classified into non-bolting, semi-bolting, and bolting clones. In non-bolting clones, scape is not formed or abort at early stages. In semi-bolting clones, cessation of scape development often results in the formation of very short scape between the leaves and development of the elongated leaf-like bracts in the center of the inflorescence. In bolting clones after exposure to low temperature during autumn and winter (vernalization) and long day during spring, long and thick scape is formed which contains inflorescence with flowers. Transition from vegetative to reproductive phase and formation of scape, inflorescences and flowers in plants includes a series of continuous stages which control by several gene groups. Vernalization reduces the expression of the flowering inhibitors like *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, resulting in increased flowering integrators expression like *SUPPRESSOR OF OVER EXPRESSION OF CONSTANT 1 (SOC1)*, *APETALA 1 (AP1)* and *APETALA 1 (AP2)*. So, a correct understanding of the vernalization control genes expression pattern will improve garlic flowering and breeding programs. The aim of this study was to investigate the relative expression of *AsFLC*, *AsSOC1*, *AsAP1* and *AsAP2* before and after vernalization in Iranian bolting, semi-bolting and non-bolting garlic clones.

Materials and Methods

In this study, three garlic clones including, bolting (Mazand Zabol), semi-bolting (Langrud), and non-bolting (Hamedan) garlic clones were selected from vegetable collection of Bu-Ali Sina university (Hamedan, Iran). At first, RNA extracted from meristems of three clones monthly, from 4 to 20 weeks after planting (for *AsFLC*, *AsSOC1*, *AsAP1* and *AsAP2* expression analysis) and from inflorescence of semi-bolting and bolting clones at 24 weeks after planting (for *AsSOC1*, *AsAP1* and *AsAP2* expression analysis) at 2 biological replicates. Then, cDNA synthesized using Oligo d(T) primer and relative expression pattern of the mentioned genes were analyzed using quantitative Real time- PCR.

Results and discussion

The highest expression of the *AsFLC* in all three clones were observed at 4 weeks after culture (before vernalization). Its expression in non-bolting clone at 4 weeks after planting was 2.03 and 1.13 times more than



©2024 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

<https://doi.org/10.22067/jhs.2024.88467.1352>

bolting and semi-bolting garlic, respectively. After vernalization *AsFLC* expression decreased in the meristem of the all three clones. The decrease in the relative expression of *AsFLC* in bolting garlic occurred at a faster rate compared to the other two garlic clones. Then the relative expression of the *AsSOC1* was increased in the meristem during vegetative to reproductive transition phase (12 weeks after planting). The highest *AsSOC1* expression was observed in the meristem of bolting garlic at 12 weeks after planting which was 10.98 and 18.41 times more than the meristem of semi-bolting and non-bolting garlic, respectively. *AsAP1* was expressed in the meristem of three clones in the vegetative to reproductive phase, but its highest expression was in bolting clone at 12 weeks after planting and was 1.22 and 3.64 times more than the meristem of semi-bolting and non-bolting clone respectively. *AsAP2* was just expressed in the meristem of semi-bolting and bolting clones and after reproductive transition. The highest expression of the *AsAP2* was observed at 16 weeks after planting in the meristem of semi-bolting and bolting garlic, which was higher in bolting garlic (2.33 times) in comparison to semi-bolting garlic. Decreases in the expression of the *AsFLC* during vernalization and increases in the expression of the *AsSOC1* and *AsAP1* during vegetative to reproductive phase in the meristem may lead to scape formation in bolting garlic. However, the higher *AsFLC* and the lower *AsSOC1* and *AsAP1* expression in the meristems of non- and semi bolting garlics in comparison to bolting garlic inhibit scape formation. In non-bolting garlic scape aborts and in semi-bolting garlic short and thin scape formed in the middle of leaves. According to the results *AsSOC1* and *AsAP1* were expressed in the inflorescence of semi-bolting and bolting garlic. *AsSOC1* and *AsAP1* relative expression in the inflorescence of bolting garlic were 4.28 and 11.25 times more than semi-bolting garlic, respectively. *AsAP2* was just expressed in the inflorescence of the bolting clone but wasn't expressed in the inflorescence of semi-bolting garlic. The differences in the expression pattern of *AsSOC1*, *AsAP1* and *AsAP2* in the inflorescence of the garlic clones could be the reason of the abnormal inflorescence in semi-bolting garlic.

Conclusions

Finally, it seems that *AsFLC* is a flowering inhibitor and *AsSOC1* and *AsAP1* are flowering integrators in bolting garlic. As *AsFLC* expression decreased after vernalization and *AsSOC1* and *AsAP2* were expressed highly in the time of vegetative to reproductive transition in the meristem of all clones, and there was difference in the bolting of clones, it is suggested that these genes may influence flower induction but their low relative expression cause incomplete bolting in semi-bolting garlic and forbid bolting in non-bolting garlic.

Keywords: *Allium sativum*, Flowering inhibitor gene, Flowering integrator gene, Real-Time PCR

بررسی الگوی بیان ژن *AsFLC* و ارتباط آن با بیان ژنهای *AsSOC1*، *AsAP1* و *AsAP2* در مسیر بهارش سیر (*Allium sativum* L.) گلده، نیمه گلده و غیر گلده ایرانی

فهمیه قائمی زاده^۱ - فرشاد دشتی^{۱*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۲۵

چکیده

درک الگوی بیان ژنهای مسیر بهارش در هم گروههای (کلونهای) مختلف سیر (*Allium sativum* L.) جهت نیل به گلدهی و بهبود برنامههای اصلاحی این گیاه حائز اهمیت است. بدین منظور، الگوی بیان ژنهای *AsFLC* (بازدارنده گلدهی)، *AsSOC1*، *AsAP1* و *AsAP2* (محرکهای گلدهی) در سیر گلده، نیمه گلده و غیر گلده ایرانی با استفاده از Real-Time PCR ارزیابی شد. بر ای این منظور، استخراج RNA و سپس ساخت CDNA از مریستم انتهایی هر سه هم گروه (ماهیانة پس از کشت) و گل آذین سیر گلده و نیمه گلده صورت گرفت. بیشترین بیان *AsFLC* در هر سه هم گروه در چهار هفته پس از کاشت (قبل از بهارش) مشاهده شد و در سیر غیر گلده در مقایسه با سیر گلده و نیمه گلده به ترتیب ۲/۰۳ و ۱/۱۳ برابر بیشتر بود. پس از بهارش، بیان *AsFLC* در هر سه هم گروه کاهش و بیان *AsSOC1*، *AsAP1* در مرحله تبدیل مریستم رویشی به زایشی افزایش یافت. بیشترین میزان بیان *AsSOC1* و *AsAP1* در ۱۲ هفته پس از کاشت در سیر گلده مشاهده شد که به ترتیب ۱۸/۴۱ و ۲/۲۱ برابر بیشتر از سیر غیر گلده بود. بیان *AsAP2* با کمی تأخیر و در ۱۶ هفته پس از کاشت در سیر گلده و نیمه گلده به بیشترین میزان خود رسید و در سیر گلده ۲/۳۳ برابر سیر نیمه گلده بود. در مجموع، این احتمال وجود دارد که کاهش بیان *AsFLC* طی بهارش و افزایش بیان *AsSOC1* و *AsAP1* طی انتقال مریستم به فاز زایشی در سیر گلده منجر به تشکیل ساقه گل دهنده شود. اما بیان بالای *AsFLC* و سپس بیان پایین *AsSOC1* و *AsAP1* ممکن است به عدم تشکیل ساقه گل دهنده در سیر غیر گلده و ساقه کوتاه و غیر طبیعی در سیر نیمه گلده منجر شود. همچنین به نظر می رسد که بیان پایین *AsAP1* و عدم بیان *AsAP2* در گل آذین سیر نیمه گلده از دلایل تشکیل گل آذین ناقص در این هم گروه باشد.

واژه های کلیدی: ژن بازدارنده گل دهی، ژن محرک گل دهی، *Allium sativum*، Real-Time PCR

مقدمه

اسپات توخالی می گردد. در انواع گلده، ساقه گل دهنده همراه با گل آذین حاوی گل و سوخیزه های هوایی تشکیل می شود (Takagi, Simon & Jenderek, 2003; 1990). در انواع گلده بسته به ژنوتیپ، پس از تشکیل تعداد برگ مشخص، گیاه به بلوغ فیزیولوژیکی رسیده و بعد از قرار گرفتن در شرایط القاء کننده گل دهی (بهارش)، مریستم رویشی به زایشی تبدیل می شود. گل دهی به شدت تحت تأثیر ژنتیک است، به طوری که برخی هم گروه ها با وجود شرایط القایی هرگز گل نمی دهند (هم گروه های غیر گلده)، در حالی که هم گروه های دیگر به سهولت گل می دهند (Takagi, 1990). در سیر پس از القاء گل دهی، ساقه گل دهنده به تدریج طویل شده و پس از آن گل آذین تمایز می یابد (Rotem et al., 2011).

گل دهی مسیری پیچیده است و محرک های محیطی یا درونی با تنظیم بیان مجموعه ای از ژن های بازدارنده و محرک گل دهی این

سیر (*Allium sativum* L.) یک گونه دیپلوئید ($2n=2x=16$) از خانواده آماریلیداسه و با ارزش اقتصادی فراوان است. امروزه تولید سیر به طور کامل وابسته به تکثیر غیرجنسی آن است. با این حال تنوع وسیعی از نظر گل دهی در این گیاه مشاهده شده است. ژنوتیپ های سیر براساس تشکیل ساقه گل دهنده به سه گروه غیر گلده، نیمه گلده و گلده طبقه بندی می شوند. در انواع غیر گلده، ساقه گل دهنده تشکیل نشده و یا در مراحل اولیه سقط می شود. در انواع نیمه گلده، توقف نمو ساقه گل دهنده اغلب باعث ایجاد ساقه گل دهنده بسیار کوتاه حاوی

۱- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

(Email: fdashti@basu.ac.ir)

(*) نویسنده مسئول:

<https://doi.org/10.22067/jhs.2024.88467.1352>

(Ding et al., 2013; Liu et al., 2016).

AP1 برای اولین بار در آرآبیدوسیس و به عنوان ژن هویت مریستم گل و ژن هویت اندام گل در کاسبرگ و گلبرگ شناسایی شد، اما همولوگ آن در گیاهان تک‌لپه‌ای مانند گندم (*Triticum aestivum* L.)، برنج (*Oryza sativa* L.) و چچم (*Lolium temulentum* L.) به عنوان محرک گل‌دهی نیز عمل می‌کند (Irish & Litt, 2005). در گیاه چچم، دو ژن *LtMADS1* و *LtMADS2* با بیشترین میزان شباهت ساختاری به ژن *AP1* شناسایی شده‌اند، اما در چچم ابتدا در مقادیر کم در مریستم انتهایی در فاز رویشی بیان شده و پس از مواجهه با طول روز بلند (شرایط القاء گل‌دهی) گل‌دهی افزایش قابل توجهی می‌یابد (Gocal et al., 2001; Murai et al., 2003; Fornar et al., 2004; Yalovsky et al., 2000) در تک‌لپه‌ای‌های پتالوئیدی نظیر ارکید و لیلیوم، بیان *AP1* مشابه گندم، برنج و چچم به هنگام انتقال از فاز رویشی به زایشی در مریستم انتهایی افزایش یافته و مشابه با آرآبیدوسیس در مراحل اولیه تشکیل گل‌آذین و گل‌های منفرد نیز بیان می‌شود (Yu & Goh, 2000; Chen et al., 2008).

