مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۲، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۲
صفحه ۱۲۲-۱۱۰

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6

DOR:20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023
Volume 12, Number 1, Pages: 110-122

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

بررسی بیان برخی ژن‌های مؤثر در گرده‌فشانی و تلقیح گل‌های نخل خرمای رقم برحی تکثیر شده با کشت بافت و پاجوش

Evaluation of the expression of some genes affecting flowers pollination and fertilization in the date palm cv. Barhee, propagated by tissue culture and offshoot

سیده زهرا حسینی موسوی[۱]، موسی موسوی[۲*] و خلیل عالمی‌سعید [۳]

Sayedeh Zahra Hosseini Mousavi[1], Mousa Mousavi[2*] and Khalil Alami-Saeid [3]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، ۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران.

۳- دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ایران.

1. MSc Graduated, 2- Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran. Faculty of
3- Associate Professor, Production Engineering and Plant Genetic Department, Agriculture, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources Faculty of University, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email
m.mousavi@scu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۲۳)

چکیده

کشت پاجوش مرسوم‌ترین روش تکثیر نخل خرما است. با توجه به محدودیت تعداد پاجوش‌های تولید شده در هر نخل و مشکلاتی که در انتقال و کاشت آنها وجود دارد از این رو، تکثیر نخل خرما به روش کشت بافت توصیه می‌شود. گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت کاملاً شبیه به گیاه مادری هستند. امّا در برخی موارد تکثیر با این روش منجر به تغییرات سوماکلونال مانند ناهنجاری در گرده‌افشانی و باروری (نظیر نخل خرمای رقم برحی حاصل از کشت بافت) می‌شود. تجزیه و تحلیل بیان ژن می‌تواند مکانیسم مولکولی تنوع سوماکلونال را تعیین کند. بنابراین، در این تحقیق، بیان برخی از ژن‌های مؤثر بر گرده‌افشانی و لقاح گل از جمله یوبی‌کوئیتین (UBQ)، متالوتیونین (MT)، فسفوفروکتوکیناز (PFK) و پلی‌آدنیلات باندینگ (PABP) در گل‌آذین‌های نخل خرمای رقم برحی در سه مرحله رشد اسپات یا پوشش گل‌آذین به طول ۱۵، ۲۵ و ۳۵ سانتی‌متر با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تکثیر رونویسی ژن‌ها، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح اثرات متقابل مراحل رشد اسپات با روش‌های تکثیر بود. سطح بیان دو ژن PFK و PABP در نخل‌های برحی کشت بافتی فقط در مرحله اولیه رشد اسپات، بیشتر از نخل‌های برحی پاجوشی و به ترتیب۱/٦ و ۱/۳ برابر بود. امّا سطح بیان ژن های UBQ و MT در همه مراحل رشد اسپات نخل برحی کشت بافتی کمتر از نخل برحی پاجوشی بود. بررسی شبکه پروتئین‌های دارای همکنش با MT نشان دهنده ارتباط و همکنش این پروتئین با پروتئین‌های موثر در نرعقیمی و نمو بذر بود.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن،
تنوع سوماکلونال،
کشت بافت،
پاجوش،
اسپات نخل خرما

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 1, 2023

Abstract

Offshoot planting is the most common way of propagating date palms. Due to the limitation of the number of offshoots produced by each palm tree and the problems with their transferring and planting, the tissue culture technique is recommended for palm propagation. Tissue culture plantlets are completely similar to the mother stock. But in some cases (like as date palm cv. Barhee) this method shows somaclonal variation, such as abnormalities in pollination and fertility. Gene expression analysis can determine the molecular mechanism of somaclonal variation. Therefore, in this research, we investigated the expression of some genes affecting date palm pollination and fertilization, including Ubiquitin (UBQ), Metallothionein (MT), Phosphofructokinase (PFK), and Polyadenylate binding (PABP), in the Barhee cultivar at three stages of the inflorescence spathe growth (15, 25, and 35 cm long) with three replicates. The transcription amplification results showed that there was a significant difference in the mutual effects of spathe growth stages and propagation methods on gene expression. The expression levels of PFK and PABP were 1.6 and 1.3 times respectively, in tissue culture propagated palms comparing to offshoot propagated palms only at the initial stage of spot growth. However, the expression level of UBQ and MT genes was lower in tissue culture palms than in offshoot palms in all stages of spathe growth. We also investigated the protein network interacting with MT and found a relationship and interaction of this protein with proteins effective in male sterility and seed development.

