

## شناسایی و بررسی بیان ژن هم‌ساخت CURLY LEAF طی مراحل نمو اندامهای رویشی و زایشی در خردل سیاه (*Brassica nigra* L.)

فرزاد گنجعلیخانی حاکمی<sup>۱</sup>، فرخنده رضانزاد<sup>۱\*</sup> و محسن اسدی خانوکی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> ایران، کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> ایران، کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، انجمن پژوهشگران جوان

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۳۱



### چکیده

همواره رویش سریع‌تر و تولید انبوه دانه از نظر اقتصادی، صنعتی و دارویی مورد توجه است و شناخت ژنهای مؤثر در رویش، گل‌دهی و تولید دانه، ارزش بسیار زیادی دارد. ژن CURLY LEAF (CLF) با نقش مؤثر خود به عنوان بازدارنده گل‌دهی اهمیت بسیار زیادی دارد. در این پژوهش شناسایی ژن هم‌ساخت CLF در گیاه خردل سیاه (*Brassica nigra* L.) به دلیل مصارف دارویی و صنعتی و هم‌خانواده بودن با گیاه مدل آرابیدوپسیس، مورد مطالعه قرار گرفت. برای شناسایی این ژن، RNA کل از برگ بالغ گیاه در مرحله رویشی و برای بررسی بیان آن، RNA کل از برگ و رأس ساقه در دو مرحله رویشی و زایشی و نیز از غنچه گل، استخراج و پس از ساخت cDNA، با استفاده از آغازگرهای طراحی شده و انجام فن RT-PCR، شناسایی این ژن و بیان آن مورد بررسی قرار گرفت. در نتایج به دست آمده، قطعه اختصاصی ۶۶۵ نوکلئوتیدی تکثیر و در بانک ژن با نام bnCLF (KT984485) نام‌گذاری شد. مطالعه درخت فیلوژنتیکی نشان داد که ژن bnCLF با گونه‌های هم‌خانواده خود (*Brassicaceae*) خویشاوندی نزدیک و بیشترین خویشاوندی را با گونه *Brassica rapa* دارد. بررسی بیان ژن نشان داد که میزان بیان در برگ و رأس ساقه در مرحله زایشی بیشتر از مرحله رویشی می‌باشد. همچنین، در مرحله زایشی بیشترین میزان بیان در غنچه گل در مقایسه با رأس ساقه و برگ مشاهده شد. بنابراین با شناسایی این ژن و خاموش کردن آن، می‌توان گل‌دهی را در برخی گیاهان سریع‌تر کرد.

واژه‌های کلیدی: خردل سیاه، درخت فیلوژنتیکی، مهار گل‌دهی، RT-PCR، bnCLF.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۴۳۱۳۲۲۰۹۰، پست الکترونیکی: [frezanejad@uk.ac.ir](mailto:frezanejad@uk.ac.ir)

### مقدمه

*thaliana*) گل میمون (*Antirrhinum majus*) و اطلسی (*Petunia hybrid*) انجام شده که از این میان گونه آرابیدوپسیس تالیانا به دلیل تطابق‌پذیری به عنوان گیاه مدل اهمیت ویژه‌ای دارد (۱۲).

پس از رویش دانه، چرخه زندگی گیاهان گل‌دار شامل دو فاز نمو رویشی و زایشی است که در این میان آغاز فرآیند گل‌دهی، ویژگی مهمی برای گیاه می‌باشد (۱۲) و (۲۵). فازهای نمو به عوامل درونی (خود مختار و وابسته

تشکیل گل و دانه در نهاندانگان، یکی از پدیده‌های مورد علاقه گیاه‌شناسان و همچنین از مطالعات اصلی شناخت مکانیسمهای ژنتیکی دخیل در رشد و نمو می‌باشد. تحقیقات انجام شده در بیش از سه دهه گذشته منجر به کشف ژنهای کلیدی و تنظیمی زیادی شده است که در بسیاری از فرآیندهای ریخت‌زایی گل و تولید دانه شرکت می‌کنند (۲۵). به هرحال، این تحقیقات به طور عمده روی تعداد کمی از گیاهان از قبیل آرابیدوپسیس (*Arabidopsis*)

محور این کلاس ژنی است (۳۵). AGAMOUS (AG). از ژنهای کلاس C و به عنوان ژن MADS-box، در تشکیل پرچم و مادگی در حلقه‌های ۳ و ۴ دخالت دارد و با بیان ژنهای AG و SEP مادگی تشکیل می‌شود. آلل جهش‌یافته آگاموس سبب تشکیل گل فاقد اندامهای تولید مثلی می‌شود (۱، ۶ و ۱۰). AP2 (APETALA2) از ژنهای مربوط به کلاس A علاوه بر نقش مؤثر در تشکیل کاسبرگ و گلبرگ، در سرکوب ژن AG حلقه‌های ۱ و ۲ گل دخالت دارد (۱۰). به هرحال، Maes و همکاران (۲۲) گزارش کردند که ژن PhAP2A به عنوان ارتولوگ ژن AP2 در گیاه اطلسی، نقش مهارکنندگی ژن کلاس C در حلقه‌های ۱ و ۲ را ندارد و بنابراین عملکرد و نقش ژنها در بین گونه‌ها متفاوت است. علاوه بر ژن AP2 چند ژن دیگر آرابیدوپسیس به نامهای CURLY LEAF (CLF)، AINTEGUMENTA (SAP)، STERILE APETALA (ANT) و SEUSS (SEU) شناسایی شدند که سرکوب کننده ژن AG معرفی شدند (۸، ۱۱، ۱۳ و ۲۰). جهش این ژنهای سرکوب کننده به جز ANT سبب تغییر جزئی کاسبرگ و گلبرگ به ترتیب به مادگی و پرچم در حلقه‌های ۱ و ۲ می‌شود. به منظور عدم تشکیل اندامهای تولید مثلی در مراحل رویشی و در حلقه‌های ۱ و ۲ زایشی، کاهش بیان ژن AG لازم است. ژن CURLY LEAF (CLF)، نقش مهمی را در این مهار و همچنین بازدارندگی گل‌دهی دارد (۱۵، ۱۸ و ۲۹). این ژن پروتئینی را کد می‌کند که همولوژی بالایی با محصول ژن حس چشایی در مگس سرکه (*Drosophila melanogaster*) دارد (۱۳) و در بافتهای متنوعی از قبیل همه اندامهای گل و برگها بیان شده و در حالت جهش‌یافته برگها باریک و پیچ خورده (حرکت پهنک برگ به سمت بالا در امتداد محور طولی)، میان گرهها کوتاه و گل‌دهی نیز زودتر اتفاق می‌افتد. همچنین ژن AG به طور عادی بیان شده و گل دگرریختی هومئوتیک پرچم و مادگی را به جای گلبرگ و کاسبرگ نشان می‌دهد (۱۳).