AP2 در آرآبیدوسیس دارای نقش دوگانه بوده و به عنوان ژن هویت مریستم گل و ژن هویت اندام گل عمل می‌کند. همچنین بیان ژن *LFY* و *AP1* را در مریستم تنظیم می‌کند (Yant et al., 2010; Ohto et al., 2005). در ذرت (*Zea mays* L.) نیز دو ژن مشابه به نام‌های *ids1* و *sid1* شناسایی شده است. این ژن‌ها در مریستم انتهایی، سرآغاز گل‌آذین و گل‌های منفرد بیان شده و باعث ایجاد گل‌آذین و آغازش مریستم گل در گل‌آذین ذرت می‌شود (Chuck et al., 2008).

همان‌طور که گفته شد، اکثر ارقام تجاری سیر عقیم بوده، بذر تولید نکرده و از طریق رویشی تکثیر می‌شوند. این مسئله امکان تلاقی هدفمند و تولید بذر با هدف فعالیت‌های اصلاحی را غیرممکن می‌کند، از این‌رو شناسایی ژن‌های مسیر گل‌دهی و مقایسه بیان آن‌ها در کلون‌های سیر، اطلاعات مفیدی را به منظور انواع دست‌ورزی ژنتیکی، اعمال تیمارهای خاص هورمونی، هم‌زیستی با قارچ و ... (با هدف کاهش یا افزایش میزان بیان ژن‌ها) در جهت بهبود گل‌دهی و انواع فعالیت‌های اصلاحی در سیر میسر می‌کند.

تاکنون پژوهش‌هایی در ارتباط با برخی از ژن‌های کنترل‌کننده مسیر گل‌دهی در سیر صورت گرفته است. ساختار و الگوی بیان ژن *gaLFY* در یک ژنوتیپ گلده سیر شناسایی و نقش آن به عنوان یک ژن محرک گل‌دهی و ژن هویت مریستم مشخص شده است (Rotem et al., 2011). در پژوهشی دیگر، توالی‌های رونوشت ژن‌های مرتبط با گل‌دهی در اندام‌های رویشی و زایشی یک ژنوتیپ گلده سیر و با کمک تکنیک RNA sequencing تعیین شده است

مسیر را کنترل می‌کنند (Medard & Yanofsky, 2001). اغلب این ژن‌ها از خانواده ژنی MADS-BOX بوده و فاکتورهای نسخه‌برداری کد می‌کنند. در گیاهان دولپه‌ای نیازمند به بهاره‌سازی، ژن (*FLC*) *FLOWERING LOCUS C* به میزان قابل توجهی در فاز رویشی بیان شده و از بیان ژن‌های محرک گل‌دهی نظیر *SUPPRESSOR OF OVER EXPRESSION OF CONSTANT 1 (SOC1)* و *FLOWERING LOCUS T (FT)* جلوگیری می‌کند. در این گیاهان، پس از بهارش، بیان ژن *FLC* کاهش و ژن‌های محرک گل‌دهی بیان شده و گل‌دهی را القاء می‌کنند (Kim & Sung, 2014). این بیان ژن‌های هویت مریستم گل نظیر *APETALA1 (AP1)* و *APETALA1 (AP1)* را منجر شده که در تبدیل مریستم رویشی به زایشی و تشکیل مریستم گل‌آذین مؤثر می‌باشند. برخی از ژن‌های این گروه دارای عملکرد دوگانه بوده و به عنوان ژن محرک گل‌دهی نیز عمل می‌کنند (Hepworth et al., 2002). الگوی بیان ژن‌ها طی بهارش در تک‌لپه‌ای‌ها می‌تواند از دو مسیر مختلف صورت گیرد. در گذشته تصور بر این بود که در این گیاهان، فعالیت سه ژن *VRN1* (محرک گل‌دهی)، *VRN2* (بازدارنده گل‌دهی)، *VRN3* (محرک گل‌دهی) گل‌دهی را تنظیم می‌کند، اما تحقیقات نشان داد که همولوگ *FLC* در تک‌لپه‌ای‌ها نیز وجود دارد و طی بهارش بیان آن کاهش یافته و گل‌دهی القاء می‌گردد (Sharma et al., 2020).

مطالعات وسیعی در ارتباط با ساختار و الگوی بیان ژن‌های بازدارنده و محرک گل‌دهی در طیف وسیعی از گیاهان صورت گرفته است. ژن *FLC* به عنوان مهم‌ترین بازدارنده گل‌دهی برای اولین بار در آرآبیدوسیس (*Arabidopsis thaliana* L.) شناسایی شده است (Helliwell, 2006; Deng et al., 2011; Searle et al., 2006). در جو (*Hordeum vulgare* L.) دو نسخه از ژن مشابه با *FLC* تحت عنوان *BdMADS37* و *HvOS2* شناسایی شده است. بیان این ژن‌ها طی بهارش کاهش یافته و به دنبال آن، بولتینگ و افزایش طول ساقه صورت می‌گیرد (Greenup et al., 2010; Ruelens, 2013).

بیان *SOC1* به عنوان یک ژن محرک گل‌دهی با بهارش و طی کاهش بیان ژن *FLC* در آرآبیدوسیس افزایش می‌یابد. در انواع جهش‌یافته این ژن، تأخیر در گل‌دهی دیده می‌شود (Yoo et al., 2000; Brunner et al., 2005). در بسیاری از گیاهان تک‌لپه‌ای، ژن‌های مشابه *SOC1* نظیر *HvSOC1* در جو، *TrCMADS1* در سوسن (*Lilium longiflorum* L.)، *DoSOC1* و *DnAGL19* در ارکید (*Dendrobium chao parya smile*) شناسایی شده است. در تمامی موارد گفته شده، بیان این ژن‌ها باعث انتقال گیاه از فاز رویشی به زایشی می‌شوند (Nakamura et al., 2005; Yoo et al., 2005; Papaefthimiou et al., 2012;

آنالیز بیان نسبی ژن با تکنیک Real-Time PCR

واکنش Real-Time PCR با استفاده از کیت تجاری YTA SYBR green (یکتا تجهیز آزما، ایران) و با دستگاه تشخیص Light-Cycler 98 Real-Time PCR (Roche، آلمان) انجام شد. در این تحقیق از ژن رمزکننده Actin به‌عنوان ژن مرجع (Shalom *et al.*, 2015) استفاده شد. آغازگرهای مناسب برای تکثیر ژن‌های SOC1 و 2، AP1 از توالی‌های جمع‌آوری‌شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI و با برنامه Primer Quest موجود در پایگاه اینترنتی IDT به نشانی

<http://www.eu.idtdna.com/PrimerQuest/home> طراحی شدند. همچنین به‌منظور بررسی الگوی بیان ژن *FLC* از آغازگر طراحی‌شده توسط رولنز و همکاران (Ruelens *et al.*, 2013) استفاده شد. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است. مخلوط واکنش شامل مستر میکس (۱x) SYBR green (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۱۰۰ نانوگرم cDNA، ۰/۲ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای مستقیم و معکوس در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. برنامه دمایی شامل پنج دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به‌دنبال آن ۴۰ چرخه شامل پنج ثانیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. تمامی واکنش‌ها در دو تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی انجام و برای هر ژن در هر آزمایش، یک شاهد منفی (بدون cDNA) در نظر گرفته شد. پس از استخراج نتایج خام از دستگاه Real-Time PCR، تکرارهایی که دارای تکثیر غیراختصاصی (بیش از یک پیک در منحنی ذوب) بودند از داده‌های آزمایش حذف شدند. در این پژوهش، نمونه با بالاترین میزان CT (کمترین میزان بیان ژن) به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد، لذا نمونه شاهد برای هر ژن به‌صورت جداگانه انتخاب و میزان بیان نسبی ژن‌ها در نمونه‌های مختلف با روش $\Delta\Delta CT$ و نرم‌افزار REST® محاسبه گردید (Pfaffl *et al.*, 2001; Livak & Schmittgen, 2002).

نتایج و بحث

الگوی بیان ژن *AsFLC*

براساس نتایج به‌دست‌آمده، بیشترین میزان سی‌تی برای ژن *AsFLC* (کمترین میزان بیان ژن) در مریستم سیر گلده (۲۰ هفته پس از کاشت) صورت گرفت. از این‌رو این مرحله به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در هر سه هم‌گروه، بالاترین میزان بیان نسبی *AsFLC* در هفته چهارم پس از کاشت مشاهده شد. در سیر غیرگلده، بالاترین میزان بیان ژن *AsFLC* در چهار هفته پس از کاشت (۹۸/۳)

(Kamenetsky *et al.*, 2015). الگوی بیان ژن‌های مؤثر در تشکیل اندام‌های گل (ژن‌های مدل ABCDE نظیر *AP1-3*، *PI AG* و *SEP1-3*)، ساختار و الگوی بیان ژن *AGL6* به‌عنوان ژن مؤثر بر گل‌دهی و باروری گل در سیر گلده و ژن‌های محرک گل‌دهی (*gaLFY*، *AsFT*) در اندام‌های مختلف برخی از هم‌گروه‌های سیر ایرانی نیز مشخص شده است (Ghaemizadeh *et al.*, 2018, 2019, 2024). باین‌حال تاکنون هیچ پژوهشی در ارتباط با الگوی بیان ژن بازدارنده گل‌دهی *FLC* و ژن محرک گل‌دهی *SOC1* در سیر صورت نگرفته است. همچنین الگوی بیان *AP1-2* طی نمو زایشی مریستم و نقش آن‌ها به‌عنوان ژن محرک گل‌دهی و هویت مریستم گل در سیر مشخص نشده است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی الگوی زمانی بیان ژن‌های *FLC*، *SOC1*، *AP1* و *AP2* در مریستم انتهایی سیر گلده، نیمه‌گلده و غیرگلده ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و نمونه‌برداری

برای انجام این تحقیق، سه هم‌گروه سیر گلده (مازند زابل)، نیمه‌گلده (لنگرود) و غیرگلده (همدان) از کلکسیون بخش سبزیکاری گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا انتخاب و سوخته‌ها در ۳۰ آبان ماه ۱۴۰۱ در مزرعه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی کشت شدند. به‌منظور بررسی الگوی بیان ژن *FLC* (بازدارنده گل‌دهی) و ژن‌های *SOC1* و *AP1-2* نمونه‌گیری از مریستم انتهایی (چهار تا پنج میلی‌متر) هر سه هم‌گروه از آذر ۱۴۰۱ تا فروردین ۱۴۰۲ (به‌صورت ماهیانه) صورت گرفت. همچنین برای ژن‌های *SOC1* و *AP1-2* نیز نمونه‌گیری از گل آذین سیر گلده و نیمه‌گلده در اردیبهشت انجام شد. تمام نمونه‌برداری‌ها در دو تکرار بیولوژیکی صورت گرفت. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری در ازت مایع قرار داده شده و تا قبل از استخراج RNA در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA

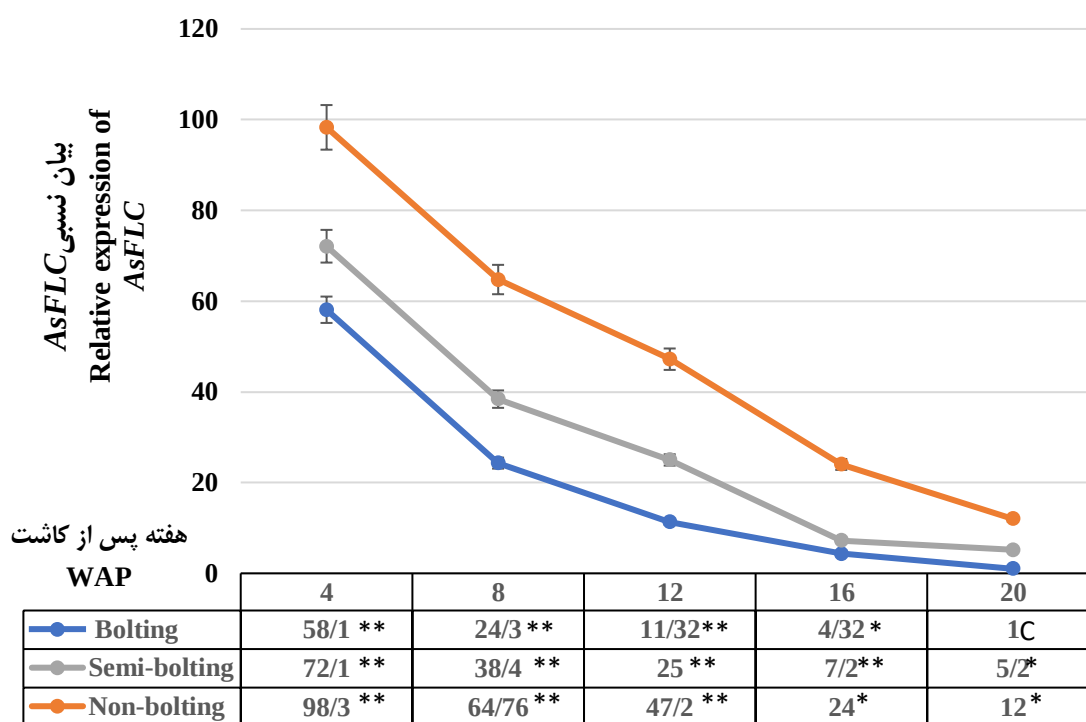
استخراج از مریستم انتهایی و گل‌آذین با استفاده از کیت تجاری RNXplus (سینا ژن، ایران) صورت گرفت. کمیت RNA استخراج‌شده با روش اسپکتوفوتومتری (نانودراپ مدل ۲۰۰۰، ترمو ساینترفیک، آمریکا) سنجیده شدند. ساخت cDNA با استفاده از کیت تجاری 2 Step-RT-PCR (Vivantis، مالزی) و آغازگر oligo d(T) انجام شد. محصول cDNA به‌دست‌آمده در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

شاهد) صورت گرفت (شکل ۱). کاهش بیان ژن *AsFLC* هم‌زمان با تداوم دمای پایین طی پاییز و زمستان در هر سه هم‌گروه مشاهده شد، با این تفاوت که میزان بیان *AsFLC* در تمامی زمان‌های مورد بررسی در سیر غیرگلده از گلده و نیمه‌گلده بالاتر بود (جدول ۲).

برابر نسبت به شاهد) مشاهده شد. سپس بیان ژن روند نزولی داشت، تا جایی که در غیرگلده در ۲۰ هفته پس از کاشت به کمترین میزان خود رسید (۱۲ برابر نسبت به شاهد). این روند نزولی در سیر گلده و سیر نیمه‌گلده نیز مشاهده شد، اما کمترین بیان *AsFLC* در سیر گلده در مقایسه با شاهد در ۱۶ هفته پس از کاشت (۴/۳۲) برابر نسبت به

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در Real-Time PCR
Table 1- Characteristics of primers used for real-time RT-PCR

نام پرایمر Primer name	توالی Sequences
AsFLC	F-CAA-TCTGAGGATGAAGGTGTCACA R-GCTTGACAAGTTGTTCGCTTTCT
AsSOC1	F-TGTCCGCGTTTCATTCTTCT R-AATTCCAGCAAAAGAC
AsAP1	F-TCCATGGAGGCAACAAATTC R-CGTAATCCAAATATCAGCATGG
AsAP2	F-CTCTTCTCTGCCGCACTTTC R-AATTCGATTGGTCATCCAC
Actin	F-ACTCCGTGTTGCTCCTGAAG R-GCATACAGGGAAAGCACAGC



شکل ۱- بیان نسبی *AsFLC* در مریستم سیر گلده، نیمه گلده و غیرگلده در ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ هفته پس از کاشت

Figure 1- Relative expression of *AsFLC* in the meristem of non-, semi- and bolting garlic clones at 4, 8, 12, 16 and 20 weeks after planting

شاهد (C) مریستم سیر گلده در ۲۰ هفته پس از کاشت می‌باشد.

Control: meristem of bolting clone 20 weeks after planting (c).

** and * indicate significant at the 0.01 and 0.05 of probability levels, respectively.

جدول ۲- مقایسه بیان نسبی ژن *AsFLC* در مریستم سیر نیمه گلده و گلده با سیر غیر گلده

Table 2- Relative expression of *AsFLC* in the meristem of semi- and bolting garlic in comparison to non- bolting garlic

زمان نمونه گیری (هفته پس از کاشت) Sampling time (weeks after planting)	بیان نسبی در مقایسه با سیر غیر گلده Relative expression in comparison to non- bolting garlic	
	سیر گلده Bolting garlic	سیر نیمه گلده Semi-bolting garlic
4	-2.03*	-1.13 ^{ns}
8	-2.66**	-1.67 ^{ns}
12	-4.17**	-1.86*
16	ne	-2.33*

ne: نشان دهنده عدم بیان ژن در اندام مورد بررسی، -: نشان دهنده کاهش بیان ژن در مقایسه با شاهد، ^{ns}: غیرمعنی دار، **: معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۱ و *: معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۵.

ne: shows that gene wasn't expressed, -: shows down expression in comparison to control, ** and * indicate significant at the 0.01 and 0.05 of probability levels, respectively, and ^{ns}: shows non- significant.

رفع نیاز سرمایی، به نظر می‌رسد که این ژن در تشکیل ساقه گل دهنده در سیر گلده مؤثر باشد. عدم تشکیل ساقه گل دهنده در سیر غیر گلده و تشکیل ساقه گل دهنده ناقص در سیر نیمه گلده نیز می‌تواند به دلیل سطوح بالای بیان این ژن حتی پس از بهارش باشد.

در گیاهان نیازمند به بهاره سازی، گل دهی زمانی صورت می‌گیرد که با کاهش بیان ژن‌های بازدارنده گل دهی نظیر *FLC*، بیان ژن‌های محرک گل دهی نظیر *FT* و *LFY* نیز افزایش یابد. براساس گزارش روتم و همکاران (Rotem et al., 2011) انتقال مریستم از فاز رویشی به زایشی در سیر طی هشت تا ۱۶ هفته پس از کاشت صورت می‌گیرد. در پژوهشی دیگر، قائمی زاده و همکاران (Ghaemizadeh et al., 2018) نشان دادند که بیان ژن‌های محرک گل دهی نظیر *AsFT2* و *AsLFY* در سیر گلده و نیمه گلده در ۱۶ هفته پس از کاشت به بالاترین میزان خود می‌رسند، اما در مریستم سیر غیر گلده *AsFT2* بیان نشده و بیان *AsLFY* در این هم گروه در مقایسه با سیر گلده و نیمه گلده بسیار کمتر است. در پژوهش حاضر، بالاترین میزان بیان ژن *AsFLC* در هر سه هم گروه در چهار هفته اول کاشت و قبل از محدوده زمانی انتقال مریستم از فاز رویشی به زایشی مشاهده و بیان آن پس از بهارش در هر سه هم گروه کاهش یافت، لذا کاهش بیان ژن *AsFLC* طی بهارش و به دنبال آن افزایش بیان محرک‌های گل دهی می‌تواند در تشکیل ساقه گل دهنده در سیر مؤثر باشد، با این حال تشکیل ساقه گل دهنده تنها در سیر گلده صورت گرفت. در سیر نیمه گلده، ساقه گل دهنده ناقص و کوتاه بود و در سیر غیر گلده ساقه گل دهنده تشکیل نشد. مقایسه الگوی بیان این ژن در هم گروه‌های سیر نیز نشان داد که پس از بهارش، بیان *AsFLC* در هر سه هم گروه کاهش می‌یابد، اما این روند کاهشی در سیر گلده با سرعت بیشتری صورت گرفته و میزان آن در تمام زمان‌های مورد بررسی از سیر نیمه و غیر گلده کمتر است. به نظر می‌رسد که هر چه میزان بیان نسبی *AsFLC* کمتر بوده و بیان آن پس از بهارش با

مطالعات متعددی در ارتباط با ژن‌های بازدارنده گل دهی در تکلیف‌های نیازمند به بهاره سازی صورت گرفته است. در ابتدا تصور می‌شد که کنترل ژنتیکی گل دهی در گیاهان نیازمند به بهاره سازی از طریق نسخه‌های مختلف ژن *VRN* صورت می‌گیرد، اما بررسی ژنوم تکلیف‌های ها و بررسی‌های فیلوژنتیکی نشان داد که ژن‌های مشابه *FLC* نیز در غلات وجود دارند. *FLC* در این گیاهان از نوع *IIMADS DOMAILN PROTEIN* بوده و از نظر تعداد نسخه و عملکرد تا حدودی با دولپ‌های تفاوت دارند (Schilling et al., 2020; Ruelens, 2013). به طوری که در نوعی چمن، دو نسخه از ژن *FLC* با نام‌های *BdOS1* و *BdOS2* شناسایی شده است که طی بهارش بیان اولی افزایش و دومی کاهش می‌یابد (Sharma et al., 2013; Ruelens et al., 2017). در جو نیز دو نسخه مشابه با ژن *FLC* تحت عنوان *BdMADS37* و *HvOS2* شناسایی شده‌اند که طی بهارش، بیان آن‌ها کاهش و سپس طول ساقه گل دهنده افزایش می‌یابد (Ruelens, 2013; Greenup et al., 2010). در گندم نیز بیان ژن *TaOS2* طی بهارش کاهش می‌یابد (Winfield, 2009; Sharma et al., 2017). در تکلیف‌های پتالوئیدی نظیر لیلیوم (*Lilium Longlifflosum*)، همولوگ ژن *FLC* (*LIFLC*) به عنوان بازدارنده گل دهی شناسایی شده است. بیان این ژن پس از بهارش سوخاها کاهش و گل دهی افزایش یافت (Yan et al., 2022). در پژوهش حاضر نیز بیان ژن *AsFLC* پس از مواجهه با دمای پایین طی زمستان به طور قابل توجهی در هر سه هم گروه سیر کاهش یافت که با نتایج نامبرندگان مطابقت دارد، هر چند روند نزولی در بیان *AsFLC* در هر سه هم گروه مشاهده شد، اما بیان آن در تمامی زمان‌های مورد بررسی در سیر گلده کمتر از سیر نیمه و غیر گلده بود. همچنین کاهش بیان نسبی این ژن در سیر گلده با سرعت بیشتری در مقایسه با دو هم گروه دیگر صورت گرفت. با توجه به اهمیت ژن *AsFLC* به عنوان یک بازدارنده گل دهی و کاهش شدید آن پس از