Keywords: Date palm spathe, Gene expression, Offshoot, Somaclonal variation, Tissue culture

مقدمه

نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) گیاهی دوپایه و چندساله از خانواده‌ی Arecaceae است که میوه، هسته و برگ آن در صنایع غذایی، دارویی و نیز در صنایع دستی کاربرد دارد (Hussain Mallhi *et al.*, 2014; Qadir *et al.*, 2020)، با در نظر گرفتن کاربردهای این نخل و توجه به این نکته که ایران از جمله تولید کنندگان و صادرکنندگان عمده خرما در جهان است، کشت و حفظ نخلستان‌ها بسیار حایز اهمیت می‌باشد. دو پایه بودن نخل خرما، وجود هتروزیگوسیتی و تنوع بالایی که میان پایه‌ی مادری و بذرهای حاصل از آن وجود دارد، کشت این گیاه را با مشکلاتی مواجه ساخته است (Kordrostami *et al.*, 2022) که از آن جمله می‌توان به ظهور ژنوتیپ‌هایی با کیفیت پایین یا نامرغوب و نیز عدم امکان تفکیک پایه‌های خرمای نر از ماده در مرحله‌ی نهال بذری تا زمان باروری آن‌ها اشاره نمود (Kaeppler *et al.*, 2000; McCubbin *et al.*, 2004). به دلیل محدودیت تعداد پاجوش‌های یک نخل خرما در طول عمر آن، تکثیر از طریق پاجوش با وجود تشابه کامل با پایه‌ی مادری پاسخگوی نیاز نخلستان‌ها نمی‌باشد (Gurevich *et al.*, 2005; Zaid and De Wet, 1999). در این رابطه استفاده از روش‌های ریزازدیادی برای ایجاد نهال‌های کاملاً یکنواخت و مشابه با پایه‌های مادری جهت ازدیاد ارقام نخل خرما توصیه می‌شود، هرچند در مواردی نادر تنوع سوماکلونال با ایجاد تفاوت میان گیاهان حاصل با یکدیگر و با پایه‌ی مادری چالش پیش‌روی گیاهان تولید شده با روش‌های کشت بافت است که گاهی موجب بروز اختلالاتی در محصول مورد نظر و در نهایت زیان اقتصادی برای کشاورز خواهد شد (Kaeppler *et al.*, 2000;Gurevich *et al.*, 2005; Al Kaabi *et al.*, 2006; Saker *et al.*, 2006; Kordrostami *et al.*, 2022). اگرچه گاهی گیاهان با روش‌های طبیعی نیز ممکن است دچار برخی تغییرات ژنتیکی بشوند (Pazhouhande *et al.*, 2017). تشخیص علت ناهنجاری‌های سوماکلونال و شناسایی مکانیسم مولکولی آنها، به یافتن راه حل‌هایی برای برطرف کردن این مشکلات در گیاهان تکثیر شده با پروتوکل‌های مختلف ریزازدیادی منجر خواهد شد. بعلاوه در صورت امکان تشخیص و حذف نهال‌های دچار اختلال، یا اثبات موقتی بودن مشکلات، می‌توان علاوه بر داشتن نهال‌های مورد تأیید و مدیریت هزینه‌ها و زمان، اعتماد کشاورزان را نیز جلب نمود. عدم تلقیح گل‌ها، پیچیده شدن گل‌آذین، تأخیر

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6]