به جیبرلیک اسید) و محیطی (دوره نوری و بهاره شدن) وابسته هستند که هر یک دارای چندین مسیر ژنتیکی پیچیده می‌باشند (۳۴). همچنین، مسیر درون‌زاد مهم دیگری به نام مسیر سن شناخته شده است که در کنترل گل‌دهی نقش بسزایی دارد. این مسیر از عوامل رونویسی مختلفی تشکیل شده که مهمترین آن RNA غیر کدکننده به نام miRNA156 است که بیان آن در مراحل اولیه رشد رویشی زیاد است و به تدریج با افزایش سن گیاه کاهش می‌یابد. این مسیر با سایر عوامل درگیر در عوامل درونی و محیطی ادغام شده و با کاهش میزان بیان miRNA156، بیان ژنهای محرک گل‌دهی افزایش می‌یابد (۳۶ و ۳۷). مسیرهای ژنتیکی از یکدیگر جدا نیستند بلکه به طور شدید با هم در ارتباطند و سبب کنترل تعیین زمان تولید مثلی در شرایط مناسب می‌گردند (۳۲).

از نظر ریخت‌شناسی، گذر از فاز رویشی به زایشی، با تغییر مرستم رأس ساقه و مرستمهای جانبی ثانویه، از تشکیل برگ، به مرستم گل‌آذین مشخص می‌گردد (۳۳). مرستم گل‌آذین یا به‌طور مستقیم به پریموردیوم گل تبدیل شده و یک گل ایجاد می‌شود و یا در ابتدا تولید مرستمهای جانبی ثانویه می‌کند و سپس این مرستمهای جانبی هر کدام به پریموردیوم گل تبدیل و گل‌آذین تشکیل می‌شود (۱۶). ساختار گل کامل تپیک دولپه‌ایها از چهار حلقه هم‌مرکز شامل کاسبرگ، گلبرگ، پرچم و مادگی تشکیل شده است (۲۴). تشکیل هر یک از اندامهای گل وابسته به ژنهای متعددی است که ژنهای تعیین هویت اندامهای گل نامیده می‌شوند. شناسایی این ژنها از طریق مطالعه جهشها در گیاهان آرابیدوپسیس و گل میمون به صورت دگرریختی هومئوتیک (Homeotic) (جایگزینی نوعی اندام با اندامی دیگر طی جهشهای ژنی) مشخص شده است. اولین بار، مجموعه این ژنها در ۳ کلاس ژنی ABC، معرفی شدند (۷ و ۹). امروزه این مدل دستخوش تغییرات شده و دو کلاس ژنی دیگر شناخته شده است و مدل ABC(DE) معرفی می‌شود که اکثر تحقیقات در مورد گل‌دهی، بر

مطالعات انجام‌شده با استفاده از روش RNA silencing و با خاموش‌سازی ژن CLF، زود گل‌دهی آرابیدوپسیس را نشان داده است که نشان‌دهنده عمل مهارکنندگی قوی این ژن بر ژنهای محرک گل‌دهی از قبیل FT است (۲). همچنین در گیاهان خاموش شده و جهش‌یافته *clf*، مشخص شده است که بیان ژنهای FT و FLC افزایش می‌یابد (۲ و ۱۸).

گیاه مورد مطالعه، خردل سیاه با نام علمی *Brassica nigra* L. و نام انگلیسی Black mustard از راسته Brassicales و تیره شب بو (Brassicaceae) است. گونه خردل سیاه گیاهی علفی، یک‌ساله با ارتفاع ۸۰ تا ۱۲۰ سانتیمتر، برگهای متناوب، جام چلیپایی، گل‌های زرد و میوه خورجین است (۵). این گیاه در طب سنتی مصارف متنوعی دارد و اهمیت آن به دلیل استفاده از دانه آن می‌باشد که دارای ۲۳ تا ۳۳ درصد روغن (مصارف صنعتی و تهیه صابون)، اسید میرونیکی، گلوکوزید سولفوازت به صورت میرونیات پتاسیم یا سینیگرین و ۲۰ درصد موسیلاژ است. ارزش درمانی پودر دانه خردل سیاه در استعمال خارجی به مراتب بیشتر از مصرف داخلی (مقوی معده، قی‌آور، ضد اسکوربوت، ملین و نیرو دهنده) است و برای التهاب، تسکین دردهای عصبی، روماتیسمی، دندان درد و رفع خفگی استفاده می‌شود (۳).

در این پژوهش استخراج و شناسایی مشخصات ژن هم‌ساخت CLF که مهمترین ژن بازدارنده گل‌دهی است در خردل سیاه (*Brassica nigra*) صورت گرفت. همچنین، بیان این ژن در برگ و مریستم رأس ساقه در دو فاز رویشی و زایشی و نیز غنچه گل مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روشها

**کشت گیاه مورد مطالعه:** از شرکت پاکان بذر اصفهان، بذر گیاه خردل سیاه (*Brassica nigra*) تهیه گردید و در گلدانهایی حاوی خاک، ماسه و کوکوپیت به ترتیب با

کاهش در ابعاد و تعداد سلولها در برگهای جهش یافته *clf* نشان می‌دهد که این ژن در تقسیم و اندازه ابعاد سلولی در طی ریخت‌زایی برگ دخالت دارد (۱۹). پروتئین این ژن با تشکیل کمپلکس CLF-PRC2 و فعالیت هیستون متیل ترانسفرازی، اثر مهارکنندگی روی بیان ژن FLOWERING LOCUS T (FT) (مهمترین ژن مسیر دوره نوری که باعث آغاز گل‌دهی در پاسخ به افزایش طول روز می‌شود) و ژن FLOWERING LOCUS C (FLC) در غیاب مسیر بهاره شدن، دارد که این واکنش خود عملکردی مؤثر سبب عدم تشکیل گل در فصل و شرایط محیطی نامساعد می‌گردد (۱۴، ۱۸ و ۳۰). این مهارکنندگی با اتصال سه گروه متیل روی اسیدآمینو لیزین شماره ۲۷ هیستون H3 (H3K27me3) انجام می‌شود و اثر مهارکنندگی قوی تری روی FT نسبت به FLC دارد (۱۸ و ۲۷). FLC یک ژن کد کننده فاکتور رونویسی MADS-box است که این فاکتور مستقیماً به جایگاه FT وصل شده و بیان آن را کاهش می‌دهد و در نتیجه گل‌دهی به تأخیر می‌افتد (۳۱). بیان این ژن در پاسخ به مسیر بهاره‌شدن کاهش می‌یابد و این سرکوب، از طریق سرما به وسیله مکانیسمهای پیچیده‌ای تنظیم می‌شود (۱۲).

