

Investigating the expression of *bZIP*, *MPK6*, *Peroxidase72*, *MurG*, *Lipoxygenase*, *ACC synthase* and *ACC oxidase* as genes involved in the resistance mechanism of date palm to *Oligonychus afrasiaticus*

Ladan Kiani Kia 

M.Sc. Graduated, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail address: beauty.art8518@gmail.com

Mousa Mousavi 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail address: m.mousavi@scu.ac.ir

Karim Sorkheh 

Associate Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail address: k.sorkheh@scu.ac.ir

Abstract

Objective

In order to identify the genes involved in date palm resistance to spider mite (*Oligonychus afrasiaticus*), this research investigated the expression of selected genes.

Materials and methods

Six date cultivars (three relatively resistant cultivars and three susceptible cultivars) available in the Date and Tropical Fruits Research Institute, Ahvaz, Iran, were sampled at the end of July at the Kimmeri stage of the fruit, during mite activity. After RNA extraction and cDNA synthesis, seven genes, including *bZIP1*, *MPK6*, *Peroxidase72*, *MurG*, *Lipoxygenase*, *ACC synthase*, and *ACC oxidase*, were investigated using qRT-PCR method in both susceptible and resistant cultivars. Primers were designed and evaluated after a detailed examination of the coding regions of the selected genes and their alignment with the date palm genome by Clustal W. The relative amount of gene transcripts was determined and compared at the end of the experiment.

Results

The results showed that all the selected genes were expressed except the *MPK6* gene in Zahidi, Hallawi and Estaamaran cultivars. The *MurG* gene showed higher expression in the resistant

cultivars Zahidi, Hallawi and Estaamran than in the susceptible cultivars Liilwi, Khadrawi, and Barhee (maximum Zahidi and minimum Liilwi). The relative expression of the *Peroxidase72* gene in relatively resistant cultivars including Zahidi (100%) and the lowest relative expression of the gene in the susceptible Liilwi cultivars (76.81%). The *bZIP* gene was in relatively resistant cultivars, including Zahidi (100%) and the lowest relative expression of the gene was in the susceptible Liilwi cultivar (76.83%). The *lipoxigenase* gene was in relatively resistant cultivars, including Zahidi (100%) and the lowest relative expression of the gene was in the susceptible Liilwi cultivar (73.55%). The relative expression of the *ACC synthase* gene in relatively resistant cultivars including Zahidi (100%) and the lowest relative expression of the gene in the susceptible Liilwi cultivar (81.55%). The *ACC oxidase* gene was in relatively resistant cultivars including Hallawi (100%) and the lowest relative expression of the gene was in the susceptible Liilwi cultivar (85.39%). *MPK6* gene expression was observed in all three susceptible cultivars, but expression for this gene was not observed in all three relatively resistant cultivars.

Conclusions

Therefore, it can be concluded that the *MurG* and *bZIP* gene products play a role in up-regulating the resistance of date palm to mites, but the *MAPK6* gene product plays a role in down-regulating the resistance of date palm to mites. However, no regular pattern was observed between susceptible and relatively resistant cultivars with respect to *Peroxidase72* and *ACC oxidase* genes.

Keywords: Date palm, Gene Expression, Spider mite, *Oligonychus afrasiaticus*.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Kiani Kia L, Mousavi M, Sorkheh K (2023) Investigating the expression of *bZIP*, *MPK6*, *Peroxidase72*, *MurG*, *Lipoxigenase*, *ACC synthase* and *ACC oxidase* as genes involved in the resistance mechanism of date palm to *Oligonychus afrasiaticus*. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (3), 197-220.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (3), 197-220. DOI: 10.22103/jab.2023.21331.1475

Received: July 3, 2023.

Received in revised form: August 21, 2023.

Accepted: August 22, 2023.


Published online: September 30, 2023.



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


© the authors

بررسی بیان ژن های *ACC synthase*, *Lipoxygenase*, *MurG*, *Peroxidase72*, *MPK6* و *bZIP* و *ACC oxidase* به عنوان ژن های دخیل در مکانیسم مقاومت نخل خرما به کنه تارتن *Oligonychus afrasiaticus*

لادن کیانی کیا 


کارشناس ارشد فارغ التحصیل، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. رایانامه:

beauty.art8518@gmail.com

موسی موسوی 

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. رایانامه:

m.mousavi@scu.ac.ir

کریم سرخه 

دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. رایانامه:

k.sorkkeh@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۲ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۳۱

چکیده

هدف: به منظور شناسایی ژن های دخیل در مقاومت نخل خرما به کنه تارتن (*Oligonychus afrasiaticus*)، در راستای تعیین مکانیسم مولکولی مقاومت نخل خرما به کنه تارتن در این پژوهش بیان برخی از ژن های منتخب مورد بررسی قرار گرفت. **مواد و روش ها:** از شش رقم خرما (سه رقم نسبتاً مقاوم و سه رقم حساس) موجود در پژوهشکده خرما و میوه های گرم سیری کشور واقع در شهرستان اهواز در اواخر تیرماه و در مرحله کیمیری میوه و همزمان با فعالیت کنه نمونه برداری انجام شد. در این پژوهش پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، بیان هفت ژن شامل ژن های *Peroxidase72*، *MPK6*، *bZIP1*، *ACC synthase*، *Lipoxygenase*، *MurG* و *ACC oxidase* به روش qRT-PCR در ارقام حساس و مقاوم بررسی شدند. جهت طراحی آغازگرها پس از بررسی دقیق نواحی کدکننده ژن های منتخب (CDS) و همترازی آنها با ژنوم خرما توسط Clustal W با استفاده از پایگاه ها Primer3 و پایگاه IDT طراحی و ارزیابی نهایی شدند. پس از پایان آزمایش میزان نسبی رونوشت ژن ها تعیین و با هم مقایسه شدند.

نتایج: نتایج نشان داد که همه ژن‌های منتخب به استثنای ژن *MPK6* در ارقام زاهدی، حلاوی و استعمران دارای بیان بودند. ژن *MurG* در ارقام مقاوم شامل زاهدی، حلاوی و استعمران، بیان بیشتری نسبت به ارقام حساس شامل لیلوئی، خضراوی و برخی نشان داد (زاهدی حداکثر و لیلوئی حداقل). بیان نسبی ژن *Peroxidase72* در ارقام نسبتاً مقاوم شامل زاهدی (۱۰۰٪) و کمترین بیان نسبی ژن در رقم حساس لیلوئی (۷۶/۸۱٪) بود. ژن *bZIP* در ارقام نسبتاً مقاوم شامل زاهدی (۱۰۰٪) و کمترین بیان نسبی ژن در رقم حساس لیلوئی (۷۶/۸۳٪) بود. ژن *Lipoxygenase* در ارقام نسبتاً مقاوم شامل زاهدی (۱۰۰٪) و کمترین بیان نسبی ژن در رقم حساس لیلوئی (۷۳/۵۵٪) بود. بیان نسبی ژن *ACC synthase* در ارقام نسبتاً مقاوم شامل زاهدی (۱۰۰٪) و کمترین بیان نسبی ژن در رقم حساس لیلوئی (۸۱/۵۵٪) بود. ژن *ACC oxidase* در ارقام نسبتاً مقاوم شامل حلاوی (۱۰۰٪) و کمترین بیان نسبی ژن در رقم حساس لیلوئی (۸۵/۳۷٪) بود. بیان ژن *MPK6* در هر سه رقم حساس مشاهده شد، اما برای این ژن در هر سه رقم نسبتاً مقاوم هیچ‌گونه بیانی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: بیان برخی از ژن‌ها در ارقام حساس و مقاوم از الگوی منظمی پیروی کرده و بیان ژن‌های دیگر دارای الگوی نامنظمی بودند. بر اساس نتایج حاصل می‌توان گفت که احتمالاً نقش محصول ژن‌های *MurG* و *bZIP* به صورت تنظیم مثبت القاء مقاومت نخل خرما نسبت به کنه است اما نقش محصول ژن *MPK6* به صورت تنظیم منفی القاء مقاومت به کنه در نخل خرما است. در مورد ژن‌های *Peroxidase72* و *ACC oxidase* الگوی ثابت بین ارقام حساس و بین ارقام نسبتاً مقاوم ملاحظه نشد.

کلیدواژه‌ها: بیان ژن، کنه تارتن، نخل خرما، *Oligonychus afraasiaticus*.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: کیانی‌کیا لادن، موسوی موسی، سرخه کریم (۱۴۰۲) بررسی بیان ژن‌های *MPK6*، *bZIP*، *Peroxidase72*، *MurG*، *Lipoxygenase*، *ACC synthase* و *ACC oxidase* به عنوان ژن‌های دخیل در مکانیسم مقاومت نخل خرما به کنه تارتن *Oligonychus afraasiaticus*. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۳)، ۱۹۷-۲۲۰.