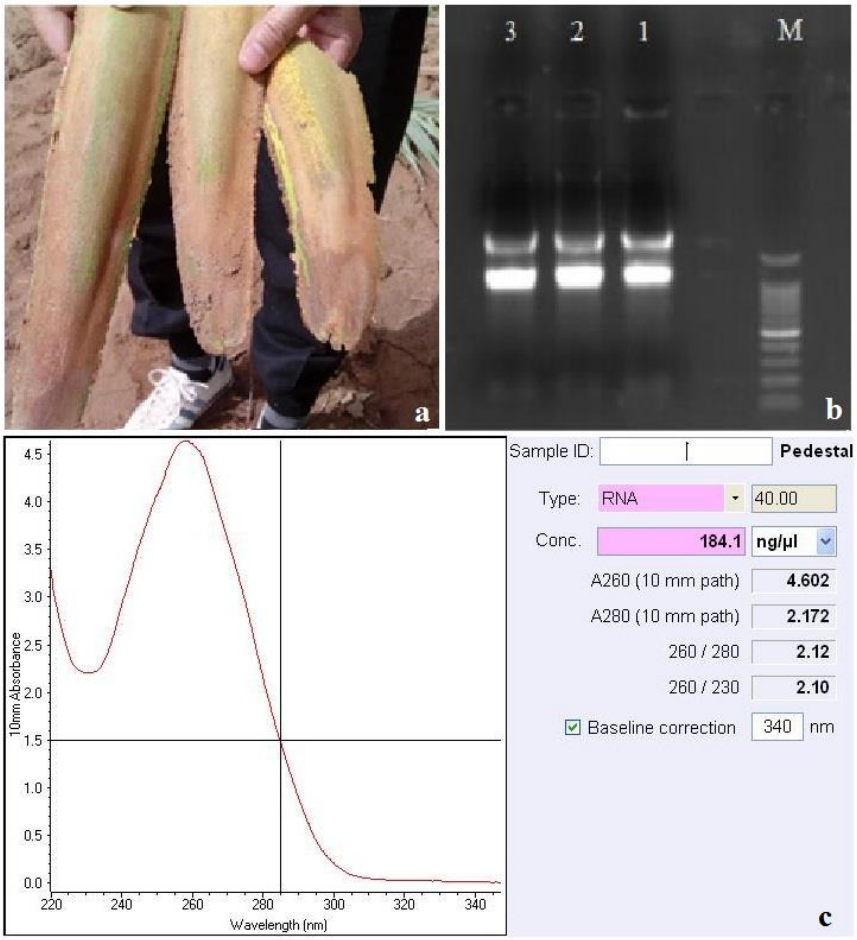
در گلدهی، ناهمرسی در خوشه و میوه و غیره مواردی از اختلالات گزارش شده در گیاهان حاصل از کشت بافت هستند (McCubbin *et al.*, 2004; Mirani *et al.*, 2020). گلدهی در گیاهان پدیده ای است کاملاً هدایت شده که به پارامترهای محیطی و درونی گیاه وابسته است و توسط شبکه تنظیمی ژن‌های زیادی کنترل می‌شود (Pazhouhandeh *et al.*, 2006; Manzari-Fallah *et al.*, 2020).با وجود پتانسیل قابل توجهی که جنین‌زایی سوماتیک در تولید گیاهانی جدید در نخل روغنی *Elaeis guineensis* Jacq دارد اما این روش سبب ایجاد یک ناهنجاری در گلدهی تحت عنوان *mantled* می‌شود. از آنجایی که ناهنجاری *mantled* اپی‌ژنتیک است، نمی‌توان آن را با نشانگرهای مولکولی معمولی تشخیص داد لذا از بیان دو ژن *EgM39A* و *EgIAA1*، که رونوشت هر دو در پینه‌های غیرطبیعی که منجر به این عارضه اپی‌ژنتیکی می‌شوند تجمع بیشتری دارند با موفقیت استفاده شد.(Morcillo *et al.*, 2006). آنزیم فسفوفروکتوکیناز در فرآیند گلیکولیز نقش دارد و گروه فسفات حاصل از هیدرولیز ATP را به فروکتوز ٦- فسفات منتقل می‌کند و در نتیجه‌ی این واکنش فروکتوز ١ و ٦- دی فسفات حاصل می‌شود (Mustroph *et al.*, 2013). قندها در سلول‌های گیاهی در تنظیم بیان بسیاری از ژن‌ها از جمله ژن‌های دخیل در فرآیندهای گلدهی دخیل هستند، کمبود ذخیره‌ی قندی طی میوز ممکن است منجر به ریزش گل شود. فروکتور در مرحله‌ی انتقالی گل و در فرآیند گلدهی گیاهان نقش بسزایی دارد و تغذیه گل‌آذین در حال رشد را عهده‌دار است (Lebon *et al.*, 2016). تخریب پروتئین‌های جهش یافته، سمی و دارای تاخوردگی ناصحیح در سلول، در اثر دریافت سیگنالی است که بیان ژن یوبی‌کوئیتین موجب آن می‌شود (Hershko and Ciechanover, 1998; Pickart and Eddins, 2004; Lebon *et al.*, 2008). در مطالعات مقایسه‌ای عملکرد، ارزیابی تغییرات بیان ژن یوبی‌کوئیتین و یا متالوتیونین با در نظر گرفتن تأثیر مثبت آن‌ها در ایجاد تحمل سلول به شرایط تنش و بهینه‌سازی شرایط رشد دارای اهمیت بسزایی است. بررسی تغییرات بیان ژن یوبی‌کوئیتین در برگ خرما توسط توان و همکاران (٢٠١٤) نشان دهنده غیر معنی‌دار بودن اثر متقابل رقم در روش تکثیر بر تغییرات میزان رونویسی این ژن در برگ‌های نخل خرما بود (Tavan *et al.*, 2014). پروتئین‌های UBP12 وUBP13 دارای فعالیت deubiquitinating در شرایط درون شیشه‌ای هستند و در سیتوپلاسم و همچنین در هسته قرار دارند این پروتئین‌ها توسط ژن‌هایی کدگذاری می‌شوند که در همه سلول‌های گیاه قادر به بیان هستند و این مسئله نشان دهنده نقش عمومی این پروتئین‌ها در گیاه است. در گیاهان با جهش دوگانه برای ژن‌های *ubp12* و *ubp13* زمان گلدهی و ریتم شبانه‌روزی دچار تغییر گردید (Cui *et al.*, 2013). از ژن یوبی‌کوئیتین در مطالعات بیان ژن به عنوان ژن مرجع نیز استفاده می‌شود، مرادی و همکاران (٢٠١٨) در تعیین ژن‌های خانه‌دار مناسب برای مطالعه تغییر بیان ژن‌ها در گیاه حرا عنوان کردند که با وجود مناسب بودن ژن اکتین به عنوان کنترل داخلی در تجزیه و تحلیل‌های مربوط به نرمال‌سازی بیان ژن، استفاده از ترکیبی از ژن‌های خانه‌دار و از جمله ژن یوبی‌کوئیتین توصیه می‌شود (Moradi *et al.*, 2014). Zahri و Malaki(٢٠١٤) میزان بیان آنزیم آسکوربات پراکسیداز و متالوتیونین را در ارقام مقاوم و حساس کلزا نسبت به تنش سرما مورد ارزیابی قرار دادند. بیان ژن‌های آسکوربات پراکسیداز و متالوتیونین در ارقام مقاوم با مقیاس $2^{-C\Delta\Delta}$ به ترتیب ٢/١ و ٩/١ و در رقم حساس ١/٨ و ٥/٢ بود، همچنین اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی آسکوربات پراکسیداز برگ نشان داد که رقم مقاوم فعالیت بیش‌تر داشته است و همچنین مشخص شد که میان مقاومت کلزا به تنش سرما و عملکرد این دو ژن رابطه معنی‌دار وجود دارد. با در نظر گرفتن اهمیت نخل‌های خرمای تولید شده از کشت بافت و برطرف کردن مشکلات احتمالی آن‌ها و نیز اهمیت روش بیان ژن در تشخیص دقیق ناهنجاری‌های ژنتیکی، پژوهش حاضر به مقایسه‌ی نخل خرما رقم برحی حاصل از کشت بافت با نخل خرمای حاصل از پاجوش از طریق بررسی بیان ژن‌های منتخب در گل پرداخته است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی: نمونه‌برداری از نخل‌های خرمای رقم برحی تکثیر شده به روش کشت بافت و پاجوش از پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری واقع در شهرستان اهواز، استان خوزستان،