گزارش شده است که برخلاف آرابیدوپسیس، گیاه اطلسی حداقل دارای سه ژن ارتولوگ CLF به نامهای PhCLF1، PhCLF2 و PhCLF3 است و بیان آنها با یکدیگر متفاوت است. همچنین با آنالیز توالی این ژنها مشخص کردند که PhCLF1 و PhCLF2 ارتولوگ CLF هستند ولی PhCLF3 ارتولوگ ژن EZA1 گیاه آرابیدوپسیس است (۲۳). مطالعات جدید نشان داده است که بیش از ۱۱ درصد ژنهای آرابیدوپسیس، رونویسی آنها توسط ژن CLF در اندامهای مختلف سرکوب می‌شود (۲۱). حتی مشخص شده است که این ژن با فعالیت مهارکنندگی بر سایر ژنهای مراحل رویشی نقش مهمی دارد و گیاه جهش‌یافته *clf-28* دانه‌هایی با وزن زیاد و بزرگ و محتوای روغنی بسیار بالاتری نسبت به تیپ وحشی خود تولید می‌کنند (۲۱).

بالغ گیاه ۲۰ روزه، RNA کل استخراج شد و برای تعیین حضور و کیفیت خلوص RNA استخراج شده، از الکتروفورز افقی (BIO-RAD powerpac, USA) با مشاهده نوارهای مربوطه روی ژل آگارز ۱ درصد و همچنین برای کمیت و غلظت از دستگاه NanoDrop<sup>TM</sup> 2000, Thermo Scientific استفاده شد.

#### سنتز complementary DNA و انجام واکنش RT-PCR

PCR: DNA مکمل به عنوان DNA الگو برای انجام PCR لازم است. سنتز رشته اول cDNA از روی RNA استخراج شده با استفاده از کیت (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) شرکت فرمنتاز و آغازگر Oligo (dT)<sub>18</sub> به روش ذکر شده در کیت صورت گرفت. پس از سنتز cDNA مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر میلیونی قطعه ژنی مورد نظر انجام شد، بدین صورت که حدود ۱ میکرولیتر cDNA با غلظت ۷۰۰ نانوگرم، ۱ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت (هر کدام به صورت جداگانه) و ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس PCR شرکت سیناکلون (SinaClon PCR Master Mix, 2X) به تیوب لیوفیلیزه ۰/۲ میلی‌لیتری اضافه و در نهایت حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۰ میکرولیتر رسانده و با پیپت کردن به طور کامل مخلوط شد. با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل (1148 MJ Mini Personal Thermal Cycler PTC BioRad, USA) واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با برنامه زمانی و دمایی ذکر شده در جدول ۱ صورت گرفت. همچنین برای اطمینان از صحت انجام کار، دو ژن مرجع به نام GAPDH با توالیهای (5'-GAPDH<sup>F</sup>-3' > CAAGGACTGGAGAGGTGG و R-3' > TTCACTCGTTGTCGTACC -5' GAPDH) و ACTIN (5'-rFACT<sup>7</sup>-3' > GCGTACTACTGGTATTGTGC و -5' rRACT) به عنوان

نسبت ۱:۱:۲ در شرایط گلخانه کشت شدند. پس از رویش، برای انجام مطالعات مولکولی و شناسایی ژن هم‌ساخت CLF، نمونه برداری از برگهای بالغ گیاه ۲۰ روزه در مرحله رویشی صورت گرفت.

**طراحی آغازگرها:** به منظور طراحی آغازگرهای مناسب، توالی ژنهای هم‌ساخت CLF در گیاهان هم‌خانواده و همجنس گیاه مورد نظر از قبیل آرابیدوپسیس (Accession no: NM\_001335847، شلغم) (Accession no: XM\_009142214.2، کلزا) (Accession no: XM\_013831623.2، تربچه) (Accession no: XM\_018624785.1) و سایر گیاهان از بانک ژنی NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) گرفته شدند و با استفاده از نرم‌افزار آنالین MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) هم‌ترازی توالیها انجام شد. بر اساس نتیجه به دست آمده و بر طبق نقاط حفاظت شده، آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی پیش‌برنده و برگرداننده با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner 6.5 طراحی شدند و سپس برای تشخیص مناسب بودن این دو آغازگر و عدم اتصال آنها به دیگر ژنها در نرم‌افزار primer blast مورد بررسی قرار گرفتند. آغازگر forward-CLF با توالی (5'-GTGGTCTCAAGTCGTGTG-3') و reverse-CLF با توالی (5'-GCTCTCCTGTGTATTCCC-3') طراحی شدند. سنتز این آغازگرها توسط شرکت پیشگام صورت گرفت و آغازگرهای لیوفیلیزه شده طبق دستورالعمل شرکت سازنده، آماده گردید و برای تهیه محلول کاری با غلظت ۱۰ پیکومول، به آغازگرها آب دیونیزه به نسبت ۱ به ۱۰ اضافه شد و در فریزر با دمای ۲۰- نگهداری شدند.

**استخراج Total RNA:** جهت شناسایی ژن CLF با استفاده از کیت استخراج RNA (Ribospin<sup>TM</sup> Plant, GeneAll) و دستورالعمل ذکر شده در کیت، از برگهای

تخلیص باند مورد نظر از روی ژل آگارز، به همراه دو آغازگر پیش‌برنده و برگرداننده، توسط شرکت پیشگام انجام شد.