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



© the authors

مقدمه

نخل خرما با نام علمی *Phoenix dactylifera* L. گیاهی چندساله، تک لپه و دو پایه متعلق به خانواده Aricaceae است که تعداد کروموزوم‌های آن $2n=36$ است (Khanam et al. 2012). نخل خرما از هزاران سال پیش کشت و اکنون دارای بیش

از ۳۰۰۰ گونه در سراسر جهان است. منشأ اصلی نخل خرما مناطق خشک و نیمه‌خشک غرب آسیا و شمال آفریقا است (Mohan Jain 2006). این گیاه در سراسر خاورمیانه، شمال آفریقا و ساحل جنوبی، ناحیه شرق و جنوب آفریقا و حتی در نواحی خاصی از اروپا و ایالات متحده آمریکا در سطح جهان پراکنده است و ایران یکی از مراکز مهم تولید این محصول است (Gurevich et al. 2005; Mohan Jain 2006). نخل خرما درختی چند منظوره است، به عبارت دیگر مصرف غذایی، دارویی و زینتی دارد (Al-Khayri et al. 2015; Al-Khayri & Naik 2017). ترکیبات فنلی موجود در خرما، تاثیرات مثبت بر سلامت انسان دارد و علیه سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی عمل می‌کند (Vayalil 2012). ترکیبات عمدۀ پلی‌فنول‌های خرما شامل پی-کوماریک اسید، فرولیک اسید و مشتقات سینامیک اسید می‌باشد.

کنه تارتن خرما (*Oligonychus afrasiaticus* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) از آفات مهم خرما بوده و بالاترین گسترش و خسارت را روی ارقام مهم تجاری مانند برخی، مضافتی و کبکاب در کشور به وجود می‌آورد (Arbabi et al. 2017). این آفت البته به همراه بیماری‌ها خسارت اقتصادی زیادی به تولیدکنندگان وارد می‌کنند که گاهی ممکن است حدود ۵۲ درصد از کل عملکرد را شامل شود. خسارت این کنه نیز از کشورهای الجزایر و عراق گزارش شده است (Buxton 1920). این آفت ابتدا با جنس *Paratetranychus* از آمریکا معرفی و با انجام بررسی‌های تاکسونومیک بیشتر، این گونه مجدداً با جنس *Oligonychus* معرفی شد (Pritchard 1955). کنه تارتن خرما یکی از آفات مهم درختان خرما در عربستان سعودی و بیشتر نواحی آفریقای شمالی و خاورمیانه (Negm et al. 2014; Aldosari 2009; Ben Chaaban et al. 2011; Chaaban et al. 2012) است. آمریکا، کشورهای آسیای مرکزی (Bolland et al. 1998) و در اسپانیا (Triki et al. 2003) است.

در طی مدت طولانی تعامل و همزیستی با حشرات گیاه‌خوار، گیاهان طیف وسیعی از مکانیسم‌های دفاعی را برای مقابله با حمله حشرات به دست آورده‌اند. گیاهان یک سیستم ایمنی ذاتی قوی دارند که از طریق آن مولکول‌ها و سلول‌های آسیب دیده را تشخیص می‌دهند که پاسخ‌های دفاعی آنها را فعال می‌کند (Howe & Jander 2008). گیاهان انواع مختلفی از مکانیسم‌های دفاعی را برای دفاع از خود در برابر حمله آفات دارند. این موارد شامل ساختاری از قبیل خارها، پوشش‌های مومی، کرکی و نیز مکانیسم‌های دفاعی مبتنی بر پروتئین‌ها و مواد شیمیایی است (Wittstock & Gershenzon 2002; Pedras & Yaya 2015; Lev-Yadun 2016). مواد شیمیایی در گیاه شامل متابولیت‌های ثانویه هستند، که عمدتاً شامل ترپن‌ها، بنزوئیدها، فنیل پروپانوئیدها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدها و غیره است (Alseekh & Fernie 2018; Wang et al. 2019). هنگامی که گیاه حمله را تشخیص می‌دهد، بیان برخی از ژن‌ها را القاء می‌کند که ترکیبات دفاعی را کد می‌کنند. این ترکیبات دفاعی (فیتوالکسین‌ها) می‌توانند نقش عملکردی مهمی را به عنوان یک روش بازدارنده تغذیه‌ای داشته باشند (Yactayo-Chang et al. 2020).

عوامل رونویسی bZIP به طور گسترده‌ای در ژنوم‌های یوکاریوتی مشخص شده‌اند و نشان داده شده که می‌توانند نقش مهمی در رشد گیاه، فرآیندهای فیزیولوژیکی و واکنش‌های تنش‌زای زیستی و غیرزیستی ایفا کنند (Wang et al. 2015). ژن‌های کد کننده عوامل رونویسی bZIP، به طور گسترده در گیاهان آرابیدوپسیس، برنج، سورگوم، ذرت، انگور، خیار، دانه کرچک و جو

شناسایی شده‌اند و در فرآیندهای زیستی مختلف از جمله تمایز بافت، جنین‌زایی، رشد و نمو و بلوغ بذر، تنظیم ژن پروتئین ذخیره‌ای، گلدهی و توسعه آوندی نیز دخالت دارند (Walsh et al. 1998; Chuang et al. 1999; Abe et al. 2005; Shen et al. 2007). علاوه بر این، عوامل رونویسی bZIP به عنوان تنظیم کننده‌های مهم در پاسخ به محرک‌های زیستی و غیرزیستی، شامل آبسزیک اسید، کمبود اکسیژن، خشکی، شوری، تنش سرمایی، پیامدهی یا انتقال پیام نوری، تنش اسمزی و دفاع در برابر پاتوژن‌ها هستند (Uno et al. 2000; Schmutz et al. 2010; Wei et al. 2012). ژاو و همکاران در گیاه نخل روغنی به شناسایی فاکتورهای رونویسی bZIP پرداختند و مشخص کردند که بیان این ژن‌ها تحت شرایط خشکی، سرما و شوری به شدت افزایش می‌یابد (Zhou & Yarra 2022).

MAPKها (پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن) انتقال دهنده پیام در مسیرها هستند و از یک پروتئین کیناز غنی از اسیدهای آمینه سرین و ترئونین تشکیل شده‌اند. مسیرهای MAPK دارای تنظیم‌کنندگی مثبت و منفی در گیاهان هستند. تنظیم مثبت MAPK کمک به تنش‌های محیطی است در حالی که تنظیم منفی MAPK مربوط به مقدار زیادی اکسیژن فعال (ROS) در گیاه است. MAPK در سلول‌های یوکاریوتی یافت می‌شود. مسیرهای MAPK در گیاهان به عنوان تنظیم کننده رشد سلولی، توسعه سلولی، مرگ سلولی و پاسخ سلولی به محرک‌های محیطی شناخته شده است. رایج‌ترین MAPKهای مورد مطالعه MPK3، MPK4 و MPK6 هستند که توسط انواع محرک‌ها، از جمله تنش‌های غیرزیستی، عوامل بیماری‌زا و عوامل تنش‌زا فعال می‌شوند. MPK4 سیگنالینگ تنش زنده را به طور منفی تنظیم می‌کند، در حالی که MPK3 و MPK6 به عنوان واسطه‌های مثبت پاسخ‌های دفاعی عمل می‌کنند (Pearson et al. 2001).

ژن *MurG* به عنوان ترانسفراز واسطه، تبدیلات لیپیدی در مسیر سنتز پپتیدوگلیکان را کاتالیز می‌کند. مطالعات اخیر نشان داده است که مجموعه تقریباً کاملی از ژن‌های سنتز پپتیدوگلیکان (۹ ژن از ۱۰ ژن) در چندین ژنوم از نهان‌دانگان تک و دو لپه‌ای شناخته شده است (Tran et al. 2023). نسخه‌های گیاهی ژن *MurG* که در بخشی از فرآیند تشکیل دیواره سلولی در باکتری‌ها نقش دارد، شناسایی شده است، که همانند نقش آن‌ها در باکتری‌ها عمل می‌کند و باعث ایجاد مقاومت نسبت به تنش‌ها می‌شود (Garcia et al. 2008). پراکسیدازها در حذف H_2O_2 ، کاهش اکسیداسیون‌های سمی، بیوسنتز و تجزیه لیگنین، چوب پنبه‌ای شدن، کاتابولیسم اکسین، پاسخ به تنش‌های محیطی مانند زخم، حمله پاتوژن و تنش اکسیداتیو نقش دارند. پراکسیدازهای کلاس سه، گلیکوپروتئین‌هایی هستند که نقش مهمی در بلوغ دیواره سلولی مانند تشکیل لیگنین دارند. پراکسیدازها معمولاً بصورت تعداد زیادی ایزوآنزیم وجود دارند، که اختصاص وظایف خاص به ایزوآنزیم‌های پراکسیداز را پیچیده می‌کند. ژنوم آرآبیدوپسیس برای ۷۳ پراکسیداز کدگذاری شده که در بین آنها AtProx72 در لیگنینی شدن شرکت دارد (Fernández-Pérez et al. 2015).