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6]

ایران، از نخل‌هایی که حداقل در سن ۲ سال باردهی بودند، صورت گرفت. برای این منظور از هر رقم خرما (حاصل از کشت بافت و تولید شده از پاجوش) ۳ نخل و از هر نخل ۳ اسپات انتخاب شد. اسپات‌های نمونه‌برداری شده از نظر دوره‌ی رشدی متفاوت بودند و به لحاظ ظاهری در سه اندازه‌ی کوچک، متوسط و بزرگ به ترتیب با در طول ۱۵، ۲۵ و ۳۵ سانتی‌متر قرار داشتند (شکل ۱-a).



شکل ۱- (a) اسپات‌های نمونه‌برداری شده رقم برحی در در سه اندازه‌ی کوچک، متوسط و بزرگ (b) ژل آگارز برای RNA (M-سایز مارکر، ۱ ، ۲ و ۳ مربوط به RNA استخراج شده) و (c) سنجش RNA نمونه برحی پاجوشی بوسیله نانودراپ.

Fig 1. (a) Sampled spathes of Barhee cultivar in three growth stages, (b) Agarose gel for RNA (M-size marker, 1, 2 and 3 belong to the extracted RNA) and (c) RNA quantification with nanodrop for offshoot propagated palm cv. Barhee sample.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از ۰/۱ gr گل‌های هر اسپات با استفاده از کیت GeneAll® Ribospin™ Plant (Cat No. 307-150) بر اساس دستورکار شرکت Gene All انجام شد. سنجش کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ (شکل ۱-b) و نانودراپ (Thermo SCIENTIFIC NANODROP 2000c) انجام گرفت (شکل ۱-c). سپس cDNA با استفاده آغازگر Oligo dt و در حجم نهایی ۲۰ µL بر اساس دستورکار کیت شرکت زیست فناوران رنا (RB MMLV Reverse Transcripta Code: RB125A) ساخته و برای انجام مراحل بعدی آزمایش در فریزر **C** °۲۰- نگه‌داری گردید.