کنترل مثبت در نظر گرفته شدند (۴ و ۱۷). با الکتروفورز افقی و ژل آگارز ۱ درصد، تعیین باند اختصاصی تکثیر شده محصول PCR بررسی گردید. تعیین توالی، پس از

جدول ۱- برنامه زمانی و دمایی برای انجام RCR

چرخه	زمان	دما	برنامه واکنش PCR
۱	۴ دقیقه	۹۵°C	واسرشتگی اولیه
۳۲	۳۰ ثانیه	۹۵°C	واسرشتگی ثانویه
	۳۰ ثانیه	۵۵°C	اتصال
	۳۰ ثانیه	۷۲°C	طویل شدن
۱	۵ دقیقه	۷۲°C	طویل شدن نهایی

ایجاد حدود اطمینان برای شاخه‌ها) رسم گردید. توالی پروتئین استنباطی این ژن با برنامه Translate در پایگاه ExPACy (<https://web.expasy.org/translate>) مورد ترجمه قرار گرفت و مقایسه میزان شباهت و هم‌ردیفی توالی این پروتئین با پروتئین هم‌ساخت CLF برخی از گیاهان با نرم‌افزار ClustalX 2.1 بررسی گردید (جدول ۲).

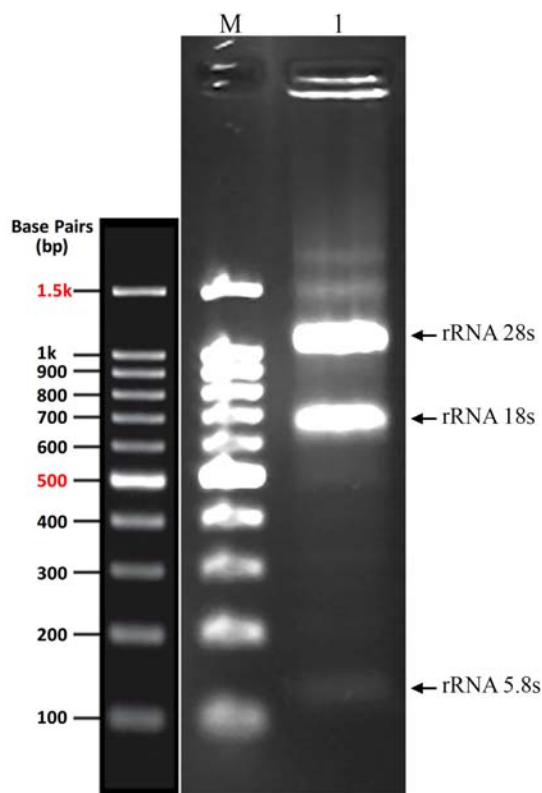
آنالیزها و رسم درخت تبارزادی (فیلوژنتیکی): با نرم‌افزار آنالیز BLAST، درصد شباهت توالی به دست آمده با توالی هم‌ساخت CLF سایر گیاهان، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین درخت فیلوژنتیکی با نرم‌افزار MEGA 7 و با استفاده از روش مبتنی بر فاصله به نام Neighbor joining و بررسی Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار (به منظور

جدول ۲- شماره دسترسی گونه‌های گیاهی مورد استفاده برای هم‌ترازی توالیهای نوکلئوتیدی و رسم درخت فیلوژنتیکی.

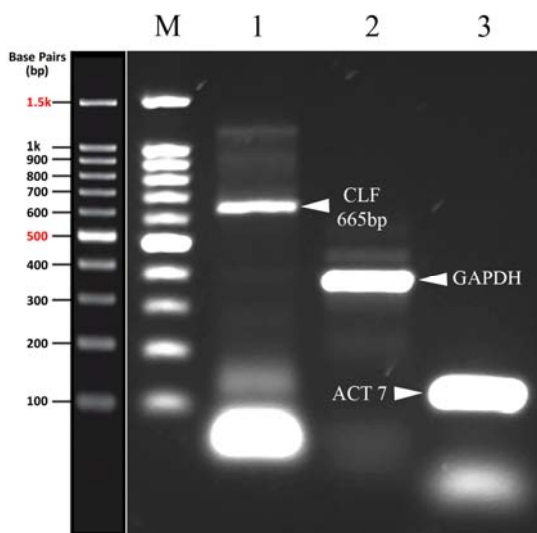
شماره دسترسی	گونه گیاهی	شماره دسترسی	گونه گیاهی
XM_019327438.1	<i>Ipomoea nil</i>	XM_021028422.1	<i>Arabidopsis lyrata</i>
XM_008342074.2	<i>Malus domestica</i>	NM_001335847.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
XM_021777390.1	<i>Manihot esculenta</i>	XM_016108412.2	<i>Arachis duranensis</i>
XM_022293776.1	<i>Momordica charantia</i>	XM_016346228.2	<i>Arachis ipaensis</i>
XM_010113494.1	<i>Morus notabilis</i>	XM_022718652.1	<i>Brassica napus</i>
AB098523.1	<i>Petunia hybrida</i>	XM_018658650.1	<i>Brassica rapa</i>
FJ917288.1	<i>Physcomitrella patens</i>	XM_013781780.1	<i>Brassica oleracea</i>
XM_002307237.2	<i>Populus trichocarpa</i>	XM_020362128.1	<i>Cajanus cajan</i>
XM_021968866.1	<i>Prunus avium</i>	XM_010430986.2	<i>Camelina sativa</i>
XM_018624784.1	<i>Raphanus sativus</i>	XM_016714718.1	<i>Capsicum annuum</i>
XM_015722002.1	<i>Ricinus communis</i>	XM_004511853.2	<i>Cicer arietinum</i>
NM_001335847.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	XM_011651023.1	<i>Cucumis sativus</i>
NM_001302925.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	XM_017387231.1	<i>Daucus carota</i>
XM_010532945.2	<i>Tarenaya hassleriana</i>	XM_012998065.1	<i>Erythranthe guttatus</i>
XM_007047257.2	<i>Theobroma cacao</i>	XM_011465678.1	<i>Fragaria vesca</i>
XM_017571943.1	<i>Vigna angularis</i>	XM_022127476.1	<i>Helianthus annuus</i>
XM_014665464.2	<i>Vigna radiata</i>	XM_021419653.1	<i>Herrania umbratica</i>
		XM_021829524.1	<i>Hevea brasiliensis</i>