استفاده از گیاهان مقاوم کمک می‌کند تا کشاورزان با کاهش استفاده از سموم، بهتر و موثرتر در کنترل آفات عمل کنند. استفاده از این ارقام همچنین منجر به حفظ تنوع زیستی و جلوگیری از بروز مقاومت آفات می‌شود (Treviño-Barbosa et al. 2022). به علاوه، مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم بیان ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi 2020; Safaei et al. 2022). ماده ژنتیکی یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ‌گاه همه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در هر لحظه فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Arabpour et al. 2021; Mohammadabadi et al. 2021). محیطی که موجود در آن رشد می‌کند مشخص می‌کند که آیا ژن بیان شود و یا این که نیازی به فرآورده آن نیست و باید غیرفعال و یا خاموش شود. ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد (Mohammadabadi et al. 2018; Masoudzadeh et al. 2020). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل عوامل متعددی است. در هر یک از انواع بافت‌ها تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد. بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi 2021; Shahsavari et al. 2021). یکی از اقدامات اساسی در بهنژادی ملکولی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflaei 2022; Shahsavari et al. 2020). بنابراین، هدف از این پژوهش بررسی بیان برخی از ژن‌های دخیل در مقاومت یا حساسیت خرما در راستای ارائه مدل برای مکانیسم مولکولی مقاومت نخل خرما به کنه تارتن است.

مواد و روش‌ها

زمان و مکان اجرای پژوهش: نمونه‌های گیاهی شامل پوست میوه درخت خرما از دو رقم خیلی حساس (لیلوی و خضراوی)، یک رقم نسبتاً حساس (برحی)، دو رقم خیلی مقاوم (حلاوی و زاهدی) و یک رقم نسبتاً مقاوم (استمران) به کنه از پژوهشکده خرما و میوه‌های گرم‌سیری و نیمه‌گرم‌سیری کشور واقع در شهرستان اهواز تهیه شدند. نمونه‌برداری در اواخر تیرماه ۱۴۰۰ از پوست میوه نخل خرما صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله داخل ظرف حاوی نیتروژن مایع قرار داده شد و پس از انتقال به آزمایشگاه، به فریزر ۸۰- منتقل شدند.

مطالعات بیوانفورماتیکی: به منظور ایجاد درک صحیحی از مکانیسم‌های عمومی و مولکولی مقاومت گیاهان نسبت به حشرات به خصوص کنه‌ها مطالعات بیوانفورماتیکی به منظور بررسی ژن‌های مرتبط بر پایه مکانیسم‌های بررسی شده، پرداخته شد. سپس نواحی کدکننده ژن‌های مورد بررسی (CDS) به طور دقیق مورد بررسی قرار گرفت. همترازی CDSهای بررسی شده با

ژنوم خرما جهت یافتن ژن مرتبط در ژنوم خرما توسط Clustal W انجام شد. مدل پروتئینی CDS ژن‌های انتخاب شده براساس توالی ژنوم خرما با استفاده از پایگاه SWISS-MODEL تعیین شد. تعیین دامنه‌های حفاظت شده با استفاده از پایگاه NCBI ExPasy (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) و چارچوب‌های خوانش ژن‌های انتخاب شده با استفاده از پایگاه ExPasy (<http://www.expasy.com>) مورد بررسی قرار گرفت. سپس برای ژن‌های اساسی در مکانیسم‌های مختلف با استفاده از پایگاه‌ها Primer3 (www.primer3.com)، آغازگرهای مناسب طراحی و توسط پایگاه اطلاعاتی IDT آغازگرهای طراحی شده مورد ارزیابی نهایی قرار گرفتند. آنالیز آماری بیان ژن‌های منتخب مربوط به Real Time-PCR با استفاده از طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تجزیه و تحلیل شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج GeneAll® (Cat No. 307-150)

(Ribospin™ Plant) (کره جنوبی- سئول) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پس از بررسی کیفی و کمی RNAهای استخراجی با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و اسپکتروفوتومتر (شکل ۱)، سنتز cDNA با استفاده از کیت Anacel (Lot N:cs0025) (ایران - تهران) طبق دستورالعمل صورت گرفت.

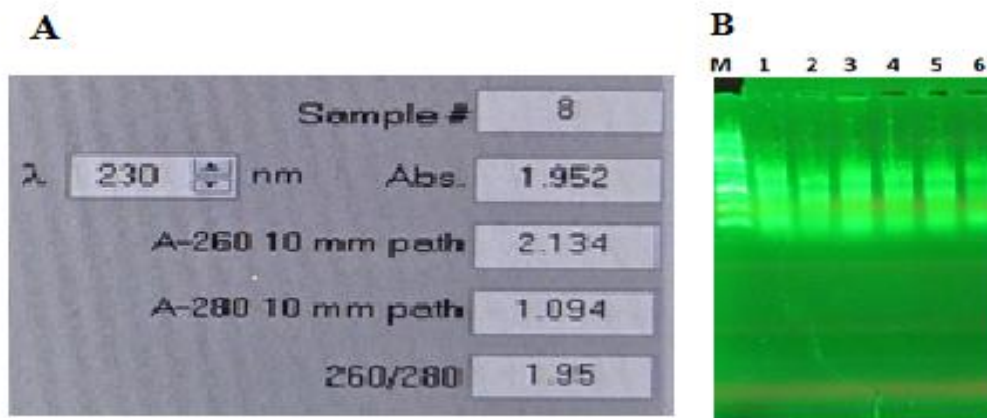
انجام واکنش PCR در زمان واقعی: برای اندازه‌گیری مقدار رونویسی از هر ژن واکنش PCR در زمان واقعی با

استفاده از دستگاه Step One Plus شرکت ABI (آمریکا- ماساچوست) و با اجزاء واکنش به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. بدین منظور cDNA ساخته شده به‌عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت و واکنش‌های qRT-PCR با آغازگرهای اختصاصی هر ژن و ژن کنترل داخلی ۱۸S (جدول ۱) انجام شد. جهت تطابق دمایی نقطه ذوب آغازگرهای ژن‌های مورد آزمایش و ژن مرجع الگوی دمایی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای هر واکنش ۳ تکرار در نظر گرفته شده بود. حجم مخلوط واکنش برای هر نمونه، ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBER Green، ۲ میکرولیتر از cDNA سنتز شده، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیش‌رو و پس‌رو با غلظت ۱۰ میکرومول، ۱۱ میکرولیتر آب مقطر استریل فاقد RNase، بود. واکنش PCR در زمان واقعی با شرایط ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشت سازی اولیه و ۴۰ تکرار با چرخه‌های ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشت سازی، ۶۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال آغازگرها به الگو و تکثیر توالی‌ها انجام شد. منحنی‌های تکثیر و تفکیک با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم و آنالیز شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای محاسبه میزان رونوشت ژن‌های مورد آزمایش از روش لیواک (Livak and

Schmitgen, 2008) و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد. برای حذف خطای ناشی از تفاوت‌های جزئی احتمالی در غلظت cDNA الگو به دلیل اختلافات جزئی در مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA در نمونه‌های مختلف، ابتدا چرخه آستانه (Ct) برای نمونه‌های مختلف با استفاده از ژن مرجع rRNA ۱۸S نرمال‌سازی شد. انتخاب ژن مرجع بر اساس کارهای قبلی نویسندگان و همچنین مقالات منتشر شده در خصوص بیان ژن در نخل خرما انجام شد (Patankar et al. 2016). سپس تفاوت نسبی در

میزان بیان ژن هدف به صورت درصد در نمونه‌های مورد مطالعه محاسبه شد. جهت مقایسه آماری میزان بیان ژن‌ها از طرح کاملا تصادفی با سه تکرار استفاده گردید. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از برنامه SAS 9.3 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت.



شکل ۱. (A) تصویر خروجی نانودراپ برای یک نمونه RNA استخراج شده و (B) الکتروفورز ژل آگارز RNA استخراج شده از شش رقم مورد آزمایش. M- سایز مارکر، ۱- لیلوی، ۲- خضراوی، ۳- برحی، ۴- حلاوی، ۵- استعمران و ۶- زاهدی

Figure 1. Image of Nano Drop output for an extracted RNA sample (A) and agarose gel electrophoresis of RNA extracted from six cultivars tested. M. size marker, 1. Liilwi, 2. Khadrawi, 3. Barhee, 4. Hallawi, 5. Estaamaran, and 6. Zahidi (B)

نتایج و بحث

بررسی بیان ژن *MurG* در پوست میوه نارسی خرما: اختلاف بیان ژن بین ارقام مورد بررسی بر پایه‌ی آنالیز تجزیه واریانس در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). ارقام مقاوم‌تر بیان بیشتری نسبت به ارقام حساس‌تر داشتند. بیشترین میزان بیان این ژن مربوط به رقم زاهدی (۳۶/۸۷) بوده و کم‌ترین میزان بیان این ژن مربوط به رقم لیلوی (۲۶/۹۵) است. برای مقایسه بیان نسبی ژن *MurG* در شش رقم مورد مطالعه، حداکثر بیان که مربوط به رقم زاهدی بود ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و بیان این ژن در ارقام دیگر بر حسب درصد نسبت به رقم زاهدی مشخص شدند (شکل ۲). همولوگ ژن‌های *Mur* با ساخت و اصلاح دیواره سلولی در گیاهان نقش‌های مهمی در مقاومت گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند. این ژن‌ها تأثیر مستقیمی بر مقاومت گیاهان ندارند، اما از طریق تأثیر بر ترکیب و ساختار دیواره سلولی، می‌توانند مقاومت گیاهان را در برابر بیمارگران و تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی و شوری تقویت کنند. این موضوع نشان می‌دهد که درک از نقش ژن‌های مرتبط با دیواره سلولی می‌تواند در بهبود

مقاومت گیاهان به شرایط تنش مفید واقع شود (Ezquer et al. 2020). گارسیا گزارش داده است که ژنوم آرابیدوپسیس حاوی یک ژن مشابه باکتری *MurE:AtMurE* است.