طراحی آغازگرها و انجام واکنش Real Time- PCR

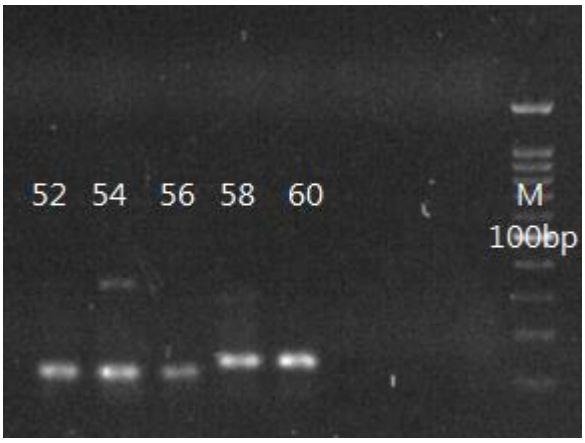
طراحی آغازگرها بر مبنای توالی‌های دریافت شده از پایگاه داده‌ی NCBI برای ژن‌های یوبی‌کوئیتین (UBQ)، متالوتیونین (MT)2a))، فسفوفروکتوکیناز (PFK)، پلی‌آدنیلات بایندینگ (PABP) و 18SrRNA (به عنوان ژن مرجع) و با استفاده از پایگاه

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6]

ها Primer3 (www.primer3.com) انجام شد (جدول ۱). به‌منظور بهینه‌سازی بهترین شرایط دمایی و نیز اطمینان از تکثیر اختصاصی هر آغازگر، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با شیب دمایی ۵۲°C تا ۶۰°C به‌صورت جداگانه برای هر یک از پنج آغازگر انجام شد (شکل ۲). در ادامه، واکنش Real Time- PCR با استفاده از مسترمیکس سایبرگرین شرکت Ampliqon (RealQ Plus 2x Master Mix Green Low ROX, Cat. No.: A324402) و دستگاه Step One Plus شرکت ABI (امریکا – ماساچوست) در چرخه‌های دمایی و زمانی ذکر شده در جدول ۲ در سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی انجام شد. محاسبه میزان بیان ژن به روش $2^{-Ct\Delta\Delta}$ (Livak and Schmittgen, 2001) انجام شد. تجزیه واریانس داده‌های حاصل در آزمایش اسپلیت پلات در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام و مقایسه میانگین به روش LSD در سطح احتمال ۱٪ انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس ژن‌های مورد مطالعه در نخل خرما رقم برحی حاصل از کشت بافت و نخل خرمای حاصل از پاجوش نشان داد که میزان رونویسی ژن‌های مورد مطالعه بین مراحل رشدی اسپات و دو روش تکثیر گیاه تفاوت معنی‌دار ندارد، در حالی که اثرات متقابل روش تکثیر در مرحله‌ی رشدی اسپات معنی‌دار بود (جدول ۳). ارزیابی تغییرات بیان ژن یوبی‌کوئیتین در نخل‌های تولید شده به روش کشت بافت نسبت به نخل‌های تولید شده از پاجوش، در دوره‌های مختلف رشد اسپات بیان متفاوت و روندی افزایشی داشت (شکل ۳– a و شکل ٤) هرچند در کل میزان بیان این ژن در هر سه مرحله‌ی رشدی اسپات در نخل خرمای کشت بافتی نسبت به نخل خرمای تکثیر شده با پاجوش کمتر بود به نحوی که در دوره‌ی ابتدایی رشد اسپات (۱۵cm)، دوره‌ی دوم رشد (۲۵cm) و مرحله پایانی (۳۵cm) بیان ژن یوبی‌کوئیتین به ترتیب ۰/٦٦، ۰/۷۲ و ۰/۸۵ بود و بیش‌ترین میزان بیان در مرحله‌ی ۳۵ سانتی‌متری رشد اسپات‌ها بود.



شکل ۲- تصویر ژل برای شیب دمایی اتصال آغازگر ژن *PABP*

Fig 2. Gel image for annealing temperature gradients of the *PABP* gene primer

روند کلی تغییرات بیان ژن متالوتیونین نیز مشابه تغییرات بیان ژن یوبی‌کوئیتین بود به گونه‌ای که در طول مرحله‌ی رشدی اسپات در نخل‌های تولید شده از کشت بافت، بیان صعودی نشان داد هرچند میزان بیان آن در مقایسه با نخل‌های تولید شده از پاجوش، کمتر بود (شکل ۳– b و شکل ٤). مقایسه تغییرات بیان ژن فسفوفروکتوکیناز در مرحله‌ی ابتدایی رشد اسپات (۱۵cm) در نخل برحی تکثیر شده با کشت بافت نسبت به نخل تولید شده از پاجوش به میزان ۱/٦ برابر افزایش داشت. سپس روند کاهشی به خود گرفت، به نحوی که در مرحله دوم رشد (۲۵cm) بیانی یکسان و در مرحله‌ی سوم رشد (۳۵cm) به کمترین میزان خود (۰/۷۳) نسبت به رقم تولید شده از پاجوش رسید (شکل ۳– c و شکل ٤). بررسی تغییرات بیان ژن پلی‌آدنیلات بایندینگ نیز روندی مشابه با ژن فسفوفروکتوکیناز را دنبال کرد به این صورت که در مرحله‌ی اولیه‌ی رشد اسپات میزان بیان آن در نخل برحی تکثیر شده به روش کشت بافت نسبت به رقم تولید شده از پاجوش ۱/۳ برابر افزایش نشان داد، در مرحله‌ی دوم رشدی بیانی مشابه و در مرحله‌ی سوم کاهش بیان داشت (شکل ۳–d و شکل ٤).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6]