روزگی) استخراج گردید. کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. آغازگرهای مناسب برای بررسی بیان این ژن به نامهای rFCLF با توالی (5'-CACAAGCACTCTACGACATC-3') و rRCLF

بررسی بیان ژن هم‌ساخت CLF و آنالیز آماری: برای مطالعه بیان ژن هم‌ساخت CLF در اندامهای مورد نظر، RNA کل از برگ بالغ و رأس ساقه در دو مرحله رویشی (۱۵ روزگی) و زایشی (۲۵ روزگی) و نیز غنچه گل (۲۹



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورزی rRNA استخراج شده. rRNA کل برگ بالغ گیاه ۲۰ روزه در مرحله رویشی. (M) نشانگر مولکولی SMOBIO 100bp



شکل ۲- طرح الکتروفورزی از تکثیر قطعه اختصاصی توسط RT-PCR. (۱) قطعه اختصاصی تکثیر شده ۶۶۵ نوکلئوتیدی ژن هم‌ساخت CLF. (۲) تکثیر ژن مرجع GAPDH. (۳) تکثیر ژن مرجع ACTIN 7. (M) نشانگر مولکولی SMOBIO 100bp

با توالی (5'-ATTGAGATACACCGATCAGC-3') طراحی شدند. پس از ساخت cDNA واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. به منظور مشخص شدن بیان ژن هم‌ساخت CLF در اندامهای مورد نظر و همچنین کیفیت محصولات PCR از الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد و برای سنجش نیمه کمی میزان شدت باندهای بیان ژن CLF و نرمال سازی آنها با کنترل داخلی از نرم‌افزار ImageJ 1.51 (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) استفاده شد و آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS v23 و آزمون Duncan با سطح احتمال خطای ( $P < 0.05$ ) صورت گرفت و نمودار میزان بیان آن در اندامهای مختلف رسم گردید.

## نتایج

نتیجه به دست آمده مربوط به الکتروفورز rRNAهای استخراج شده از برگ گیاه ۲۰ روزه و برگ و رأس ساقه در دو مرحله رویشی و زایشی و نیز غنچه گل بر وجود سه باند rRNAهای ریبوزومی rRNA 28s، rRNA 18s و rRNA 5.8s نشان‌دهنده کیفیت خلوص مناسب است (شکل ۱). همچنین در غلظت خوانده شده با دستگاه نانودراپ، غلظت بیش از ۷۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود و میزان جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ در محدوده ۱/۸ تا ۲ قرار داشت. در اینجا فقط تصویر ژل الکتروفورزی RNA کل گیاه ۲۰ روزه نشان داده شده است.

تکثیر قطعه اختصاصی ژن هم‌ساخت CLF گیاه خردل سیاه با استفاده از فن RT-PCR و الکتروفورز محصول آن، وجود باند اختصاصی در محدوده مورد انتظار ۶۶۵ جفت باز، نشان دهنده اتصال موفقیت‌آمیز آغازگرها و برنامه تکثیر مناسب برای این ژن بوده است. همچنین وجود باند ژن مرجع GAPDH و ACTIN 7 نشان دهنده صحت انجام آزمایش است (شکل ۲).

نتایج توالی‌یابی محصول PCR و خوانش ۶۶۵ نوکلئوتیدی این ژن و بررسی با برنامه BLAST نشان داد که قطعه مورد نظر مربوط به ناحیه کدکننده ژن هم‌ساخت CLF است. توالی پروتئین استنباطی این ژن با برنامه Translate در پایگاه ExpACy به دست آمد که این پروتئین دارای ۲۲۱ اسید آمینه است (شکل ۳).

```

forward-CLF
1 5' gtggctctcaagtcgtgttggggaggtcttccaatacatgacttctcggagaacaaagcttcc 20
   G L K S C W E V F Q Y M T C S E N K A S
63  ttcttcggaggtgatgcattgaatcccgacggctctccaagtttgatatcaatggaat 40
   F F G G D A L N P D G S S K F D I N G N
123 atgactaataaccaagtcgaagaaggtcaagatttctacgtagaaggcaagtgctgc 60
   M T N N Q V R R R S R F L R R R G K V R
183 cgcttgaagtatacttgggaagtcgtgcatacattcaattagaaaagaagaccgat 80
   R L K Y T W K S A A Y H S I R K R S T D
243 aagaagaccagcctgctcctcaatttaaccatgcaaacctgcttgcgggaag 100
   K K D Q P C R Q F N P C N C K T A C G K
303 gaatgacttgttgcataacgggacttctcggagaagactcgggtgccaaagagc 120
   E C T C L L N G T C C E K Y C G C P K S
363 tgcaagaacaggttagaggttgcattgtgcaaaagccagtgctggagccgtcaatgt 140
   C K N R F R G C H C A K S Q C R S R Q C
423 ccgtgcttctgcagatcgggaatgtgactctgatgtttaggaattgctgggtcatt 160
   P C F A A D R E C D P D V C R N C W V I
483 ggtgggagtgatgcttggggccctagcgaagagggcgataattatgagtcaggaat 180
   G G D G T L G V P S Q R G D N Y E C R N
543 atgaaattactctgaaacaacaagggttttacttgggaatatctgatgatctgtgt 200
   M K L L L K Q Q Q R V L L G I S D V S G
603 tggggagcttctcaagaacagtgtaagtaaacacgaatatctcggggaatacacaggagc 3'
   W G A F L K N S V S K H E Y L G E Y T G S 221
reverse-CLF

```

شکل ۳- توالی نوکلئوتیدی و توالی پروتئین استنباطی ژن bnCLF در خردل سیاه به دست آمده با برنامه Translate در پایگاه ExpACy. توالی پیش‌رو و پس‌رو با فلش مشخص شده است.

همچنین در نتایج حاصل از BLAST، قطعه اختصاصی تکثیر شده شباهت بسیار بالایی با سایر ژنهای هم‌ساخت CLF در دیگر گیاهان از جمله *Arabidopsis thaliana*، *Ipomoea nil*، *Arachis ipaensis*، *Raphanus sativus* دارد که بالاترین شباهت با *Brassica rapa* است (جدول ۳). درصد یکسانی و درصد همپوشانی در مقایسه با این ژن بسیار زیاد و قابل توجه می‌باشد. همچنین ارزش E

جدول ۳- میزان شباهت توالی شناسایی شده ژن هم‌ساخت bnCLF در گیاه خردل سیاه با سایر گیاهان.