سرعت بیشتری کاهش یابد، ژن‌های محرک گل‌دهی سریع‌تر بیان شده و منجر به تشکیل ساقه گل‌دهنده کامل می‌شوند. در مجموع، بالاتر بودن میزان بیان *AsFLC* و به دنبال آن کاهش یا عدم بیان ژن‌های محرک گل‌دهی در سیر غیرگلده و نیمه‌گلده (Ghaemizadeh et al., 2018) به ترتیب می‌تواند از دلایل عدم تشکیل یا تشکیل ناقص ساقه گل‌دهنده باشد. با توجه به تفاوت‌های ریخت‌شناختی مشاهده‌شده در هم‌گروه‌های مختلف سیر و تفاوت در سطوح مختلف بیان ژن *AsFLC* در هم‌گروه‌ها می‌توان گفت که این ژن می‌تواند به عنوان یک بازدارنده گل‌دهی در سیر مؤثر باشد، باین حال کنترل ژنتیکی گل‌دهی در گیاهان نیازمند به بهاره‌سازی از مسیر ژن‌های دیگری نظیر *VRN* نیز صورت می‌گیرد. در این مسیر، بیان *VRN1* طی بهارش و پس از مواجهه با سرما افزایش می‌یابد. این ژن بیان بازدارنده گل‌دهی نظیر *VRN2* را کاهش می‌دهد (Sharma et al., 2020)، لذا درک کنترل ژنتیکی ژن‌های بازدارنده گل‌دهی در سیر نیازمند مطالعات وسیع‌تری است.

الگوی بیان ژن *AsSOC1*

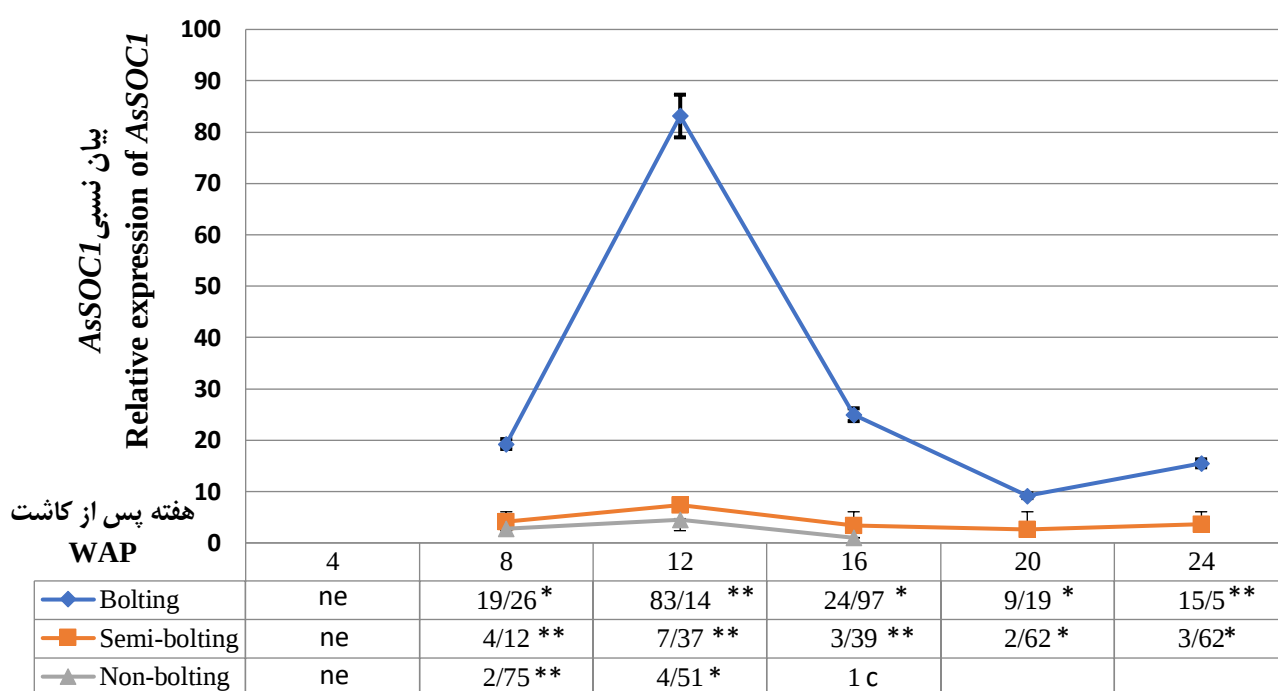
براساس نتایج به‌دست‌آمده، بیشترین میزان سی‌تی برای ژن *AsSOC1* (کمترین میزان بیان ژن) در مریستم سیر غیرگلده (۱۶ هفته پس از کاشت) صورت گرفت، ازاین‌رو این مرحله به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بیان نسبی *AsSOC1* در سیر گلده طی هشت تا ۲۰ هفته پس از کاشت نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت. بیشترین میزان بیان نسبی این ژن در ۱۲ هفته پس از کاشت (۸۳/۱۴) برابر نسبت به شاهد) مشاهده شد. سپس بیان آن در مریستم انتهایی کاهش و در ۲۰ هفته پس از کاشت به کمترین میزان خود رسید. بیان *AsSOC1* در مریستم سیر نیمه‌گلده نیز از هشت تا ۲۰ هفته پس از کاشت نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت و در ۱۲ هفته پس از کاشت به بیشترین میزان خود رسید (۷/۳۷ برابر نسبت به شاهد). *AsSOC1* در گل‌آذین سیر گلده و گل‌آذین تکامل نیافته سیر نیمه‌گلده (۲۴ هفته پس از کاشت) نیز بیان شد. در سیر غیرگلده بیان نسبی *AsSOC1* در مریستم انتهایی طی هشت و ۱۲ هفته پس از کاشت افزایش یافت و بیشترین میزان بیان آن در ۱۲ هفته پس از کاشت (۴/۵ برابر نسبت به شاهد) مشاهده شد (شکل ۲).

مقایسه بیان نسبی ژن *AsSOC1* در مریستم هر سه هم‌گروه نشان داد که بیان نسبی این ژن در مریستم سیر گلده طی زمان‌های مورد بررسی به‌مراتب بیشتر از سیر نیمه‌گلده و غیرگلده است. بیشترین میزان بیان *AsSOC1* در مریستم سیر گلده در هفته دوازدهم صورت گرفت که ۱۱/۲۷ برابر سیر نیمه‌گلده و ۱۸/۴۱ برابر سیر غیرگلده بود (جدول ۳).

SOC1 به‌عنوان یک ژن محرک گل‌دهی در بسیاری از گیاهان شناخته شده است. پژوهش‌های صورت‌گرفته نشان می‌دهد که عملکرد این ژن در میان تک‌لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها حفاظت‌شده می‌باشد، باین حال تاکنون هیچ پژوهشی در ارتباط با الگوی زمانی و مکانی بیان این ژن طی گل‌دهی در سیر صورت نگرفته است. مطالعات صورت‌گرفته در ارتباط با این ژن در سیر محدود به اطلاعات حاصل از توالی‌یابی اران‌ای می‌باشد (Kamenetsky et al., 2015). در آرکیدوبسیس و جو پس از بهارش، بیان *SOC1* در مریستم انتهایی افزایش و در گل‌آذین و گل‌ها نیز بیان می‌شود (Hepworth et al., 2002; Papaefthimiou et al., 2012). در ارکیده نیز ژن *SOC1* پس از بهاره‌سازی در مریستم بیان شده و منجر به انتقال گیاه به فاز زایشی می‌شود (Liu et al., 2016). نتایج حاصل از توالی‌یابی اران‌ای در سیر گلده، حضور نسخه‌های از این ژن را در گل‌آذین سیر نیز نشان داده است (Kamenetsky et al., 2015). در پژوهش حاضر نیز بیان نسبی *AsSOC1* در مریستم انتهایی هر سه هم‌گروه و پس از گل‌دهی در گل‌آذین سیر گلده و نیمه‌گلده نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت. ازاین‌رو نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق با یافته‌های نامبردگان مبنی بر بیان *SOC1* به هنگام انتقال مریستم رویشی به فاز زایشی مطابقت دارد.

عدم و یا کاهش بیان *SOC1* در گیاهان مختلف نظیر برنج، ارکیده و آرکیدوبسیس منجر به تأخیر یا توقف در گل‌دهی می‌شود (Liu et al., 2016; Hepworth et al., 2002; Ryu et al., 2009). در پژوهش حاضر، تفاوت قابل توجهی در میزان بیان نسبی *AsSOC1* بین هم‌گروه‌ها مشاهده شد (جدول ۲). بیشترین میزان بیان نسبی *AsSOC1* در سیر گلده صورت گرفت. علاوه بر این، الگوی تشکیل ساقه گل‌دهنده نیز در بین هم‌گروه‌ها متفاوت بود. نتایج نشان داد که میزان بیان نسبی *AsSOC1* در سیر گلده که ساقه گل‌دهنده در آن به‌طور کامل تشکیل می‌شود در مقایسه با سیر نیمه‌گلده با ساقه گل‌دهنده ناقص به‌مراتب بیشتر است. همچنین در سیر غیرگلده با کمترین میزان بیان *AsSOC1*، اثری از ساقه گل‌دهنده دیده نشد. این نتایج تا حدودی با یافته‌های هپ و رس و همکاران (Hepworth et al., 2002)، رایو و همکاران (Ryu et al., 2009) و لیو و همکاران (Liu et al., 2016) مطابقت دارد.

مجموعه‌ای از ژن‌ها، گل‌دهی در گیاهان را کنترل می‌کنند، لذا درک صحیح از مسیر گل‌دهی در گیاهان نیازمند مطالعه مجموعه‌ای از ژن‌های بازدارنده و محرک گل‌دهی می‌باشد. در لیلیوم بیشترین بیان *SOC1* در هشت هفته پس از کاشت (مواجهه با دمای پایین) صورت گرفت، درحالی‌که در این زمان بیان *LIFLC* به کمترین میزان رسید. در لیلیوم، بیان سایر ژن‌های تنظیم‌کننده گل‌دهی وابسته به بهارش نیز بررسی شده است.