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن های دخیل در مقاومت نخل خرما به کنه تارتن در بافت پوست میوه نارس

Table 1. Oligonucleotide primer pairs used for expression of genes involve in tolerance of date palm to spider mite, in the immature fruit peel tissue

طول قطعه تکثیری Amplicon length (bp)	دمای اتصال Annealing temperature °C	توالی آغازگرها Primers sequence	شماره دسترسی ژن Accession no.	نام ژن Gene name
397	58	F- CATTGGAGGGCAAGTCTGGT R-TCGCAGTGGTTCGTCTTTCA	XR_00551038 6	<i>18S</i>
239	58	F- TACTGGAATGGAAGGGGATG R- ACATCTTTGGTTGCGAGTCC	XM_0268084 48	<i>bZIP1</i>
250	58	F- TTCTCGCCTTCAATGCTTGC R- ATGTACCAGTCCTCGTGCTC	XM_0088109 58	<i>MurG</i>
168	58	F- TGTTGGATAGCAGCGGAAG R- TCGTGGAAATCTCTAGCAGCA	XM_0087867 43	<i>Peroxidase 72</i>
542	58	F- ACTAACGAGAGCGTTGCGAT R- GGGAAGAGTGGCTTACGGTC	AY120737	<i>MPK6</i>
111	58	F- CTCTGTGAAGTCTGGAGGTG R- AGCCCAAGGACCATATTAGC	XM_0088055 17	<i>ACC synthase</i>
156	58	F-ACCTGCACCACCATCATCTG R- TTCGGTCTTCAGCATCTCGT	XM_0087793 92	<i>Lipoxygenase</i>
210	58	F- TGTTTCTTTGAGCTGCTGA R- ATGTTGGA CT CGGGGAGATG	XM_0088052 97	<i>ACC oxidase</i>

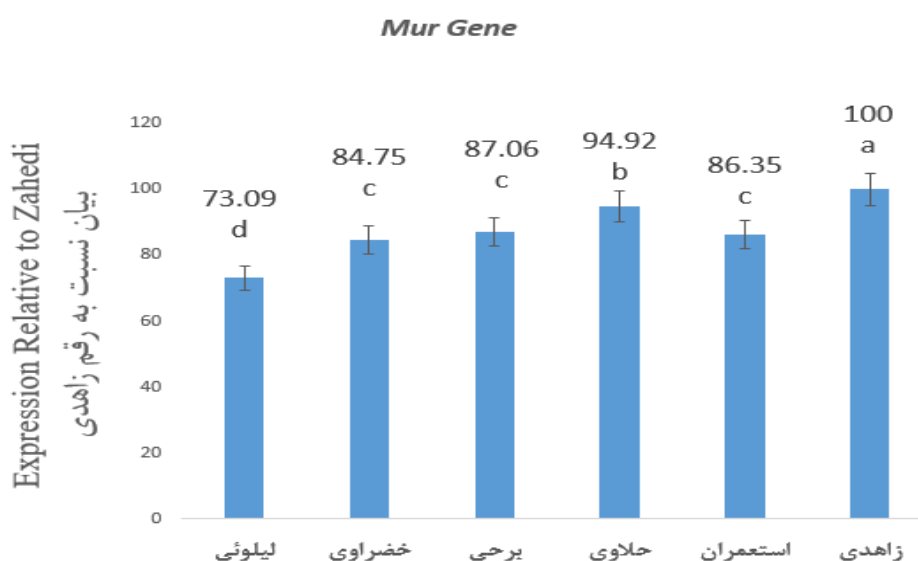
در شرایط عادی در برگ‌ها و گل‌ها بیان می‌شود، اما در ریشه و یا ساقه بیان نمی‌شود. در این مطالعه برای تجزیه و تحلیل روابط عملکردی بین ژن‌های *MurE* سیانوباکتری‌ها، خز و گیاهان پیشرفته‌تر، آزمایش انجام شد که نتایج نشان داد ژن *AtMurE* از لحاظ عملکردی با پروتئین‌های *MurE* باکتریایی و خزهای متفاوت است (Garcia et al. 2008). در مطالعه‌ای

Lin et al. (2017)، تعداد ده همولوگ برای ژن های Mur باکتریایی شامل *MurE* را در ژنوم *Pinus* و *Picea abies* شناسایی کردند. آنها گزارش دادند که این ژن ها در حفاظت و بقاء سیستم PG پلاستییدی بازدانگان نقش دارند (Lin et al. 2017). منجین و همکاران گزارش داده اند غیرفعال شدن ژن *MurG* به سرعت سنتز پپتیدوگلیکان را در سلول های در حال رشد مهار می کند، در نتیجه، تغییرات مختلفی در شکل سلول مشاهده می شود (Mengin-Lecreux et al. 1991).

بررسی بیان ژن *Peroxidase72* در پوست میوه نارس خرما: اختلاف بیان ژن بین ارقام مورد بررسی بر پایه ی آنالیز تجزیه واریانس در سطح ۵ درصد معنی دار شد (جدول ۲). ارقام مقاوم تر بیان بیشتتری نسبت به ارقام حساس تر داشتند. بیشترین میزان بیان این ژن مربوط به رقم زاهدی (۲۹/۵) و کمترین میزان بیان این ژن مربوط به رقم لیلوئی (۲۲/۶۶) است. برای مقایسه بیان نسبی ژن *Peroxidase72* در شش رقم مورد مطالعه، حداکثر بیان که مربوط به رقم زاهدی بود ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و بیان این ژن در ارقام دیگر بر حسب درصد نسبت به رقم زاهدی مشخص شدند (شکل ۳). فرناندز و همکاران گزارش داده اند، ژنوم آراییدوپسیس برای ۷۳ پراکسیداز کدگذاری شده، که در بین آن ها *AtProx72* در لیگینی شدن شرکت می کند و اختلال در *AtProx72* باعث نازک شدن دیواره های ثانویه در بین دسته جات شده است و سرکوب *AtProx72* منجر به کاهش مسیر بیوسنتز لیگنین و همچنین ژن ها و عوامل رونویسی در ضخیم شدن دیواره ثانویه شده است (Fernández-Pérez et al. 2015). مهمترین پراکسیدازها، پراکسیداز کاتیونی از *Zinnia elegans* یا ZEPRX است. این آنزیم مسئول مرحله نهایی لیگینی شدن در گیاه است. تحقیقات نشان داده که پراکسیداز ۷۲ آراییدوپسیس (*AtPRX72*) یک همولوگ ZEPRX است، همچنین نقش مهمی در لیگینی شدن ایفا می نماید. به خوبی معلوم شده که لیگنین یک پلیمر بوده و از مشتقات الکل های فنولیک تشکیل شده است. این ماده چگالی سلول های چوبی را افزایش می دهد و بنابراین باعث افزایش سفتی دیواره سلولی می شود و از این طریق گیاه را در برابر عوامل مکانیکی مقاوم کرده و مانعی برای عوامل بیماری زا و آفات بشمار می رود (Sobiech et al. 2022).

بررسی بیان ژن *bZIP* در پوست میوه نارس خرما: نتایج نشان داد که اختلاف بیان ژن بین ارقام مورد بررسی بر پایه ی آنالیز تجزیه واریانس در سطح ۵ درصد معنی دار شد (جدول ۲) به طوری که در ارقام مقاوم تر نسبت به کنه تارتن از بیان بیشتتری برخوردار بود. رقم زاهدی دارای بیشتترین میزان بیان (۳۵/۱۴) و کمترین میزان بیان این ژن به رقم لیلوئی (۲۵/۷۶) تعلق داشت. بیان نسبی ژن *bZIP* در شش رقم مورد مطالعه، از طریق مقایسه با رقم زاهدی که دارای حداکثر بیان بوده و ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد، انجام شد و میزان رونوشت های این ژن در ارقام دیگر به صورت درصد نسبت به رقم زاهدی مشخص شدند (شکل ۴). عامل رونویسی *bZIP1* در فعال کردن ژن های مسیر پیام رسانی کربوهیدرات، پیام رسانی در شرایط تنش و رشد و نمو گیاه دخیل است. بیان ژن کد کننده این پروتئین در حضور قند کاهش پیدا می کند (Kang et al. 2010). بنابراین فعالیت زیاد این ژن در ارقام مقاوم خرما ممکن است در ارتباط با میزان کم قند در پوست میوه باشد. لیاوو و همکاران گزارش داده اند، در سویا

سه نسخه متفاوت از ژن *bZIP* یافت شد که به عنوان تنظیم‌کننده منفی مسیر انتقال پیام آبسیزیک اسید عمل می‌کنند. تراریخته کردن آرآبیدوپسیس با این ژن‌ها باعث تحمل شوری و یخ‌زدگی بیشتر در این گیاه می‌شود (Liao et al. 2008). عظیم و همکاران خانواده ژنی *bZIP* را در سه رقم پنبه، از لحاظ روابط فیلوژنتیکی پروتئین‌های مربوطه، موقعیت کروموزومی، تحلیل ساختار ژن‌ها، تحلیل و آنالیز نقش ژن مورد نظر را مورد مطالعه قرار دادند (Azeem et al. 2020). عوامل رونویسی *bZIP* نقش مهمی در تنظیم بیان ژن در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان، از جمله حمله حشرات، دارند. آنها به تنظیم ژن‌های مرتبط با مقابله با حشرات، انتقال پیام، ارتباط هورمونی و واکنش به تنش‌های مختلف کمک می‌کنند. هدف آنها افزایش مقاومت و تحمل گیاهان در برابر حشرات و شرایط تنش است (Alves et al. 2013).