شماره دسترسی	نام گیاه	درصد یکسانی	درصد همپوشانی	ارزش E
NM_001335847.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	۹۳٪	۱۰۰٪	صفر
XM_009142214.2	<i>Brassica rapa</i>	۹۹٪	۱۰۰٪	صفر
XM_018624784.1	<i>Raphanus sativus</i>	۹۷٪	۱۰۰٪	صفر
XM_016346228.2	<i>Arachis ipaensis</i>	۸۰٪	۸۰٪	4e-107
XM_019327438.1	<i>Ipomoea nil</i>	۷۸٪	۷۷٪	3e-83

۴). همچنین در هم‌ترازی و مقایسه توالی پروتئین این ژن با چند گونه مختلف گیاهی مشخص شد (جدول ۴) که شباهت زیاد با گونه‌های *Arabidopsis thaliana*، *Brassica rapa*، *Camelina sativa* و *Ipomoea nil* دارد. بررسی فیلوژنتیکی توالی مربوط به ژن هم‌ساخت CLF خردل سیاه با برخی از گونه‌های گیاهی با نرم‌افزار MEGA 7 از روش مبتنی بر فاصله به نام Neighbor joining نشان داد که ژن bnCLF خردل سیاه از نظر ژنتیکی، خویشاوندی بسیار نزدیک با گونه گیاهی *Brassica rapa* دارد (شکل







جدول ۴- میزان شباهت توالی پروتئینی شناسایی شده ژن هم‌ساخت **bnCLF** در گیاه خردل سیاه با سایر گیاهان.

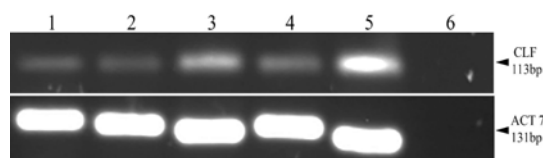
شماره دسترسی	نام گیاه	درصد یکسانی	درصد هم‌پوشانی	ارزش E
NP_001324816.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	۹۶٪	۹۹٪	9e-153
XP_018514166.1	<i>Brassica rapa</i>	۱۰۰٪	۹۹٪	6e-168
XP_022574373.1	<i>Brassica napus</i>	۹۴٪	۶۶٪	1e-44
XP_011649325.1	<i>Cucumis sativus</i>	۸۱٪	۹۹٪	3e-116
XP_019182983.1	<i>Ipomoea nil</i>	۷۶٪	۹۹٪	4e-109

غنچه گل. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و میانگینهایی با حروف مشابه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارند.

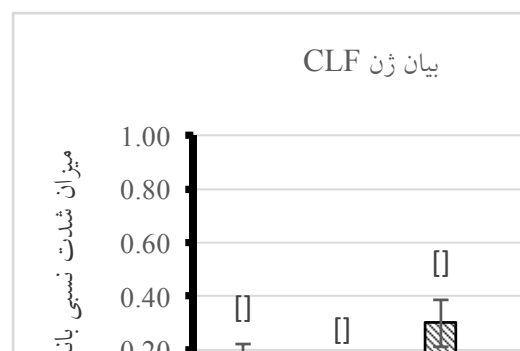
### بحث

در بیش از ۲۵ سال گذشته اطلاعات قابل توجهی از مکانیسم‌های مولکولی و ژنی تشکیل گل در گیاهان به دست آمده اما با وجود پیشرفت در شناسایی و تشخیص نحوه عملکرد ژنها، هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است که محصولات آنها در سطح مولکولی چگونه عمل می‌کنند و دارای چند نقطه هدف می‌باشند (۲۵). در فاز رویشی، مریستم رأس شاخساره به تولید برگ و مریستم‌های جانبی می‌پردازد و تشکیل گل در مریستم رأس شاخساره تحت اثر فعالیت بسیاری از ژنهای محرک و بازدارنده است (۱۲ و ۲۶). در این میان ژنهای بازدارنده، نقش به‌سزایی در عدم تشکیل گل در شرایط محیطی و وضعیت رویشی نامناسب دارند. یکی از این ژنها **CLF (CURLY LEAF)** است (۱۳ و ۲۳). در این مطالعه برای شناسایی و درک صحیح از حدود بیان آن در برخی از اندامها، ژن **CLF** در گیاه خردل سیاه به عنوان ژن هم‌ساخت **CLF** گیاه آرابیدوپسیس و سایر گیاهان شناسایی گردید. با شناسایی توالی یابی قطعه اختصاصی ۶۶۵ جفت بازی، حضور ژن هم‌ساخت **CLF** در گیاه خردل سیاه (*Brassica nigra*) به اثبات رسید و با نام **bnCLF** با شماره دستیابی (Accession no: KT984485) در بانک ژن ثبت شد. اهمیت گیاه خردل سیاه به جهت ارزش صنعتی (تهیه صابون و روغن) و تولید داروهای گیاهی باعث شده که کاشت این گیاه از این نظر مفید واقع گردد و همچنین به دلیل هم‌خانواده بودن با گیاه

مطالعات بیان ژن نشان داد که بیان ژن **CLF** و شدت آن در هر یک از مراحل نمو و در اندامهای مختلف، متفاوت است. طی فاز زایشی بیان این ژن نسبت به فاز رویشی بیشتر بوده و غنچه گل بیشترین میزان بیان را در مقایسه با سایر مراحل نمو نشان می‌دهد (شکلهای ۶ و ۷). همچنین در نمودار رسم شده، مشاهده می‌شود که میزان بیان در برگ نسبت به رأس ساقه در هر مرحله نمو متفاوت، بیشتر است (شکل ۷).



شکل ۶- میزان بیان ژن هم‌ساخت **CLF** در خردل سیاه. (۱) برگ بالغ ۱۵ روزگی رویشی. (۲) رأس ساقه ۱۵ روزگی رویشی (۳) برگ بالغ ۲۵ روزگی زایشی. (۴) رأس ساقه ۲۵ روزگی زایشی. (۵) غنچه گل (۶) کنترل منفی. در تمامی واکنشها کنترل مثبت، ژن **ACTIN 7** در نظر گرفته شده است.