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن های دخیل در گرده‌افشانی و لقاح گل نخل خرمای رقم برحی

Table 1. Primer pairs sequences used for expression of genes involve in pollination and fertilization of date palm cv. Barhee

Gene name	Accession no.	Primer sequences	Amplicon length (bp)	Annealing (°C)Temperature
UBQ	XM_008790722	F: ATCCAGGACAAGGAAGGGATTC R: ATGTTATAGTCCGCGAGGGTTC	95	60
(MT)2a	XM_008812383	F: TGCAAATGTGGGTCCAACTG R: TGTTCATTCCCTTCCTCTCTCTC	93	60
PABP	XM_008797875	F: GAGGCCCTGCAGATGTTAAATG R: TCCTGCTGTGGCTGTTTATTTG	95	60
PFK	XM_039131668	F: GTGATGCGTTATAGCTGAGTGC R: GTGGCCCTACGAAGAACAATTC	93	60
18SrRNA	XR_005510386	F: CATTGGAGGGCAAGTCTGGT R: TCGCAGTGGTTCGTCTTTCA	397	59

جدول ۲- چرخه‌های دمایی واکنش Real-Time PCR

Table 2. Thermal cycles of Real-Time PCR reaction

Number of cycle	Step	Temperature (°C)	Time
1	Initial denaturing	95	10 min
40	Denaturing	95	15 sec
	Annealing and Extension	60	60 sec

جدول ۳- تجزیه واریانس داده های بیان ژن بر مبنای ΔCt.

Table 3. Variance analysis of gene expression data based on ΔCt

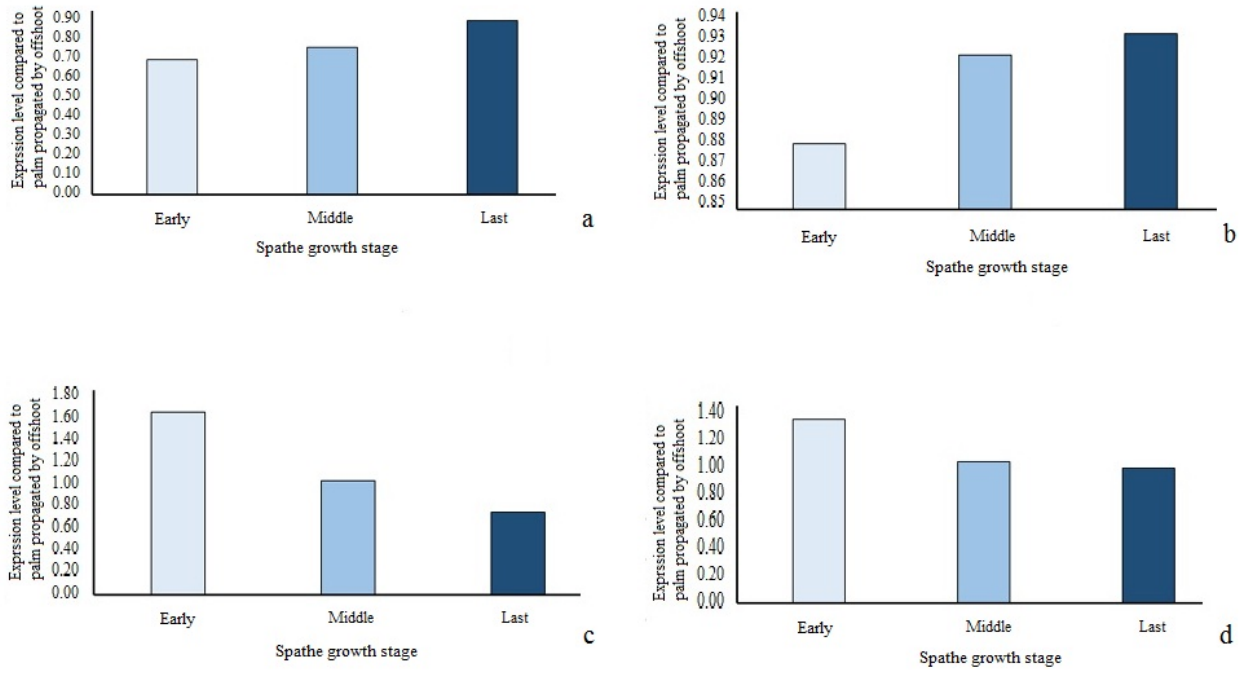
Source of variation	Df	(MT)2a	PABP	PFK	UBQ
Propagation method	1	61.50^{ns}	37.57^{ns}	49.73^{ns}	80.96^{ns}
First error	1	64.02	2.84	1.25	76.75
Stage of spathe growth	2	34.81^{ns}	32.47^{ns}	42.92^{ns}	35.24^{ns}
Second error	2	66.11	9.44	8.68	30.72
Prop. M.* Grow. S	2	8.08^{**}	6.15^{**}	17.71^{**}	10.03^{*}
Third error	9	0.83	0.70	0.85	0.95
(CV%)		14.78	8.01	6.93	12.3