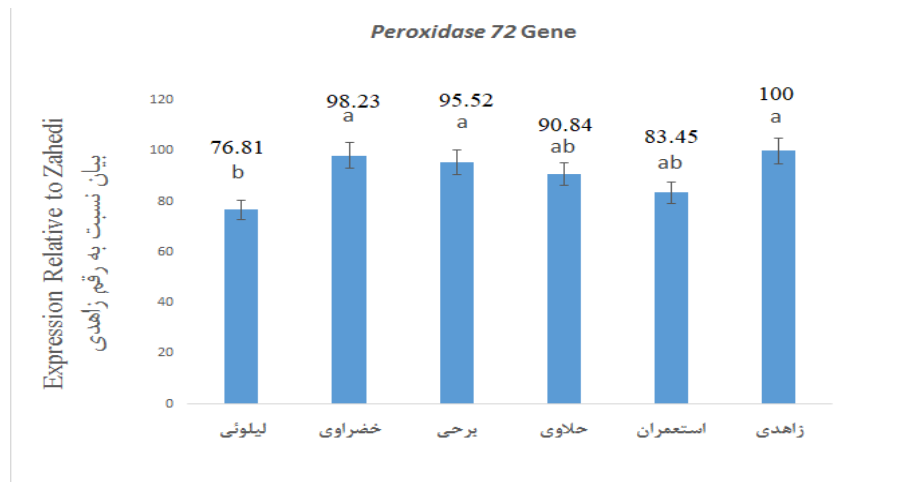


شکل ۲. درصد بیان ژن *MurG* نسبت به رقم زاهدی در پوست میوه خرما نارس، ستون‌هایی با حروف مختلف به‌طور معنی‌داری متفاوت بوده و در حروف یکسان معنی‌دار نیستند. این تفاوت بین میانگین‌ها در $p < 0.05$ (آزمون دانکن) مقایسه شد

Figure 2. The percentage of *MurG* gene expression compared to the Zahidi cultivar in the peel of immature date fruit. Bars with different letters are significantly different, and the same letters are non-significant. Differences between means were compared at $p < 0.05$ (Duncan's test)

بررسی بیان ژن *MPK6* در پوست میوه نارس خرما: بیان ژن *MPK6* در هر سه رقم حساس مشاهده شد، اما برای این ژن در هر سه رقم نسبتاً مقاوم هیچ‌گونه بیانی مشاهده نشد. تکرار qRT-PCR با غلظت ۲ و ۳ برابر cDNA برای این ژن نیز منجر به تکثیر قطعه و بیان نشد (شکل ۵). در مطالعه‌ای Yang et al. (2020) گزارش داده‌اند، متابولیت‌های ثانویه

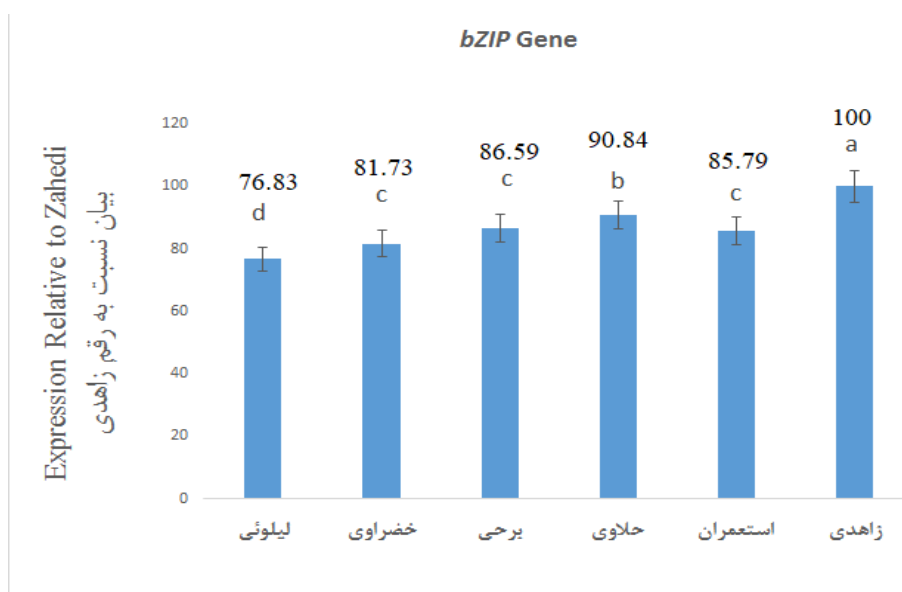
گیاهی، به واسطه ایندول گلوکوسینولات (IGS) و کامالکسین، نقش‌های مهمی در ایمنی گیاهی آرابیدوپسیس ایفا می‌کنند. در تنظیم زیست سنتز IGS و کامالکسین در پاسخ به *Botrytis cinerea* (کپک خاکستری)، دو پروتئین کیناز وابسته به پروتئین میتوژنیک (MAPK) به نام MPK3 و MPK6 اهمیت دارند (Yang et al. 2020).



شکل ۳. در صد بیان ژن *Peroxidase 72* نسبت به رقم زاهدی در پوست میوه خرمای نارس، ستون‌هایی با حروف مختلف به‌طور معنی‌داری متفاوت بوده و در حروف یکسان معنی‌دار نیستند. این تفاوت بین میانگین‌ها در ($p < 0.05$ آزمون دانکن) مقایسه شد

Figure 3. The percentage of *Peroxidase 72* gene expression compared to the Zahedi cultivar in the peel of immature date fruit. Bars with different letters are significantly different, and the same letters are non-significant. Differences between means were compared at $p < 0.05$ (Duncan's test)

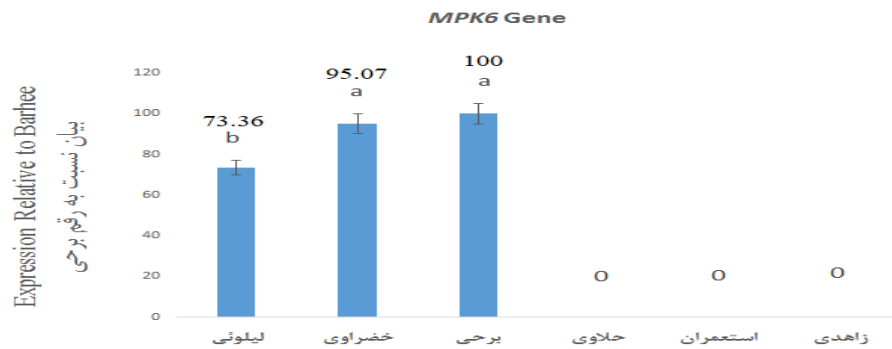
در پژوهشی Sidonskaya et al. (2016) گزارش داده‌اند، خانواده ژنی *MAPK*ها از طریق فسفریلاسیون پروتئین باعث انتقال پیام در بیشتر سلول‌ها در واکنش‌های دفاعی می‌شوند. نقش *MPK3* و *MPK6* در مقاومت گیاهان به نماتدها از طریق تنظیم مثبت بیان برخی ژن‌ها دخیل در فعال‌سازی سیستم ایمنی نیز ثابت شده است (Sidonskaya et al. 2016). پارالوگ‌های *MPK6* آرابیدوپسیس در گوجه‌فرنگی که شامل *LeMPK1* و *LeMPK2* هستند در بالادست مسیر انتقال پیام مربوط به بیوسنتز جاسمونیک اسید در فرآیند مقاومت گیاه به حشرات عمل می‌کنند (Kandoth et al. 2007). تحقیقات اخیر نشان داده که فعال شدن سریع *MPK6* و *MPK3* پس از زخم شدن گیاه (توسط حشرات یا عوامل دیگر) به عوامل بالادست خود یعنی *MKK4* و *MKK5* بستگی دارد و غیر وابسته به سنتز جاسمونیک اسید هستند. جاسمونیک اسید تولید شده ناشی از ایجاد زخم در گیاه منجر به القاء *MAPKKK*ها و علی‌الخصوص *MAPKKK14* می‌شود. *MAPKKK14* باعث فعال شدن *MKK3* در پایین دست شده و بدین ترتیب عوامل دیگر آبخار پیام دخیل در ایجاد مقاومت گیاه نسبت به حمله حشرات فعال می‌شود (Sözen et al. 2020; Zhang & Zhang 2022).