شکل ۷- شدت نسبی بیان ژن هم‌ساخت **CLF** در خردل سیاه با استفاده از نرم‌افزار **ImageJ** و آزمون **Duncan** ( $P < 0.05$ ). (۱) برگ بالغ ۱۵ روزگی رویشی. (۲) رأس ساقه ۱۵ روزگی رویشی (۳) برگ بالغ ۲۵ روزگی زایشی. (۴) رأس ساقه ۲۵ روزگی زایشی. (۵)

مطالعه بیان این ژن و بیان بالای آن در مرحله زایشی و غنچه گل نسبت به مرحله رویشی می‌تواند تأیید کند که ژن CLF در مرحله زایشی و گل‌دهی نقش مؤثری دارد و به احتمال زیاد پروتئین آن در این مراحل، اثر سرکوب‌گر روی ژن AG دارد. برخی محققین اثر مهارتی این ژن را روی حلقه‌های ۱ و ۲ گل نشان دادند (۱۳، ۲۳ و ۲۹). گزارش شده است که علاوه بر سرکوب ژن آگاموس، بیان ژن SHOOT MERISTEMLESS (STM) به صورت مستقیم توسط این ژن سرکوب می‌گردد. بنابراین با توجه به بیان آن در این مراحل نمو، فعالیت و نقش این ژن پررنگ‌تر شده است (۱۸ و ۳۰). و از طرفی بیان کم ژن CLF در طی نمو برای سرکوب برخی از ژن‌ها لازم است (۱۹) و (۲۱). بنابراین با توجه به نقش ژن CLF بر ژن‌های محرک گل‌دهی و بازدارندگی آن، می‌توان با سرکوب و خاموش کردن آن، گل‌دهی را در بسیاری از گیاهان سریع‌تر کرد، همان‌طور که محققین با خاموش‌سازی این ژن در گیاه آرابیدوپسیس گل‌دهی را سریع‌تر کردند و این ویژگی از نظر اقتصادی برای کاشت گیاهان با دوره کوتاه رویشی و همچنین تولید سریع دانه در پایان یک فصل زراعی می‌تواند به صرفه باشد (۲).

مدل آرابیدوپسیس از نظر تحقیقاتی و آزمایشات مولکولی مورد توجه است (۲۸).

اثر بازدارندگی ژن CLF با اتصال فاکتور رونویسی آن به کمپلکس دیگری به نام PRC2 آغاز می‌شود. مجموعه CLF-PRC2 با فعالیت خود سبب عدم تغییر فاز رویشی به زایشی می‌گردد. در حقیقت پروتئین CLF از جمله فاکتورهای مهمی بوده که با عملکرد قوی اثر خود بر روی ژن FT، مهارکننده تشکیل گل است و این گذر را به تأخیر می‌اندازد (۲، ۱۴ و ۱۸).

وجود شباهت بسیار بالای توالی نوکلئوتیدی و توالی پروتئینی bnCLF با سایر گیاهان نشان داد که این ژن از نظر توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی با هم‌ساخت CLF در دیگر گیاهان مانند *Arabidopsis thaliana* و *Brassica rapa* مشابه است و نمودار فیلوژنتیکی نیز نشان داد که این ژن در خردل سیاه، از نظر توالی نوکلئوتیدی، نزدیکی بسیار زیادی با توالی ژن هم‌ساخت CLF دیگر گونه‌های هم‌خانواده خود در تیره Brassicaceae و راسته Brassicales دارد. بنابراین به احتمال که این توالی شناسایی شده، ژن هم‌ساخت CLF در گیاه خردل سیاه است و مانند ژن هم‌ساخت CLF در دیگر گیاهان هم‌خانواده، نقش بازدارندگی گل‌دهی و مهارکنندگی دیگر ژن‌ها را دارد.

## منابع

- ۱- جدیر، س. و دهقان نیری، ف. ۱۳۹۴. بررسی بیان ژن‌های عوامل رونویسی MADS-box مؤثر در تشکیل گل در زعفران (*Crocus sativus* L.) مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، جلد ۲۸، شماره ۴. ص ۴۸۸-۴۹۹.
- ۲- دیدار، ن.، پژوهنده، م. و محمودی، ف. ۱۳۹۳. ایجاد گیاهان زودگل‌ده آرابیدوپسیس از طریق خاموش کردن ژن CLF به روش RNA silencing. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، جلد ۶، شماره ۲. ص ۶۱-۷۴.
- ۳- زرگری، ع. ۱۳۷۶. گیاهان دارویی. چاپ هفتم، جلد ۱. انتشارات
- ۴- نژادعلیمرادی، ف.، منوچهری، خ.، نصیبی، ف.، ترکزاده ماهانی، م. و رضائزاد، ف. ۱۳۹۶. مقایسه بیان دو ژن مرجع GAPDH و EF1 $\alpha$  در کدو (*Cucurbita pepo* L.) تحت پیش تیمار اسپریمین و تنش شوری. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، آنالین.
- ۵- مظفریان، و. ا. ۱۳۹۱. شناخت گیاهان دارویی و معطر ایران. چاپ اول. انتشارات تهران: فرهنگ معاصر.
- 6- Bowman, J.L., Drews, G.N. and Meyerowitz, E.M. 1991. Expression of the Arabidopsis floral homeotic gene AGAMOUS is restricted to specific cell types late in flower development.