شکل ۲- بیان نسبی *AsSOC1* در سیر گلده، نیمه گلده و غیر گلده

Figure 2- Relative expression of *AsSOC1* in non-, semi- and bolting garlic clones

نمونه‌ها در ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ هفته پس از کاشت از مریستم هر سه هم‌گروه و ۲۴ هفته پس از کاشت گل‌آذین سیر گلده و نیمه‌گلده تهیه شدند. شاهد (C) مریستم سیر غیر گلده در ۱۶ هفته پس از کاشت می‌باشد. ne عدم بیان ژن در اندام مورد بررسی، * معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱. Sample at 4, 8, 12, 16 and 20 weeks after planting are from the meristem of three clones and 24 weeks after planting are from the inflorescence of semi- and bolting clones. Control: meristem of non-bolting clone 16 weeks after planting (c), ne indicates that gene didn't express in the organ. ** and * indicate significant at the 0.01 and 0.05 of probability levels, respectively.

جدول ۳- مقایسه بیان نسبی ژن *AsSOC1* در مریستم سیر نیمه گلده و غیر گلده در مقایسه با سیر گلده

Table 2- Relative expression of *AsSOC1* in the meristem of semi- and non- bolting garlic in comparison to bolting garlic

زمان نمونه‌گیری Sampling time (هفته پس از کاشت) (weeks after planting)	نسبت بیان در مقایسه با سیر گلده Relative expression in comparison to bolting garlic	
	سیر نیمه گلده	
	سیر غیر گلده Non-bolting garlic	Semi-bolting garlic
8	-7.33**	-4.67**
12	-18.41**	-11.27**
16	-24.97**	-7.36**
20	ne	-3.33**

Ne: نشان‌دهنده عدم بیان ژن در اندام مورد بررسی، -: نشان‌دهنده کاهش بیان ژن در مقایسه با شاهد، ns: غیرمعنی‌دار، **: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱ و *: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵.

ne: shows that gene wasn't expressed, -: shows down expression in comparison to control, ** and * indicate significant at the 0.01 and 0.05 of probability levels, respectively, and ns: shows non-significant.

بهارش کاهش یافته و بیان *VRN1* به‌عنوان محرک گل‌دهی افزایش می‌یابد (Kennedy & Geuten, 2020).

ژن *FLC* به‌طور مستقیم مانع از بیان ژن‌های محرک گل‌دهی نظیر *FT* و *SOC1* و *LFY* می‌شود. پس از مواجهه گیاه با دمای پایین و با کاهش بیان این ژن، به‌تدریج بیان ژن‌های محرک گل‌دهی

نتایج نشان داده است که طی بهارش، بیان *LIVRN1* افزایش و بیان *LIVRN2* کاهش می‌یابد، لذا در این گیاه قبل از بهارش افزایش بیان *LIVRN2* منجر به افزایش بیان *LIFLC* می‌گردد و پس از بهارش، افزایش بیان ژن *LIVRN1* از بیان *LIFLC* جلوگیری می‌کند. در غلات زمستانه نیز بیان ژن *ODDSOC2* و *VRN2* طی

افزایش می‌یابد و منجر به تبدیل مریستم رویشی به زایشی می‌شوند. براساس مطالعات صورت گرفته، انتقال مریستم از فاز رویشی به زایشی در سیر طی هشت تا ۱۶ هفته پس از کاشت صورت می‌گیرد (Rotem et al., 2011). روتنم و همکاران (Rotem et al., 2011) گزارش کردند که در این محدوده زمانی، بیان *gaLFY* به‌عنوان یک ژن کلیدی گل‌دهی افزایش می‌یابد و تغییرات ریخت‌شناختی کمی دیرتر در مریستم ظاهر می‌شود. در پژوهش حاضر نیز بیان *AsFLC* قبل از این محدوده زمانی (چهار هفته پس از کاشت) در بیشترین سطح بود و پس از مواجهه با دمای پایین به تدریج کاهش یافت. پس از کاهش بیان *AsFLC*، بیان نسبی *AsSOC1* در هم‌گروه‌های سیر افزایش یافت و در ۱۲ هفته پس از کاشت به حداکثر خود رسید. افزایش بیان نسبی *AsSOC1* در طی محدوده زمانی انتقال مریستم به فاز زایشی صورت گرفت. این نتایج با یافته‌های قائمی‌زاده و همکاران (Ghaemzadeh et al., 2018) مبنی بر بیان سایر ژن‌های محرک گل‌دهی نظیر *AsFT2* و *AsLFY* و گزارش روتنم و همکاران (Rotem et al., 2007; 2011) مبنی بر بیان *gaLFY* در این محدوده زمانی در گیاه سیر مطابقت دارد. در مجموع، با توجه به کاهش بیان *AsFLC* و سپس افزایش قابل توجه بیان *AsSOC1* در مرحله انتقال از فاز رویشی به زایشی، تفاوت در میزان بیان ژن‌های *AsFLC* و *AsSOC1* در بین هم‌گروه‌ها و تفاوت ریخت‌شناختی مشاهده‌شده در بین هم‌گروه‌ها، به نظر می‌رسد که *AsSOC1* به‌عنوان یک ژن محرک گل‌دهی در سیر مؤثر است.

جیبرلین نیز به‌طور مستقیم و از طریق فعال کردن بیان ژن‌های *SOC1*، *LFY* و به‌طور غیرمستقیم از طریق تخریب پروتئین دلا و اثر بازدارندگی بر ژن‌های خانواده این پروتئین مانند *REPRESSOR OF GA1 (RGA1)* بر گل‌دهی اثرگذار است (Pan et al., 2017). مطالعه اخیر نشان داده است که *FT* نیز در پاسخ به جیبرلین تنظیم می‌شود. از آنجایی که *SOC1* توسط *FT* نیز تنظیم می‌شود، بنابراین افزایش بیان *FT* از طریق سیگنال‌های جیبرلین نیز ممکن است بر تنظیم مثبت *SOC1* تأثیرگذار باشد. به عبارت دیگر، افزایش *SOC1* تحت تیمار جیبرلین زمانی قابل مشاهده است که *FT* بالا باشد (et al., 2020). در پیاز قرار گرفتن در معرض دماهای پایین باعث افزایش میزان جیبرلین درونی، گل‌دهی و افزایش عملکرد می‌شود (Lee et al., 2013). در واقع، جیبرلین به‌تنهایی بر گل‌دهی گیاه پیاز تأثیر ندارد، بلکه برای اثرگذاری هورمون باید نیاز سرمایی پیاز برطرف شده باشد. در شالوت نیز استفاده از ۲۰۰ پی‌پی‌ام GA_3 می‌تواند

گل‌دهی را در نتیجه افزایش فعالیت مریستم انتهایی تحریک کند (et al., 2020).

در پژوهش حاضر، میزان جیبرلین درونی در هم‌گروه‌های سیر و پس از مواجهه با دمای پایین اندازه‌گیری نشد، اما این احتمال وجود دارد که افزایش میزان بیان *AsSOC1* در مریستم سیر هم به‌دلیل کاهش اثر بازدارندگی *AsFLC* و هم به‌دلیل افزایش میزان جیبرلین درونی پس از رفع نیاز سرمایی باشد. هرچند مطالعات تکمیلی نظیر اندازه‌گیری میزان جیبرلین و بررسی تأثیر آن بر بیان محرک‌های گل‌دهی به‌منظور درک بهتر مسیر گل‌دهی در سیر بسیار کارآمد خواهد بود.

الگوی بیان ژن *AsAP1*

نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان سی‌تی برای ژن *AsAP1* (کمترین میزان بیان ژن) در مریستم سیر غیرگلده (۲۰ هفته پس از کاشت) صورت می‌گیرد، از این‌رو این مرحله به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در سیر گلده، اثری از بیان *AsAP1* در چهار و هشت هفته پس از کاشت در مریستم مشاهده نشد. سپس بیان آن در مریستم طی ۱۲ تا ۲۰ هفته پس از کاشت افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد یافت. بیشترین میزان بیان نسبی در مریستم سیر گلده، در ۱۲ هفته پس از کاشت (۹/۹۵ برابر نسبت به شاهد) مشاهده شد. الگوی بیان این ژن در مریستم انتهایی سیر نیمه‌گلده مشابه با مریستم سیر گلده بود و بیشترین میزان بیان در ۱۲ هفته پس از کاشت (۸/۱۵ برابر نسبت به شاهد) صورت گرفت. *AsAP1* در ۲۴ هفته پس از کاشت در گل‌آذین سیر گلده و گل‌آذین تکامل نیافته سیر نیمه‌گلده نیز بیان شد. بیان نسبی این ژن در مریستم در سیر غیرگلده نیز طی ۱۲ و ۱۶ هفته پس از کاشت نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت (شکل ۳).

مقایسه الگوی بیان *AsAP1* در مریستم انتهایی سیر گلده و نیمه‌گلده در ۱۲ و ۱۶ هفته پس از کاشت تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، اما در ۲۰ هفته پس از کاشت بیان آن در مریستم سیر گلده ۲/۵ برابر بیشتر از مریستم سیر نیمه‌گلده بود. همچنین بیان نسبی *AsAP1* در گل‌آذین سیر گلده ۱۱/۲۵ برابر گل‌آذین سیر نیمه‌گلده بود. مقایسه بیان *AsAP1* در مریستم سیر گلده و غیرگلده، در همه زمان‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌داری را نشان داد. در تمامی زمان‌های مورد بررسی بیان نسبی *AsAP1* در مریستم گلده در مقایسه با سیر غیرگلده افزایش یافت و بیشترین میزان آن در ۲۰ هفته پس از کاشت (۸/۰۵ برابر نسبت به سیر غیرگلده) مشاهده شد (جدول ۴).