شکل ۴. درصد بیان ژن *bZIP* نسبت به رقم زاهدی در پوست میوه خرماي نارس، ستون‌هایی با حروف مختلف به‌طور معنی‌داری متفاوت بوده و در حروف یکسان معنی‌دار نیستند. این تفاوت بین میانگین‌ها در $p < 0.05$ (آزمون دانکن) مقایسه شد

Figure 4. The percentage of *bZIP* gene expression compared to the Zahedi cultivar in the peel of immature date fruit. Bars with different letters are significantly different, and the same letters are non-significant. Differences between means were compared at $p < 0.05$ (Duncan's test)

بررسی بیان ژن *Lipoxigenase* در پوست میوه نارس خرما: نتایج نشان داد که اختلاف بیان ژن بین ارقام مورد بررسی بر پایه‌ی آنالیز تجزیه واریانس در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). ارقام مقاوم‌تر بیان بیشتری نسبت به ارقام حساس‌تر داشتند. بیشترین میزان بیان این ژن مربوط به رقم زاهدی (۳۵/۸۳) و کم‌ترین میزان بیان این ژن مربوط به رقم لیلوئی (۲۶/۳۶) می‌باشد. برای مقایسه بیان نسبی ژن *Lipoxigenase* در شش رقم مورد مطالعه، حداکثر بیان که مربوط به رقم زاهدی بود ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و بیان این ژن در ارقام دیگر بر حسب درصد نسبت به رقم زاهدی مشخص شدند (شکل ۶). لیپوکسیژناز در بخش‌های مختلف که مولکول‌های سیگنال‌دهی را تولید می‌کنند، شناسایی شده‌اند و در عملکردهای مختلفی نقش دارد که شامل رشد و نمو، جوانه زنی بذر، پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده، رسیدن میوه، پیری، مرگ سلول و سنتز جاسمونیک اسید (JA) و آبسیزیک اسید (ABA) می‌باشد (Viswanath et al. 2020).



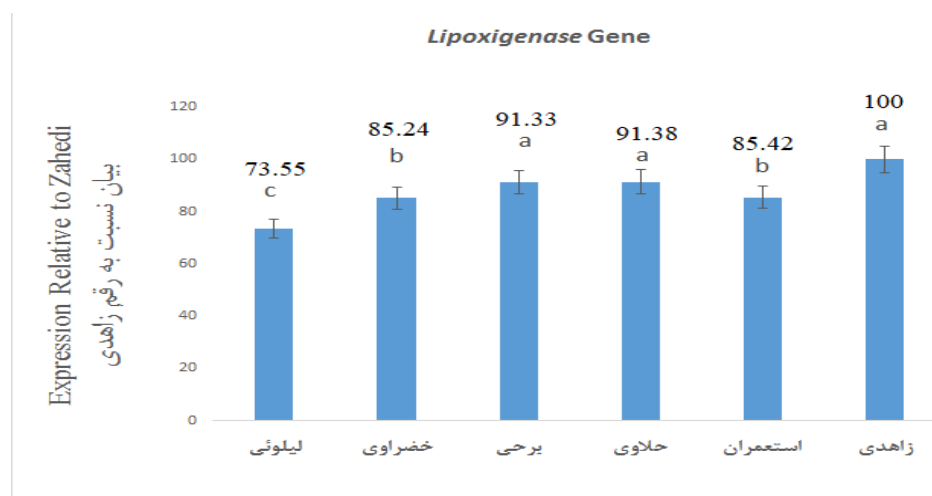
شکل ۵. درصد بیان ژن *MPK6* نسبت به رقم برچی در پوست میوه خرما نارس، ستون‌هایی با حروف مختلف به‌طور معنی‌داری متفاوت بوده و در حروف یک‌سان معنی‌دار نیستند. این تفاوت بین میانگین‌ها در $p < 0.05$ (آزمون دانکن) مقایسه شد

Figure 5. The percentage of *MPK6* gene expression compared to the Barhee cultivar in the peel of immature date fruit. Bars with different letters are significantly different, and the same letters are non-significant. Differences between means were compared at $p < 0.05$ (Duncan's test)

در پژوهش Kaur et al. (2014) گزارش داده‌اند، در زمان آسب گیاه‌خواران، لیپوک‌سیژنازاها منجر به تغییرات اکسیداتیو می‌شوند. این امر منجر به آسب مستقیم و غیرمستقیم اکسیداتیو می‌شود و همچنین سیگنال‌های تحریک دفاع گیاهی را انتقال می‌دهد (Kaur et al. 2014). همچنین، Vellosillo et al. (2013) گزارش داده‌اند، مسیر Lox-9 (لیپوکسیژناز-۹) نقش مهمی در مکانیسم دفاعی گیاهی ایفا می‌کند. پاسخ به حمله پاتوژن و نقش آن در آرابیدوپسیس علیه *Pseudomonas syringae* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نشان داد که این آنزیم باعث ایجاد تغییرات دیواره سلولی برای محدود کردن تهاجم پاتوژن می‌شود (Vellosillo et al. 2013).

بررسی بیان ژن *ACC synthase* در پوست میوه نارس خرما: نتایج نشان داد که اختلاف بیان ژن بین ارقام مورد بررسی بر پایه‌ی آنالیز تجزیه واریانس در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). ارقام مقاوم‌تر بیان بیشتری نسبت به ارقام حساس‌تر داشتند. بیشترین میزان بیان این ژن مربوط به رقم زاهدی (۳۴/۷۲) و کم‌ترین میزان بیان این ژن مربوط به رقم لیلوئی (۲۸/۳۲) می‌باشد. برای مقایسه بیان نسبی ژن *ACC synthase* در شش رقم مورد مطالعه، حداکثر بیان که مربوط به رقم زاهدی بود ۱۰۰٪ در نظر گرفته و بیان این ژن در ارقام دیگر بر حسب درصد نسبت به رقم زاهدی مشخص شدند (شکل ۷). آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک (*ACC synthase, ACS*)، یک آنزیم است که سنتز ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اسید (*ACC*)، پیش‌ساز اتیلن، از S-Adenosyl methionine (*AdoMet, SAM*) یک واسطه در چرخه یانگ و چرخه متیل

فعال و یک آنزیم موثر در انتقال متیل است. ACC synthase آنزیم کلیدی محدودکننده سرعت در سنتز اتیلن است (Lu et al. 2014).

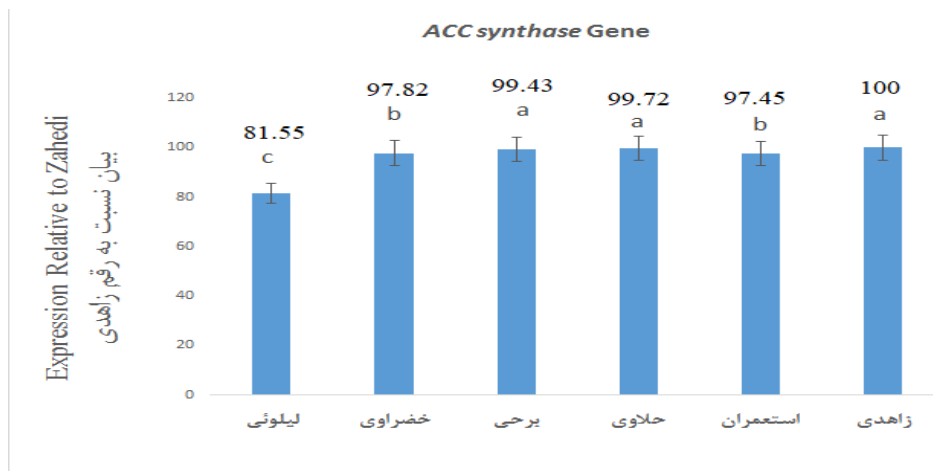


شکل ۶. در صد بیان ژن *Lipoxigenase* نسبت به رقم زاهدی در پوست میوه خرمای نارس، ستون‌هایی با حروف مختلف به‌طور معنی‌داری متفاوت بوده و در حروف یکسان معنی‌دار نیستند. این تفاوت بین میانگین‌ها در $p < 0.05$ (آزمون دانکن) مقایسه شد

Figure 6. The percentage of *Lipoxigenase* gene expression compared to the Zahedi cultivar in the peel of immature date fruit. Bars with different letters are significantly different, and the same letters are non-significant. Differences between means were compared at $p < 0.05$ (Duncan's test)

بررسی بیان ژن *ACC oxidase* در پوست میوه خرمای نارس: نتایج نشان داد که اختلاف بیان ژن بین ارقام مورد بررسی بر پایه‌ی آنالیز تجزیه واریانس در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). میزان بیان این ژن در بین ارقام حساس و ارقام مقاوم الگوی منظمی نداشت. بیشترین میزان بیان این ژن مربوط به رقم حلاوی (۳۵/۸۴) بوده و کمترین میزان بیان این ژن مربوط به رقم لیلوئی (۳۰/۶) می‌باشد. برای مقایسه بیان نسبی ژن *ACC oxidase* در شش رقم مورد مطالعه، حداکثر بیان که مربوط به رقم حلاوی بود ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و بیان این ژن در ارقام دیگر بر حسب درصد نسبت به رقم حلاوی مشخص شدند (شکل ۸). هورمون گیاهی فرار اتیلن بسیاری از فرآیندهای رشد گیاه و واکنش‌های تنش را تنظیم می‌کند، بنابراین بسیار مهم است که گیاهان بتوانند سطح تولید اتیلن خود را دقیق کنترل کنند. مسیر سنتز اتیلن شامل دو مرحله اختصاصی است، در اولین واکنش S-Adenosyl methionine (SAM) توسط ACC synthase به ACC synthase تبدیل می‌شود. در واکنش دوم، ACC توسط *ACC oxidase* به اتیلن تبدیل می‌شود. مطالعات زیادی نشان

داده است که ACC oxidase (ACO) مرحله محدود کننده میزان تولید اتیلن در طی برخی فرآیندهای اختصاصی است (Houben & Van de Poel 2019).