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌داری در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and **: Non-significant and significant at 5% and 1% levels of probability.

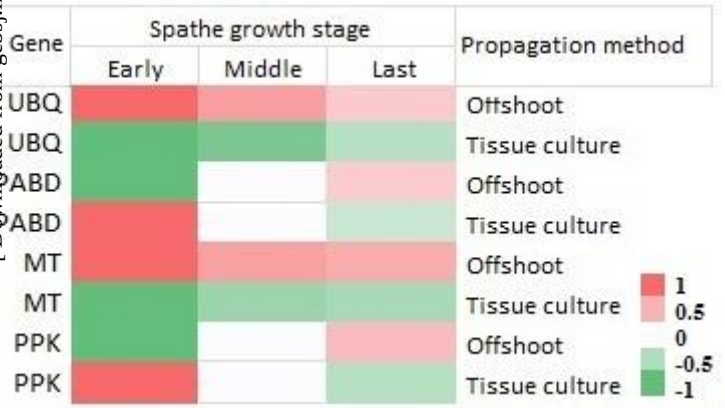
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6]



شکل ۳- مقایسه بیان ژن‌های کدکننده‌ی (a) یوبی‌کوئیتین (UBQ)، (b) متالوتیونین (MT)، (c) فسفوفروکتوکیناز (PFK) و (d) پلی‌آدنیلات بایندینگ (PABP) طی مراحل رشد اسپات شامل مرحله اولیه (۱۵ سانتی متر)، مرحله میانی (۲۵ سانتی متر) و مرحله آخر (۳۵ سانتی متر) در نخل خرما رقم برحی حاصل از کشت بافت نسبت به نخل تکثیر شده با پاجوش.

Fig 1. Comparison of the expression of genes encoding (a) ubiquitin (UBQ), (b) metallothionein (MT), (c) phosphofructokinase (PFK) and (d) polyadenylate binding (PABP) during the spathe growth stages: early (15 cm), middle (25 cm) and, last (35 cm) in date palm cv. Barhee propagated by tissue culture compared to the palm propagated by offshoot.



شکل ٤- نقشه حرارتی میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در مراحل مختلف رشد اسپات شامل مرحله اولیه (۱۵ سانتی متر)، مرحله میانی (۲۵ سانتی متر) و مرحله آخر (۳۵ سانتی متر) نخل خرمای رقم برحی تکثیر شده با کشت بافت و پاجوش