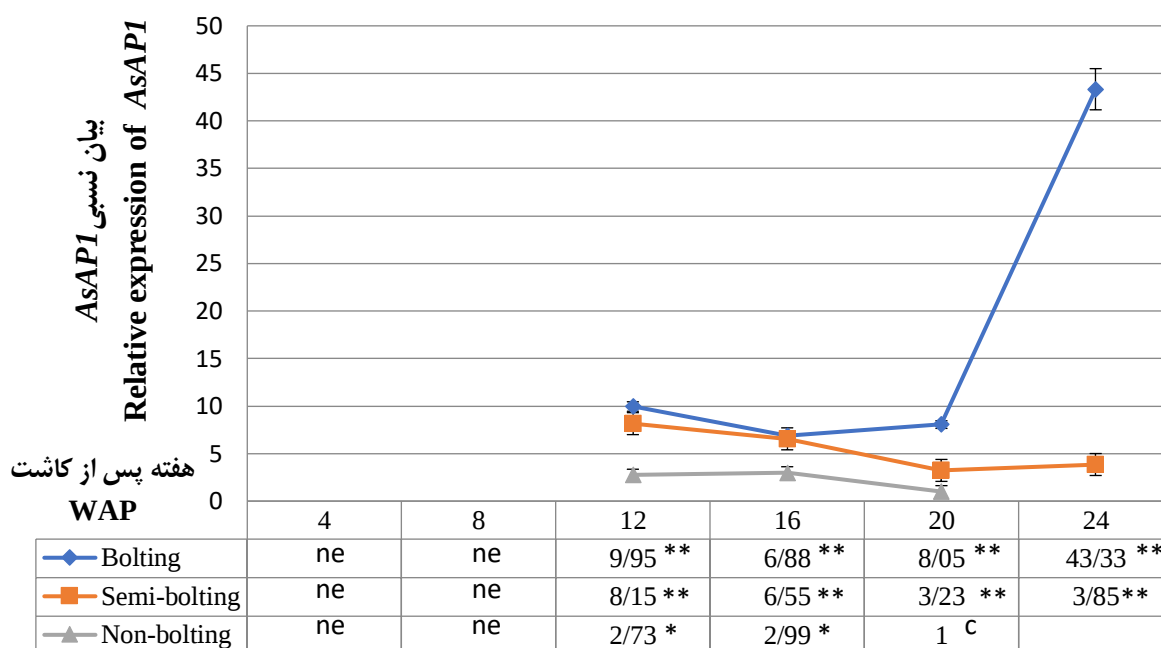

 شکل ۳- بیان نسبی *AsAPI* در سیر گلده، نیمه گلده و غیر گلده

 Figure 3- Relative expression of *AsAPI* in non-, semi- and bolting garlic clones

نمونه‌ها در ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ هفته پس از کاشت از مریستم هر سه هم‌گروه و ۲۴ هفته پس از کاشت از گل‌آذین سیر گلده و نیمه‌گلده تهیه شدند. شاهد (C) مریستم سیر غیرگلده در ۲۰ هفته پس از کاشت می‌باشد. **ne** عدم بیان ژن در اندام مورد بررسی، * معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱. Sample at 4, 8, 12, 16 and 20 weeks after planting are the meristem of three clones and 24 weeks after planting are from the inflorescence of semi- and bolting clones.

Control: meristem of non-bolting clone 16 weeks after planting (c), ne indicates that gene didn't express in the organ.

** and * indicate significant at the 0.01 and 0.05 of probability levels, respectively.

 جدول ۴- مقایسه بیان نسبی ژن *AsAPI* در سیر نیمه گلده و غیر گلده با سیر گلده

 Table 4- Relative expression of *AsAPI* in the non- and semi- bolting garlic in comparison to bolting garlic

زمان نمونه‌گیری Sampling time (هفته پس از کاشت) (weeks after planting)	نسبت بیان در مقایسه با سیر گلده Relative expression in comparison to bolting garlic		نوع نمونه Sample type
	سیر غیر گلده Non-bolting garlic	سیر نیمه گلده Semi-bolting garlic	
12	-3.63**	-1.22 ^{ns}	مریستم Meristem
16	-2.29*	-1.05 ^{ns}	
20	-8.05*	-2.5*	
سیر نیمه گلده Semi-bolting garlic			
24	-11.25**		گل‌آذین Inflorescence

-: نشان‌دهنده کاهش بیان ژن در مقایسه با شاهد، ^{ns}: غیر معنی‌دار، **: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱ و *: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵.

-: shows down expression in comparison to control, ** and *: indicate significant at the 0.01 and 0.05 of probability levels, respectively, and ^{ns}: shows non- significant.

بیان *AsAPI* در مریستم سیر گلده و غیر گلده، در همه زمان‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌داری را نشان داد. در تمامی زمان‌های مورد بررسی بیان نسبی *AsAPI* در مریستم گلده در مقایسه با سیر غیر گلده افزایش یافت و بیشترین میزان آن در ۲۰ هفته پس از کاشت (۸/۰۵ برابر نسبت به سیر غیر گلده) مشاهده شد (جدول ۴).

مقایسه الگوی بیان *AsAPI* در مریستم انتهایی سیر گلده و نیمه گلده در ۱۲ و ۱۶ هفته پس از کاشت تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، اما در ۲۰ هفته پس از کاشت بیان آن در مریستم سیر گلده ۲/۵ برابر بیشتر از مریستم سیر نیمه گلده بود. همچنین بیان نسبی *AsAPI* در گل‌آذین سیر گلده ۱۱/۲۵ برابر گل‌آذین سیر نیمه گلده بود. مقایسه

توجه به عدم وجود تفاوت معنی‌دار در بیان این ژن بین سیر گلده و نیمه‌گلده، به احتمال زیاد، این ژن تأثیری در بولتینگ ناقص سیر نیمه‌گلده ندارد.

در آرآیدوبسیس جهش‌یافته برای *ap1* فنوتیپی مشابه با جهش-یافته‌های *lfy* مشاهده می‌شود. در این گیاهان، گل‌آذین با ساختاری براکته‌مانند و فاقد گل‌های منفرد تشکیل شد (Gocal et al., 2001). اختلال در تشکیل گل‌آذین به‌صورت طبیعی در انواع جهش‌یافته لیلیوم نیز گزارش شده است (Chen et al., 2008). براساس نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، در سیر گلده گل‌آذین با فرم طبیعی حاوی تعداد زیادی گلچه و در سیر نیمه‌گلده گل‌آذین کوچک فاقد گلچه و دارای اندام‌های براکته‌مانند به وجود آمد. اگرچه تفاوت معنی‌داری در بیان ژن *AsAP1* در مریستم انتهایی سیر گلده و نیمه‌گلده در ۱۶ هفته پس از کاشت مشاهده نشد، اما بیان آن در ۲۰ هفته پس از کاشت در مریستم سیر نیمه‌گلده ۲/۵ برابر نسبت به سیر گلده کاهش یافت (جدول ۳). از این رو با توجه به تفاوت ریخت‌شناختی مشاهده‌شده بین هم‌گروه‌ها و تفاوت در سطوح بیان ژن *AsAP1* در آن‌ها به نظر می‌رسد که سطوح پایین بیان *AsAP1* به‌ویژه در مراحل انتهایی آغازش و تمایزبایی گل‌آذین (۲۰ هفته پس از کاشت) مانع از تشکیل گل‌آذین طبیعی در سیر نیمه‌گلده شده است.

الگوی بیان ژن *AsAP2*

نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان سی‌تی برای ژن *AsAP2* (کمترین میزان بیان ژن) در مریستم سیر نیمه‌گلده (۲۰ هفته پس از کاشت) صورت می‌گیرد، از این رو این مرحله به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، اثری از بیان این ژن در مریستم انتهایی سیرگلده، در چهار تا هشت هفته پس از کاشت مشاهده نشد. بیان نسبی *AsAP2* در مریستم سیر گلده از ۱۲ تا ۲۰ هفته پس از کاشت افزایش معنی‌داری نسب به شاهد یافت و بیشترین میزان بیان نسبی آن در مریستم در ۱۶ هفته پس از کاشت (۲۲/۹۸ برابر نسبت به شاهد) مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که بیان نسبی *AsAP2* در گل‌آذین سیر گلده (۲۴ هفته پس از کاشت) به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش می‌یابد (شکل ۴). در سیر نیمه‌گلده *AsAP2* تنها در ۱۲ و ۱۶ هفته پس از کاشت نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت. بیشترین میزان بیان نسبی *AsAP2* در مریستم مشابه با سیر گلده در ۱۶ هفته پس از کاشت (۹/۸۳ برابر نسبت به شاهد) مشاهده شد، اما برخلاف سیر گلده، در گل‌آذین سیر نیمه‌گلده بیان نشد. در ارتباط با سیر غیر-گلده نیز اثری از بیان این ژن در مریستم طی مراحل مورد بررسی مشاهده نشد (شکل ۴).

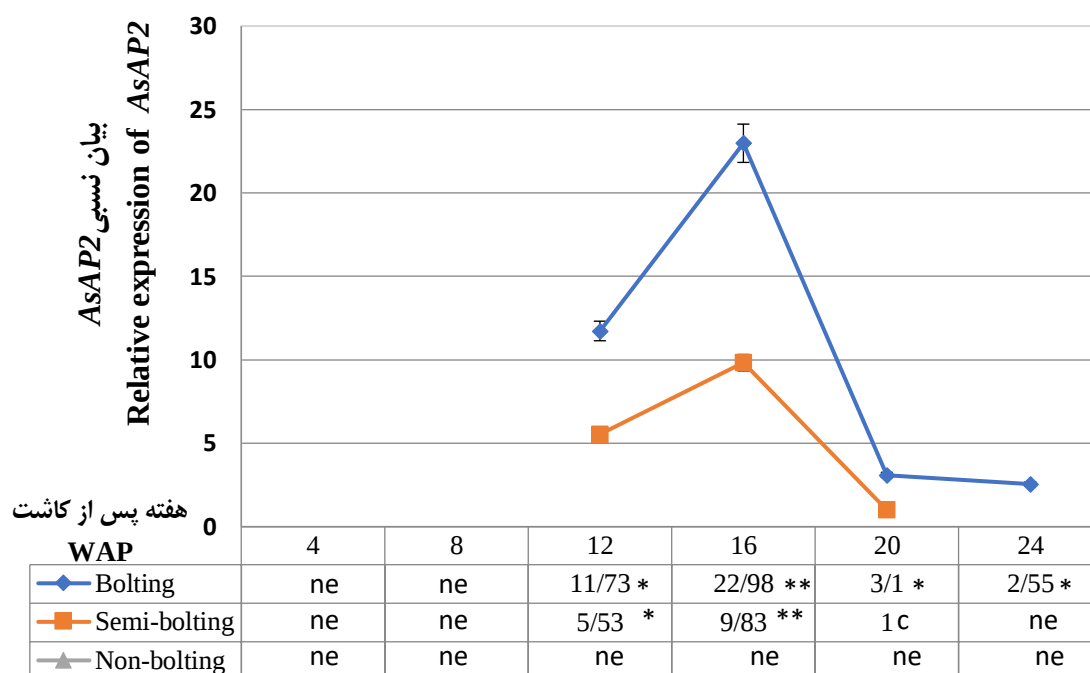
در آرآیدوبسیس، *AP1* به‌عنوان یک ژن تعیین هویت مریستم پس از انتقال از فاز رویشی به زایشی و تحت کنترل *LFY* در مریستم انتهایی بیان می‌شود. بیان این ژن در مریستم انتهایی به‌صورت پیوسته صورت گرفته و در همکاری با *LFY*، تشکیل سرآغاز گل-آذین و گل‌های منفرد را منجر می‌شود (Gocal et al., 2001). الگوی بیان *AP1* در تک‌لپه‌هایی نظیر برنج، چچم و گندم پس از مواجهه با محرک محیطی گل‌دهی و در مرحله انتقال از فاز رویشی به زایشی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. سپس بیان آن برخلاف آرآیدوبسیس در مراحل اولیه تشکیل سرآغاز گل‌آذین و گل به‌شدت کاهش و مجدداً در گل‌آذین و گل بالغ افزایش می‌یابد (Gocal et al., 2001; Murai et al., 2003; Fornara et al., 2004; Yalovsky et al., 2000). بیان نسبی ژن‌های مشابه *AP1* در ارکیده و لیلیوم مشابه برنج، چچم و گندم به هنگام انتقال از فاز رویشی به زایشی افزایش یافته و مشابه با آرآیدوبسیس طی آغازش و نمو اولیه گل‌آذین و گل تا تشکیل اندام گل صورت می‌گیرد (Yu & Goh, 2000; Chen et al., 2008). الگوی بیان *AsAP1* در اندام‌های مختلف رویشی و زایشی گل‌های سیر گلده مشخص شده است (Ghaemizadeh et al., 2019). در پژوهش حاضر نیز برای اولین بار الگوی بیان *AsAP1* طی القاء گل‌دهی در مریستم انتهایی سیر مشخص شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده، بیان نسبی *AsAP1* از ۱۲ تا ۲۰ هفته پس از کاشت در مریستم انتهایی هم‌زمان با انتقال مریستم از فاز رویشی به زایشی و آغازش و تمایزبایی اولیه گل‌آذین و گل‌های منفرد و گل‌آذین بالغ (۲۴ هفته پس از کاشت) افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد یافت (شکل ۳). در سیر نیز مشابه با برنج، گندم و چچم، بیان ژن در مرحله انتقال به فاز زایشی و گل‌آذین افزایش و برخلاف آن‌ها در زمان تشکیل سرآغاز گل‌آذین و گل نیز به‌طور قابل توجهی بیان شد. الگوی بیان *AsAP1* در سیر با یافته‌های یو و گو (Yu & Goh, 2000) و چن و همکاران (Chen et al., 2008) در گیاهان ارکیده و لیلیوم هم‌خوانی دارد. از این رو به نظر می‌رسد که الگوی بیان *AsAP1* در سیر مشابه با تک‌لپه‌ای‌های پتالوئیدی نظیر ارکیده و لیلیوم می‌باشد.