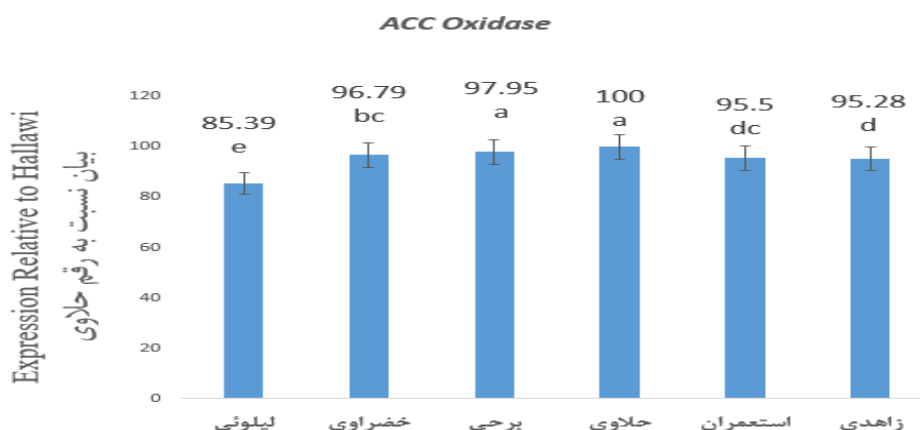
شکل ۷. درصد بیان ژن *ACC synthase* نسبت به رقم زاهدی در پوست میوه خرماهای نارس، ستون‌هایی با حروف مختلف به‌طور معنی‌داری متفاوت بوده و در حروف یکسان معنی‌دار نیستند. این تفاوت بین میانگین‌ها در $p < 0.05$ (آزمون دانکن) مقایسه شد.

Figure 7. The percentage of *ACC synthase* gene expression compared to the Zahidi cultivar in the peel of immature date fruit. Bars with different letters are significantly different, and the same letters are non-significant. Differences between means were compared at $p < 0.05$ (Duncan's test)

جدول ۲. تجزیه واریانس میزان رونویسی ژن‌های مورد بررسی

Table 2. Variance analysis of the transcription level of the studied genes

نام ژن	منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F Value	Pr > F
Gene name	Source of variation	DF	Sum of square	Mean Square		
<i>MurG</i>	Cultivars ارقام	5	174.4324500	34.8864900	98.35	<.0001
<i>Peroxidase72</i>	Cultivars ارقام	5	107.3935111	21.4787022	2.76	<.0693
<i>bZIP</i>	Cultivars ارقام	5	155.0136000	31.0027200	29.18	<.0001
<i>Lipoxygenase</i>	Cultivars ارقام	5	149.9582667	29.9916533	55.76	<.0001
<i>ACC synthase</i>	Cultivars ارقام	5	92.56.86667	18.51217333	294.81	<.0001
<i>ACC oxidase</i>	Cultivars ارقام	5	49.90436111	9.98087222	123.59	<.0001



شکل ۸. در صد بیان ژن *ACC oxidase* نسبت به رقم حلاوی در پوست میوه خرماهای نارس، ستون‌هایی با حروف مختلف به‌طور معنی‌داری متفاوت بوده و در حروف یکسان معنی‌دار نیستند. این تفاوت بین میانگین‌ها در $p < 0.05$ (آزمون دانکن) مقایسه شد

Figure 8. The percentage of *ACC oxidase* gene expression compared to the Hallawi cultivar in the peel of immature date fruit. Bars with different letters are significantly different, and the same letters are non-significant. Differences between means were compared at $p < 0.05$ (Duncan's test)

نتیجه‌گیری: بیان برخی از ژن‌ها در ارقام حساس و مقاوم از الگوی منظمی پیروی کرده و بیان ژن‌های دیگر دارای الگوی نامنظمی بودند. عبارت دیگر بیان برخی از ژن‌ها در همه ارقام مقاوم بیشتر یا کمتر و در همه ارقام حساس مورد آزمایش برعکس است. ژن‌های *MurG* و *bZIP1* در بین ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس بیان بیشتری نشان دادند. در نتیجه می‌توان پیش بینی کرد که نقش محصول ژن‌های *MurG* و *bZIP* به صورت تنظیم مثبت القاء مقاومت نخل خرما نسبت به کنه است اما نقش محصول ژن *MAPK6* برعکس دو ژن قبلی بود عبارت دیگر بیان این ژن در ارقام حساس زیاد بود در حالی که در ارقام مقاوم برای این ژن بیانی ثبت نشدند. لذا می‌توان پیش‌بینی کرد که ژن *MAPK6* به صورت تنظیم منفی باعث القاء مقاومت به کنه در نخل خرما شد. در مورد ژن‌های *Peroxidase72* و *ACC oxidase* الگوی ثابت بین ارقام حساس و بین ارقام نسبتاً مقاوم ملاحظه نشد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر

سپاسگزاری می‌شود (شماره پژوهانه: SCU.AH98.468).

منابع

- بهداد ابراهیم (۱۳۷۶) آفات درختان میوه ایران، چاپ سوم. انتشارات یادبود، اصفهان، صص: ۸۲۲.
- بهادر یاسر، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین، و همکاران (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR. پژوهش‌های تولیدات دامی ۱۳، ۱۹۲-۱۸۶.
- عرب پور رق آبادی زهرا، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین (۱۴۰۰) الگوی بیانی ژن *p32* در بافت‌های ران، دست، راسته و چربی پشت بره کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۲۰۰-۱۸۳.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن *ESRI* در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۲(۱)، ۱۹۲-۱۷۷.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن *ESR2* در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۲(۴)، ۱۸۴-۱۶۹.
- محمدآبادی محمدرضا، سفلائی محمد (۱۳۹۹). پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن *BMP15* در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۲(۳)، ۲۰۸-۱۹۱.
- محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۰(۳)، ۱۲۲-۱۱۱.

References

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, et al. (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309, 1052-1056.
- Al-Khayri JM, Jain SM, Johnson DV (2015) Date palm genetic resources and utilization. Springer pp. 546.
- Al-Khayri JM, Naik PM (2017) Date palm micropropagation: *Ciênc agrotec* 41, 347-358.
- Aldosari S (2009) Occurrence of dust mite, *Oligonychus afrasiaticus* McG. on fruits, leaflets of some date palm trees and evaluation the efficiency of botanical compound (Biaco) as compared with some acaricides. *AUBER* 12, 69-77.
- Alseekh S, Fernie AR (2018) Metabolomics 20 years on: what have we learned and what hurdles remain? *The Plant J* 94, 933-942.
- Arabpour Z, Mohammadabadi M, Khezri A (2021) The expression pattern of *p32* gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. *Agric Biotechnol J* 13 (4), 183-200 (In Persian).
- Alves MS, Dadalto SP, Gonçalves AB, et al. (2013) Plant bZIP transcription factors responsive to pathogens: a review. *Int J Mol Sci* 14, 7815-7828.