- The Plant cell, 3(8): 749–758.
- 7- Bowman, J.L., Smyth, D.R. and Meyerowitz, E.M. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of Arabidopsis. *Development*, 112(1): 1–20.
  - 8- Byzova, M.V., Franken, J., Aarts, M.G.M., De Almeida-Engler, J., Engler, G., Mariani, C., Van Lookeren Campagne, M.M. and Angenent, G.C. 1999. Arabidopsis STERILE APETALA, a multifunctional gene regulating inflorescence, flower, and ovule development. *Genes and Development*, 13(8): 1002–1014.
  - 9- Coen, E.S. and Meyerowitz, E.M. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353(6339): 31–37.
  - 10- Drews, G.N., Bowman, J.L. and Meyerowitz, E.M. 1991. Negative regulation of the Arabidopsis homeotic gene AGAMOUS by the APETALA2 product. *Cell*, 65(6): 991–1002.
  - 11- Franks, R.G., Wang, C., Levin, J.Z. and Liu, Z. 2002. SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with LEUNIG. *Development (Cambridge, England)*, 129(1): 253–263.
  - 12- Glover, B. 2014. *Understanding Flowers and Flowering*. 2nd ed. New York: Oxford University Press.
  - 13- Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M. and Coupland, G. 1997. A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in Arabidopsis. *Nature*, 386(6620): 44–51.
  - 14- He, Y. 2009. Control of the transition to flowering by chromatin modifications. *Molecular Plant*, 2(4): 554–564.
  - 15- Heo, J.B. and Sung, S. 2011. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6013): 76–9.
  - 16- Huijser, P. and Schmid, M. 2011. The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, 138(19): 4117–4129.
  - 17- Hyndman, D.L. and Mitsuhashi, M. 2015. *PCR Primer Design*. Humana Press.
  - 18- Jiang, D., Wang, Y., Wang, Y. and He, Y. 2008. Repression of FLOWERING LOCUS C and FLOWERING LOCUS T by the Arabidopsis Polycomb Repressive Complex 2 Components. *PLoS ONE*, 3(10): e3404.
  - 19- Kim, G.-T., Tsukaya, H. and Uchimiya, H. 1998. The CURLY LEAF gene controls both division and elongation of cells during the expansion of the leaf blade in Arabidopsis thaliana. *Planta*, 206(2): 175–183.
  - 20- Krizek, B.A., Prost, V. and Macias, A. 2000. AINTEGUMENTA promotes petal identity and acts as a negative regulator of AGAMOUS. *Plant Cell*, 12(8): 1357–1366.
  - 21- Liu, J., Deng, S., Wang, H., Ye, J., Wu, H.-W., Sun, H.-X. and Chua, N.-H. 2016. CURLY LEAF Regulates Gene Sets Coordinating Seed Size and Lipid Biosynthesis. *Plant physiology*, 171(1): 424–36.
  - 22- Maes, T., Van de Steene, N., Zethof, J., Karimi, M., D’Hauw, M., Mares, G., Van Montagu, M. and Gerats, T. 2001. Petunia Ap2-like genes and their role in flower and seed development. *The Plant cell*, 13(2): 229–244.
  - 23- Mayama, T., Ohtsubo, E. and Tsuchimoto, S. 2003. Isolation and expression analysis of petunia CURLY LEAF-like genes. *Plant and Cell Physiology*, 44(8): 811–819.
  - 24- Meyerowitz, E.M., Bowman, J.L., Brockman, L.L., Drews, G.N., Jack, T., Sieburth, L.E. and Weigel, D. 1991. A genetic and molecular model for flower development in Arabidopsis thaliana. *Development (Cambridge, England)*. Supplement, 1: 157–167.
  - 25- O’Maoileidigh, D.S., Graciet, E. and Wellmer, F. 2014. Genetic Control of Arabidopsis Flower Development. *Advances in Botanical Research*, 72: 159–190.
  - 26- Ó’Maoiléidigh, D.S., Graciet, E. and Wellmer, F. 2014. Gene networks controlling Arabidopsis thaliana flower development. *New Phytologist*, 201(1): 16–30.
  - 27- Pazhouhandeh, M., Molinier, J., Berr, A. and Genschik, P. 2011. MSI4/FVE interacts with CUL4-DDB1 and a PRC2-like complex to control epigenetic regulation of flowering time in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(8): 3430–5.
  - 28- Rakow, G. 2004. Species Origin and Economic Importance of Brassica. In Pua, E-C, Douglas, C.J (eds), *Brassica*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 2004; 3–11.
  - 29- Schönrock, N., Bouveret, R., Leroy, O., Borghi, L., Köhler, C., Gruissem, W. and Hennig, L. 2006. Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes & development*, 20(12): 1667–78.

- 30- Schubert, D., Primavesi, L., Bishopp, A., Roberts, G., Doonan, J., Jenuwein, T. and Goodrich, J. 2006. Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *The EMBO journal*, 25(19): 4638–49.
- 31- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R.A. and Coupland, G. 2006. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 20(7): 898–912.
- 32- Simpson, G.G. and Dean, C. 2002. *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science*, 296(5566): 285–289.
- 33- Smyth, D.R., Bowman, J.L. and Meyerowitz, E.M. 1990. Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 2(8): 755–67.
- 34- Srikanth, A. and Schmid, M. 2011. Regulation of flowering time: All roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(12): 2013–2037.
- 35- Theißen, G. 2001. Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(1): 75–85.
- 36- Wang, J.W. 2014. Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway. *Journal of Experimental Botany*, 65(17): 4723–4730.
- 37- Zhou, C.M., Zhang, T.Q., Wang, X., Yu, S., Lian, H., Tang, H., Feng, Z.Y., Zozomova-Lihová, J. and Wang, J.W. 2013. Molecular basis of age-dependent vernalization in *Cardamine flexuosa*. *Science*, 340(6136): 1097–1100.

## Identification and the survey of gene expression **CURLY LEAF** homologous during developmental stages in vegetative and reproductive organs of *Brassica nigra* L.

Ganjalkhani Hakemi F.<sup>1,2</sup>, Rezanejad F.<sup>1</sup> and Asadi khanouki M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Young Researchers Society, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran.

### Abstract

Growing faster and mass production of seed is always notable economically, industrially and pharmaceutically. Hence, the identification of the effective genes in growth, flowering and seed production is very valuable in the plants. The **CURLY LEAF** (CLF) is a key gene due to its important role in flowering inhibition. In this research, identification of CLF gene in black mustard (*Brassica nigra* L.), due to pharmaceutical and industrial consumption and its proximity to *Arabidopsis* model plant, was studied. For gene identification studies, the total RNA was extracted from the mature leaves in the vegetative stage. Gene expression was studied using extracted RNAs from leaves and shoot tips in both vegetative and generative stages as well as flower buds. Identification and expression were investigated after cDNA synthesis using the designed primers and the RT-PCR technique. The results confirmed a specific fragment of 665 nucleotides recorded in the gene bank as bnCLF (KT984485). The studies of phylogenetic tree showed that the CLF gene of the black mustard has a close relation with Brassicaceae family but the most homology was observed with *Brassica rapa*. The higher expression of CLF was observed in leaf and shoot tip at generative phase compared with vegetative phase. Further, the highest of expression amount was seen in floral buds in generative phase than leaf and shoot tip. Therefore, it seems that it is possible to accelerate flowering in some plants by identification and repression of this gene.

**Key words:** *Brassica nigra*, Phylogenetic tree, Flowering repressor, bnCLF, RT-PCR.