مقایسه بیان نسبی *AsAP1* در مریستم انتهایی سیر گلده و نیمه‌گلده در مرحله انتقال گیاه از فاز رویشی به زایشی (۱۲ هفته پس از کاشت) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، اما در سیر غیرگلده ۳/۶۳ برابر کمتر از سیر گلده بود (جدول ۴). براساس گزارش چن و همکاران (Chen et al., 2008) در لیلیوم جهش‌یافته برای ژن *ap1* تأخیر در گل‌دهی صورت می‌گیرد. از این رو به نظر می‌رسد که چنانچه *AsAP1* در سیر به‌عنوان یک ژن محرک گل‌دهی عمل کند، کاهش بیان نسبی آن مانع از بولتینگ در سیر غیرگلده می‌شود. همچنین با

در آغازش گل‌آذین و گل‌های منفرد ندارد (Yant *et al.*, 2010). در برنج و ذرت نیز *AP2* به‌عنوان ژن هویت مریستم در مریستم انتهایی، سرآغاز گل‌آذین و گل‌های منفرد بیان شده و باعث آغازش گل‌آذین و مریستم گل می‌شود (Chuck *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2007). الگوی بیان نسبی *AsAP2* در اندام‌های مختلف رویشی و زایشی گل‌های سیر گلده مشخص شده است (Ghaemizadeh *et al.*, 2019). در پژوهش حاضر نیز الگوی بیان این ژن طی القاء گل‌دهی مشخص شد. نتایج نشان داد که بیان نسبی *AsAP2* طی ۱۲ تا ۲۰ هفته پس از کاشت به‌طور قابل توجهی در مریستم انتهایی و سپس در گل‌آذین افزایش می‌یابد.

مقایسه بیان نسبی *AsAP2* در مریستم سیرگلده و نیمه‌گلده طی ۱۲ تا ۲۰ هفته پس از کاشت در جدول ۵ آورده شده است. نتایج نشان داد که بیان نسبی این ژن در همه زمان‌های مورد بررسی در مریستم سیر نیمه‌گلده در مقایسه با سیر گلده کمتر بود. کمترین میزان بیان نسبی *AsAP2* در مریستم سیر نیمه‌گلده در مقایسه با سیر گلده در ۲۰ هفته پس از کاشت صورت گرفت و میزان آن ۳/۱ برابر کمتر از مریستم سیر گلده بود.

AP2 در آراییدوبسیس به‌عنوان ژن هویت مریستم گل در تشکیل مریستم گل‌آذین و گل‌های منفرد مؤثر است (Ohto *et al.*, 2005)، اما در گل میمون به‌عنوان ژن هویت مریستم اندام گل بوده و نقشی



شکل ۴- بیان نسبی *AsAP2* در سیر گلده، نیمه‌گلده و غیر گلده

Figure 4- Relative expression of *AsAP2* in non-, semi- and bolting garlic clones

نمونه‌ها در ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ هفته پس از کاشت از مریستم هر سه هم‌گروه و ۲۴ هفته پس از کاشت از گل‌آذین تهیه شدند. شاهد (c) مریستم سیر نیمه‌گلده در ۲۰ هفته پس از کاشت می‌باشد، ne عدم بیان ژن در اندام مورد بررسی، * معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱.

Sample at 4, 8, 12, 16 and 20 weeks after planting are the meristem of three clones and 24 weeks after planting are from the inflorescence of semi- and bolting clones

Control: meristem of non-bolting clone 16 weeks after planting (c), ne indicates that gene didn't express in the organ.

** and * indicate significant at the 0.01 and 0.05 of probability levels, respectively.

جدول ۵- مقایسه بیان نسبی ژن *AsAP2* در مریستم سیر نیمه گلده با سیر گلدهTable 5- Relative expression of *AsAP2* in the meristem of semi-bolting garlic in comparison to bolting garlic

زمان نمونه گیری Sampling time (هفته پس از کاشت) (weeks after planting)	نسبت بیان Relative expression
12	-2.12**
16	-2.33*
20	-3.1*

-: نشان دهنده کاهش بیان ژن در مقایسه با شاهد، ^{ns}: غیرمعنی دار، **: معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۱ و *: معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۵.
-: shows down expression in comparison to control, ** and *: indicate significant at the 0.01 and 0.05 of probability levels, respectively, and ^{ns}: shows non- significant.

به دست آمده، بیشترین میزان بیان نسبی *AsFLC* به عنوان یک ژن بازدارنده گل دهی قبل از بهار و در سیر غیر گلده مشاهده شد. پس از بهار، بیان این ژن در هر سه هم گروه روند نزولی داشت، اما این روند در سیر گلده با سرعت بیشتری صورت گرفت و میزان بیان نسبی آن در تمامی زمان های مورد بررسی در مقایسه با سیر غیر گلده و نیمه گلده بسیار کمتر بود. به دنبال کاهش بیان ژن *AsFLC*، بیان ژن های محرک گل دهی *AsSOC1* و *AsAP1* در مرحله القاء گل دهی در مریستم انتهای سیر گلده به سرعت افزایش یافت و بیان آن ها در مقایسه با سیر نیمه و غیر گلده به مراتب بالاتر بود. بیان *AsAP2* کمی دیرتر از ژن های محرک گل دهی در مریستم سیر گلده و نیمه گلده به بیشترین میزان خود رسید و در مریستم سیر غیر گلده بیان نشد. از سوی دیگر، بیان نسبی *AsAP1* در گل آذین سیر گلده بیشتر از سیر نیمه گلده بود و *AsAP2* تنها در گل آذین سیر گلده بیان شد، از این رو این احتمال وجود دارد که تفاوت در سطح بیان ژن های بازدارنده و محرک گل دهی در هم گروه ها، یکی از دلایل تفاوت های ریخت شناختی در تشکیل ساقه گل دهنده و گل آذین در هم گروه های مختلف سیر باشد، به طوری که تشکیل ساقه گل دهنده و گل آذین کامل تنها در سیر گلده صورت گرفت. در سیر نیمه گلده یک ساقه کوتاه و فاقد گل آذین در بین برگ ها تشکیل شد و در سیر غیر گلده ساقه گل دهنده تشکیل نشد. در مجموع، از نتایج حاصل از این پژوهش می توان برای درک بهتر مسیر ژنتیکی گل دهی و باروری سیر با هدف بهبود برنامه های اصلاحی استفاده کرد.

بر اساس گزارش روتن و همکاران (Roten et al., 2011)، انتقال از فاز رویشی به زایشی و آغازش و تمایز یابی اولیه گل آذین و مریستم گل در سیر طی هشت تا ۲۰ هفته پس از کاشت صورت می گیرد، از این رو نتایج به دست آمده در این تحقیق با یافته های تانگ و همکاران (Tang et al., 2007)، چاک و همکاران (Chuck et al., 2008) و اوئتو و همکاران (Ohto et al., 2005) مبنی بر بیان *AP2* در سر آغازه گل آذین و گل های منفرد مطابقت دارد.

در انواع جهش یافته ذرت برای ژن های *ids1* و *sid1* گل آذین فاقد گلچه های جانبی بوده و تنها دارای یک ساختار مشابه با گلچه که به وسیله اندامی براکته مانند پوشیده شده است، می باشد (Chuck et al., 2008). در پژوهش حاضر نیز گل آذین طبیعی حاوی گلچه تنها در سیر گلده مشاهده شد. در سیر نیمه گلده ساقه گل دهنده کوتاه حاوی یک گل آذین ناقص، فاقد گلچه و دارای ساختارهای براکته مانند تشکیل شد. میزان بیان نسبی *AsAP2* در این هم گروه نیز در مقایسه با سیر گلده در تمامی مراحل مورد بررسی به مراتب کمتر بود (جدول ۵)، از این رو با توجه به تفاوت ریخت شناختی مشاهده شده، به نظر می رسد که سطوح پایین بیان *AsAP2* در سیر نیمه گلده در مقایسه با سیر گلده یکی از موانع تشکیل گل آذین طبیعی در این هم گروه باشد.

نتیجه گیری

در این پژوهش برای اولین بار الگوی بیان دو گروه از مهم ترین ژن های بازدارنده و محرک گل دهی با هدف درک بهتر مسیر بهار و گل دهی در هم گروه های مختلف سیر بررسی شد. بر اساس نتایج

References

- 1- Bao, S., Hua, C., Shen, L., & Yu, H. (2020). New insights into gibberellin signaling in regulating flowering in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1), 118-131. <https://doi.org/10.1111/jipb.12892>
- 2- Brunner, A.M., Rottmann, W.H., Sheppard, L.A., Krutovskii, K., DiFazio, S.P., Leonardi, S.L., & Straus, S.H. (2000). Structure and expression of duplicate *AGAMOUS* orthologues in poplar. *Plant Molecular Biology*, 44, 619-634. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1026550205851>.
- 3- Chen, M.K., Lin, I.C., & Yang, C.H. (2008). Functional analysis of three lily (*Lilium longiflorum*) *APETALA1*-like MADS box genes in regulating floral transition and formation. *Plant and Cell Physiology*, 49(5), 704-717. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn046>