- Arbabi M, Latifian M, Askari M, et al. (2017) Evaluation of different treatments in control of *Oligonychus afrasiaticus* in date palm orchards of Iran. *Persian J. Acarol* 6 (2), 125–135.
- Azeem F, Tahir H, Ijaz U, et al. (2020) A genome-wide comparative analysis of bZIP transcription factors in *G. arboreum* and *G. raimondii* (Diploid ancestors of present-day cotton). *Physiol Mol Biol Plants* 26, 433-444.
- Bahador Y, Mohammadabadi MR, Khezri A, et al. (2016) Study of genetic diversity in honey bee populations in Kerman province using ISSR markers. *Res Anim Prod* 7 (13), 186-192 (In Persian).
- Behdad A (1997) Cultivation, harvesting, related topics of orchards, of fruits, of trees. Yadbood Publication, Esfahan, pp. 882 (In Persian).
- Ben Chaaban S, Chermiti B, Kreiter S (2011) Comparative demography of the spider mite, *Oligonychus afrasiaticus*, on four date palm varieties in southwestern Tunisia. *Journal of Insect Sci* 11 (1), 136.
- Bolland HR, Gutierrez J, Flechtmann CH (1998) World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). Brill, pp.380.
- Buxton P (1920) Insect pests of dates and the date palm in Mesopotamia and elsewhere. *Bull Entomol Res* 11, 287-304.
- Chaaban SB, Chermiti B, Kreiter S (2012) Effects of host plants on distribution, abundance, developmental time and life table parameters of *Oligonychus afrasiaticus* (McGregor)(Acari: Tetranychidae). *Pap Avulsos Zool* 52, 121-133.
- Chuang C-F, Running MP, Williams RW, et al. (1999) The *PERIANTHIA* gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 13, 334-344.
- Ezquer I, Salameh I, Colombo L, et al. (2020) Plant cell walls tackling climate change: Biotechnological strategies to improve crop adaptations and photosynthesis in response to global warming. *Plants* 9, 212.
- Fernández-Pérez F, Pomar F, Pedreño MA, et al. (2015) Suppression of *Arabidopsis peroxidase 72* alters cell wall and phenylpropanoid metabolism. *Plant Sci* 239, 192-199.
- Garcia M, Myouga F, Takechi K, et al. (2008) An *Arabidopsis* homolog of the bacterial peptidoglycan synthesis enzyme MurE has an essential role in chloroplast development. *The Plant J* 53, 924-934.
- Gurevich V, Lavi U, Cohen Y (2005) Genetic variation in date palms propagated from offshoots and tissue culture. *J Am Soc Hortic Sci.* 130, 46-53.

- Houben M, Van de Poel B (2019) 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase (ACO): The enzyme that makes the plant hormone ethylene. *Front Plant Sci* 10, 695.
- Howe GA, Jander G (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol* 59, 41-66.
- Kandoth PK, Ranf S, Pancholi SS, et al. (2007) Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12205-12210.
- Kang SG, Price J, Lin PC, et al. (2010) The *Arabidopsis* bZIP1 transcription factor is involved in sugar signaling, protein networking, and DNA binding. *Molecular Plant* 3, 361-373.
- Kaur KD, Jha A, Sabikhi L, et al. (2014) Significance of coarse cereals in health and nutrition: a review. *J Food Sci Technol* 51, 1429-1441.
- Khanam S, Sham A, Bennetzen JL, et al. (2012) Analysis of molecular marker-based characterization and genetic variation in date palm (*'Phoenix dactylifera'*L.). *Aust J Crop Sci* 6, 1236-1244.
- Lev-Yadun S (2016) Plants are not sitting ducks waiting for herbivores to eat them. *Plant Signal Behav* 11, e1179419.
- Liao Y, Zou HF, Wei W, et al. (2008) Soybean *GmbZIP44*, *GmbZIP62* and *GmbZIP78* genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 228, 225-240.
- Lin X, Li N, Kudo H, et al. (2017) Genes sufficient for synthesizing peptidoglycan are retained in gymnosperm genomes, and MurE from *Larix gmelinii* can rescue the albino phenotype of *Arabidopsis* MurE mutation. *Plant Cell Physiol* 58, 587-597.
- Lu J, Li J, Ju H, et al. (2014) Contrasting effects of ethylene biosynthesis on induced plant resistance against a chewing and a piercing-sucking herbivore in rice. *Mol Plant* 7, 1670-1682.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi MR, Khezri A, et al. (2020) *Dlk1* gene expression in different tissues of lamb. *Iran J Appl Anim Sci* 10 (4), 669-67.
- Mengin-Lecreulx D, Texier L, Rousseau M, et al. (1991) The *murG* gene of *Escherichia coli* codes for the UDP-N-acetylglucosamine: N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase involved in the membrane steps of peptidoglycan synthesis. *J Bacteriol* 173, 4625-4636.
- Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of *ESR2* gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12 (4), 167-181 (In Persian).
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, et al. (2021) Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. *Heliyon* 7 (12), e08542.

- Mohammadabadi M, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of *BMP15* gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12, 191-208 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2020) Expression of *ESR1* gene in *Raini Cashmere* goat using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 12 (1), 177-192 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of *leptin* gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (In Persian).
- Mohan Jain S (2006) Recent advances in date palm tissue culture and mutagenesis. In: III International Date Palm Conference 736. pp. 205-211.
- Negm MW, Alatawi FJ, Aldryhim YN (2014) Biology, predation, and life table of *Cydnoseius negevi* and *Neoseiulus barkeri* (Acari: Phytoseiidae) on the old world date mite, *Oligonychus afrasiaticus* (Acari: Tetranychidae). *J Insect Sci* 14, 177.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Pedras MSC, Yaya EE (2015) Plant chemical defenses: are all constitutive antimicrobial metabolites phytoanticipins? *Nat Prod Commun* 10, 1934578X1501000142.
- Pritchard AE (1955) A revision of the spider mite family *Tetranychidae*. *Pac Coast Entomol Soc Mem* 2, 1-472.
- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M, et al. (2022) An *Origanum majorana* leaf diet influences *Myogenin* gene expression, performance, and carcass characteristics in lambs. *Animals* 13 (1), e14
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, et al. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463, 178-183.
- Shen H, Cao K, Wang X (2007) A conserved proline residue in the leucine zipper region of AtbZIP34 and AtbZIP61 in *Arabidopsis thaliana* interferes with the formation of homodimer. *BBRC* 362, 425-430.
- Sidonskaya E, Schweighofer A, Shubchynskyy V, et al. (2016) Plant resistance against the parasitic nematode *Heterodera schachtii* is mediated by MPK3 and MPK6 kinases, which are controlled by the MAPK phosphatase AP2C1 in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 67, 107-118.
- Sobiech A, Tomkowiak A, Nowak B, et al. (2022) Associative and physical mapping of markers related to *Fusarium* in maize resistance, obtained by Next-Generation Sequencing (NGS). *Int J Mol Sci* 23, 6105.

- Sözen C, Schenk ST, Boudsocq M, et al. (2020) Wounding and insect feeding trigger two independent MAPK pathways with distinct regulation and kinetics. *Plant Cell* 32, 1988-2003.
- Tran X, Keskin E, Winkler P, et al. (2023) The chloroplast envelope of angiosperms contains a peptidoglycan Layer. *Cells* 12 (4), 563
- Treviño-Barbosa G, Ordaz-Silva S, Gaona-García G, et al. (2022) The resistance of seven host plants to *Tetranychus merganser* Boudreaux (Acari: Tetranychidae). *Insects* 13, 167.
- Triki M, Zouba A, Khoualdia O, et al. (2003) "Maladie des feuilles cassantes" or brittle leaf disease of date palms in Tunisia: Biotic or abiotic disease? *JPP*, 71-79.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, et al. (2000) *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *PNAS* 97, 11632-11637.
- V. Patankar H, M. Assaha DV, Al-Yahyai R, et al. (2016) Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) subjected to drought and salinity. *PLoS One* 11, e0166216.
- Vayalil PK (2012) Date fruits (*Phoenix dactylifera* L.): an emerging medicinal food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 52, 249-271.
- Vellosillo T, Aguilera V, Marcos R, et al. (2013) Defense activated by 9-lipoxygenase-derived oxylipins requires specific mitochondrial proteins. *Plant Physiol* 161, 617-627.
- Viswanath KK, Varakumar P, Pamuru RR, et al. (2020) Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. *J Plant Biol* 63, 83-95.
- Walsh J, Waters CA, Freeling M (1998) The maize *geneliguleless2* encodes a basic leucine zipper protein involved in the establishment of the leaf blade–sheath boundary. *Genes Dev* 12, 208-218.
- Wang S, Alseekh S, Fernie AR, et al. (2019) The structure and function of major plant metabolite modifications. *Mol Plant* 12, 899-919.
- Wang Z, Cheng K, Wan L, et al. (2015) Genome-wide analysis of the basic leucine zipper (bZIP) transcription factor gene family in six legume genomes. *BMC Genomics* 16, 1-15.
- Wei K, Chen J, Wang Y, et al. (2012) Genome-wide analysis of *bZIP*-encoding genes in maize. *DNA Res* 19, 463-476.
- Wittstock U, Gershenzon J (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 300-307.
- Yactayo-Chang JP, Tang HV, Mendoza J, et al. (2020) Plant defense chemicals against insect pests. *Agronomy* 10, 1156.

- Yang L, Zhang Y, Guan R, et al. (2020) Co-regulation of indole glucosinolates and camalexin biosynthesis by CPK5/CPK6 and MPK3/MPK6 signaling pathways. J Integr Plant Biol 62, 1780-1796.
- Zhang M, Zhang S (2022) Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling. J Integr Plant Biol 64, 301-341.
- Zhou L, Yarra R (2022) Genome-wide identification and expression analysis of bZIP transcription factors in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) under abiotic stress. Protoplasma 259, 469-483.