- 4- Chuck, G., Meeley, R., & Hake, S. (2008). Floral meristem initiation and meristem cell fate are regulated by the maize AP2 genes *ids1* and *sid1*. *Development*, 135(18), 3013-3019. <https://doi.org/10.1242/dev.024273>
- 5- Deng, W., Ying, H., Helliwell, C. A., Taylor, J.M., Peacock, W.J., & Dennis, E.S. (2011). *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) regulates development pathways throughout the life cycle of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 108, 6680–6685. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103175108>
- 6- Ding, L., Wang, Y., & Yu, H. (2013). Overexpression of *DOSOC1*, an ortholog of *Arabidopsis* *SOC1*, promotes flowering in the orchid *Dendrobium chao parya* smile. *Plant Cell Physiology*, 54, 595–608. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct026>.
- 7- Fornara, F., Parenicova, L., Falasca, G., Pelucchi, N., Masiero, S., Ciannanea, S., Lopez-Dee, Z., Altamura, M.M., Colombo, L., & Kater, M.M. (2004). Functional characterization of *OsMADS18*, a member of the *AP1/SQUA* subfamily of MADS box genes. *Plant Physiology*, 135(4), 2207-2219. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045039>.
- 8-Gocal, G.F., King, R.W., Blundell, C.A., Schwartz, O.M., Andersen, C.H., & Weigel, D. (2001) Evolution of floral meristem identity genes: Analysis of *Lolium temulentum* genes related to *APETALA1* and *LEAFY* of arabidopsis. *Plant Physiology*, 125, 1788–1801. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1788>.
- 9-Ghaemizadeh, F., Dashti, F.A.R.S.H.A.D., & Shafeinia, A.R. (2018). Expression analysis of *gaLFY* and *AsFT* during reproductive development in different organs of some Iranian garlic (*Allium sativum* L.) clones. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 49(1), 269-278. (In Persian with English abstract). <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20203074943>
- 10-Ghaemizadeh, F., Dashti, F., & Shafeinia, A. (2019). Expression pattern of ABCDE model genes in floral organs of bolting garlic clone. *Gene Expression Patterns*, 34, 119059. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2019.119059>.
- 11-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. (in Persian with English abstract). <https://www.sid.ir/filesserver/jf/961-279249-fa-1129535.pdf>
- 12-Greenup, A.G., Sasani, S., Oliver, S.N., Talbot, M.J., Dennis, E.S., Hemming, M.N., & Trevaskis, B. (2010). *ODDSOC2* is a MADS box floral repressor that is down-regulated by vernalization in temperate cereals. *Plant Physiology*, 153(3), 1062-1073. <https://doi.org/10.1104/pp.109.152488>.
- 13-Hepworth, S.R. Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A., & Coupland, G. (2002) Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by *CONSTANS* and *FLC* via separate promoter motifs. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 21(16), 4327-4337. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf432>
- 14-Helliwell, C.A., Wood, C.C., Robertson, M., James Peacock, W., & Dennis, E.S. (2006). The arabidopsis *FLC* protein interacts directly *in vivo* with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *The Plant Journal*, 46(2), 183-192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02686.x>
- 15-Hantari, D., Purnomo, D., & Triharyanto, E. (2020). The effects of fertilizer composition and gibberellin on flowering and true shallot seed formation of three shallot varieties at the highlands. *Conference Series: Earth and Environmental Science*, 423(1), 012032. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/423/1/012032>.
- 16-Irish, V.F., & Litt, A.T. (2005). Flower development and evolution: Gene duplication, diversification and redeployment. *Current Opinion in Genetics and Development*, 15(4), 454-460. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.06.001>.
- 17-Kamenetsky, R., Faigenboim, A., Mayer, E.S., Michael, T.B., Gershberg, C., Kimhi, S., & Sherman, A. (2015). Integrated transcriptome catalogue and organ-specific profiling of gene expression in fertile garlic (*Allium sativum* L.). *Biomed Central Genomics*, 16(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1212-2>.
- 18-Kennedy, A., & Geuten, K. (2020). The role of *FLOWERING LOCUS C* relatives in cereals. *Frontiers in Plant Science*, 11, 617340. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.617340>.
- 19-Kim, D.H., & Sung, S. (2014). Genetic and epigenetic mechanisms underlying vernalization. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 12, 1-15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3952384/>
- 20-Lee, R., Baldwin, S., Kenel, F., McCallum, J., & Macknight, R. (2013). *FLOWERING LOCUS T* genes control onion bulb formation and flowering. *Nature Communications*, 4(1), 1-9. <https://www.nature.com/articles/ncomms3884>.
- 21-Pan, R., Xu, L., Wei, Q., Wu, C., Tang, W., Oelmüller, R., & Zhang, W. (2017). Piriformospora indica promotes early flowering in *Arabidopsis* through regulation of the photoperiod and gibberellin pathways. *Plos One*, 12(12), e0189791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189791>.
- 22-Liu, X.R., Pan, T., Liang, W.Q., Gao, L., Wang, X.J., Li, H.Q., & Liang, S. (2016) Overexpression of an orchid (*Dendrobium nobile*) *SOC1/TM3-Like* ortholog, *DnAGL19*, in *Arabidopsis* regulates *HOS1-FT* expression. *Frontiers in Plant Science*, 7(99), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00099>.
- 23-Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT methods. *Methods*, 25, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

- 24-Murai, K., Miyamae, M., Kato, H., Takumi, S., & Ogiyara, Y. (2003). *WAP1*, a wheat *APETALA1* homolog, plays a central role in the phase transition from vegetative to reproductive growth. *Plant and Cell Physiology*, 44(12), 1255-1265. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg171>.
- 25-Medard, N.G., & Yanofsky, M.F. (2001). Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nature Reviews Genetics*, 2(3), 186-195. <https://doi.org/10.1038/35056041>.
- 26-Nakamura, T., Song, I., Fukuda, T., Yokoyama, J., Maki, M., & Ochiai, T. (2005) Characterization of *TrcMADS1* gene of *Trillium camtschaticense* (*Trilliaceae*) reveals functional evolution of the *SOC1/TM3-like* gene family. *Journal of Plant Research*, 118, 229–234. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10265-005-0215-5>.
- 27-Ohto, M.A., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., Nakamura, K., & Harada, J.J. (2005). Control of seed mass by *APETALA2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 3123–3128. <https://doi.org/10.1073/pnas.040985810>
- 28-Papaefthimiou, D., Kapazoglou, A., & Tsafaris, A.S. (2012). Cloning and characterization of *SOC1* homologs in barley (*Hordeum vulgare*) and their expression during seed development and in response to vernalization. *Physiologia Plantarum*, 146(1), 71-85. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01610.x>
- 29-Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), 36-36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>.
- 30-Rotem, N., Einat, Sh., Yuval, P., Fouad, A., Orit, E., Haim, D., Rabinowitch, I., & Rina, K. (2007). Reproductive development and phenotypic differences in garlic are associated with expression and splicing of *LEAFY* homologue *gaLFY*. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1133–1141. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl272>.
- 31-Rotem, N., David-Schwartz, R., & Peretz, Y. (2011). Flower development in garlic: The ups and downs of *gaLFY* expression. *Planta*, 233, 1063–1072. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-011-1361-8>.
- 32-Ruelens, P., De Maagd, R.A., Proost, S., Theißen, G., Geuten, K., & Kaufmann, K. (2013). *FLOWERING LOCUS C* in monocots and the tandem origin of angiosperm-specific MADS-box genes. *Nature Communications*, 4(1), 2280. <https://doi.org/10.1038/ncomms3280>
- 33-Ryu, C.H., Lee, S., Cho, L.H., Kim, S.L., Lee, Y.S., & Choi, S.C. (2009). *OsMADS50* and *OsMADS56* function antagonistically in regulating long day (LD)-dependent flowering in rice. *Plant Cell Environment*, 32, 1412–1427. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02008.x>
- 34- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., & Coupland, G. (2006). The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in Arabidopsis. *Genes & Development*, 20(7), 898-912. <https://doi.org/10.1101/gad.373506>
- 35-Simon, P.W., & Jenderek, M.M. (2003). Flowering, seed production and the genesis of garlic breeding. *Plant Breeding Reviews*, 23, 211-244. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470650226#page=424>.
- 36-Shalom, S.R., Gillett, D., & Zemach, H. (2015). Storage temperature controls the timing of garlic bulb formation via shoot apical meristem termination. *Planta*, 242(4), 951-962. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-015-2334-0>.
- 37-Sharma, N., Ruelens, P., D'hauw, M., Maggen, T., Dochy, N., Torfs, S., & Geuten, K. (2017). A flowering locus C homolog is a vernalization-regulated repressor in Brachypodium and is cold regulated in wheat. *Plant Physiology*, 173(2), 1301-1315. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01161>
- 38- Sharma, N., Geuten, K., Giri, B.S., & Varma, A. (2020). The molecular mechanism of vernalization in Arabidopsis and cereals: Role of *Flowering Locus C* and its homologs. *Physiologia Plantarum*, 170(3), 373-383. <https://doi.org/10.1111/ppl.13163>
- 39- Schilling, S., Kennedy, A., Pan, S., Jermin, L.S., & Melzer, R. (2020). Genome-wide analysis of MIKC-type MADS-box genes in wheat: Pervasive duplications, functional conservation and putative neo functionalization. *New Phytologist Foundation*, 225(1), 511-529. <https://doi.org/10.1111/nph.16122>
- 40- Tang, M., Li, G., & Chen, M. (2007). The phylogeny and expression pattern of *APETALA2-like* genes in rice. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(10), 930-938. [https://doi.org/10.1016/s1673-8527\(07\)60104-0](https://doi.org/10.1016/s1673-8527(07)60104-0).
- 41- Takagi, H. (1990). *Biochemistry, Food Science, and Minor Crops*. In: Onions and Allied Crops. J.L. Brewster H.D. Rabinowitch (eds). CRC Press, BocaRaton, Florida, 3, 109-146. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1130282270522244736>.
- 42- Winfield, M.O., Lu, C., Wilson, I.D., Coghill, J.A., & Edwards, K. (2009). Cold- and light-induced changes in the transcriptome of wheat leading to phase transition from vegetative to reproductive growth. *BMC Plant Biology*, 9, 55. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-55>
- 43- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T.T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X., & Schmid, M. (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in Arabidopsis by the bifunctional transcription factor *APETALA2*. *The Plant Cell*, 22(7), 2156-2170. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075606>.

- 44- Yalovsky, S., Rodríguez-Concepción, M., Bracha, K., Toledo-Ortiz, G., & Gruissem, W. (2000). Prenylation of the floral transcription factor *APETALA1* modulates its function. *The Plant Cell*, 12(8), 1257-1266. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.8.1257>
- 45- Yu, H., & Goh, C.J. (2000). Identification and characterization of three orchid MADS-box genes of the *AP1/AGL9* subfamily during floral transition. *Plant Physiology*, 123, 1325–1336. <https://doi.org/10.1104/pp.123.4.1325>
- 46- Yan, X., Wang, L.J., Zhao, Y.Q., & Jia, G.X. (2022). Expression patterns of key genes in the photoperiod and vernalization flowering pathways in *Lilium longiflorum* with different bulb sizes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8341. <https://doi.org/10.3390/ijms23158341>
- 47- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T.T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X., & Schmid, M. (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the functional transcription factor *APETALA2*. *The Plant Cell*, 22(7), 2156-2170. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075606>.
- 48- Yoo, S.K., Chung, K.S., Kim, J., Lee, J.H., Hong, S.M., Yoo, S.J., & Ahn, J.H. (2005) *CONSTANTS* activates *SUPPRESSORS of OCEREpression of CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139(2), 770-778. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066928>