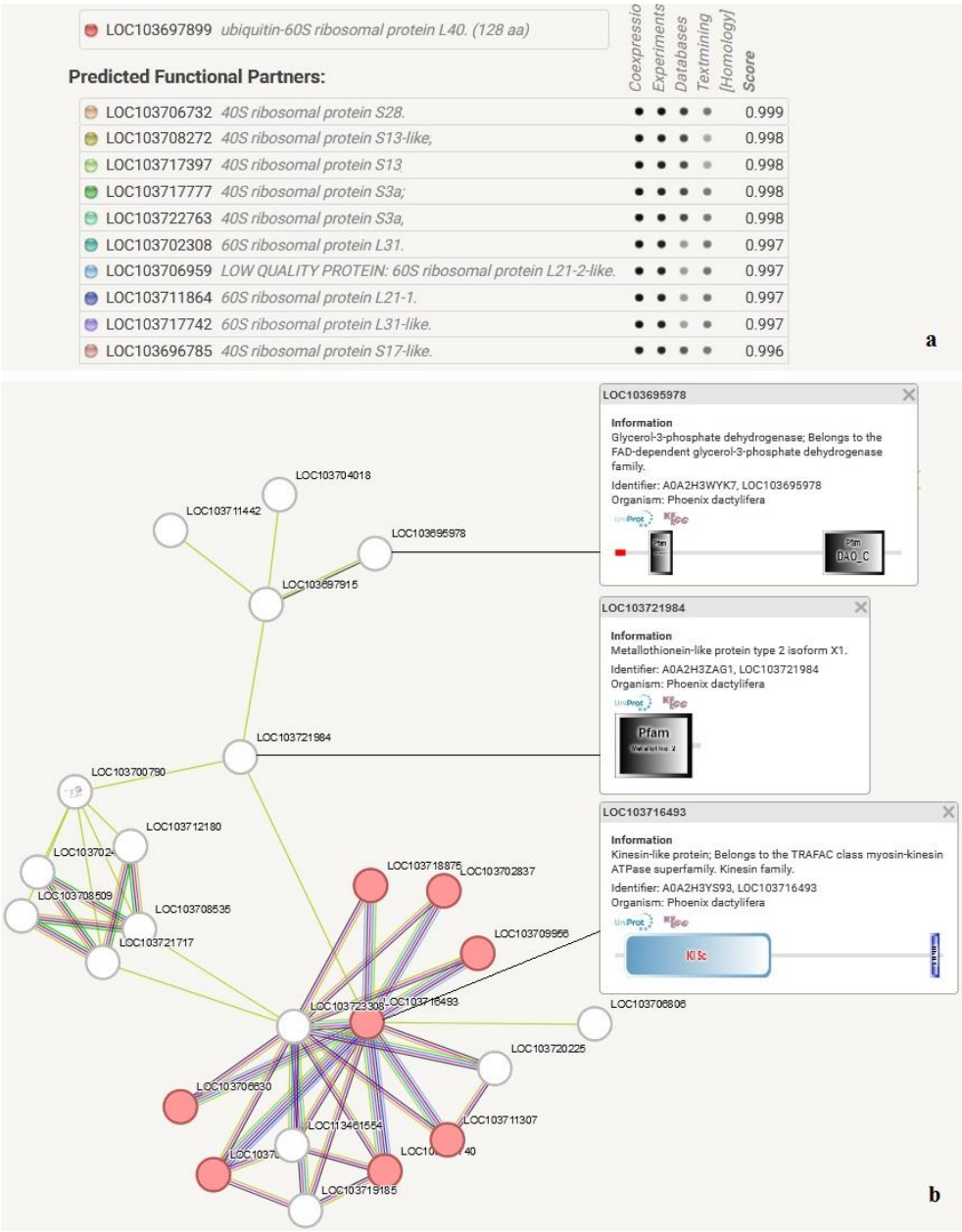
Fig 4. The heat map of the expression of genes studied in different stages of the spathe growth, early (15 cm), middle (25 cm) and, last (35 cm) in date palm cv. Barhee propagated by tissue culture and offshoot.

با بررسی پروتئین‌های دارای همکنش با یوبی‌کوئیتین بر اساس توالی اسیدهای آمینه ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از پایگاه String (https://string-db.org/) معلوم شد که پروتئین یوبی‌کوئیتین عمدتا با پروتئین‌های 40S و 60S ریبوزومی در ارتباط می‌باشد. امّا بررسی شبکه String پروتئین‌های دارای همکنش با متالوتیونین نشان داد که این پروتئین با پروتئین‌های خانواده Kinesin و همچنین با پروتئین گلیسرول-۳-فسفات دهیدروزناز در ارتباط و همکنش مستقیم می‌باشد (شکل ۵).

تکنیک کشت بافت که بر پایه‌ی ویژگی توتی‌پوتنسی استوار است این قابلیت را دارد که گیاهانی کاملاً شبیه به نمونه اصلی تولید کند و از نظر زمان، هزینه و مکان مقرون به صرفه باشد (Fehér, 2019).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6]

استفاده از این روش در تکثیر گیاهانی چون نخل خرما که به سبب دو پایه بودن و داشتن بذرهای هتروزیگوت، رسیدن به نتاج شبیه به پایه‌ی مادری غیرممکن است از جمله‌ی ارزشمندترین راهکارها می‌باشد. با وجود مزایای بسیار زیاد کشت بافت گیاهی، اما احتمال وقوع تنوع سوماکلونال در برخی از گیاهان تولید شده به‌عنوان عامل محدود کننده در استفاده از این روش به‌شمار می‌رود. تنوع در گیاهان حاصل از کشت بافت ممکن است به‌صورت ژنتیکی و ناشی از تغییرات پایدار (جهش) در توالی برخی از ژن‌ها یا به‌صورت اپی‌ژنتیک و صرفاً در اثر تغییر در بیان برخی از ژن‌ها حادث شود. تاکنون پژوهش‌های متعددی با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف جهت تعیین شباهت توالی DNA ژنومی بین نخل خرمای تکثیر شده با کشت بافت و نخل‌های حاصل از پاجوش صورت گرفته است. نتایج اکثر این تحقیقات بیانگر عدم تغییر در توالی DNA ژنومی بوده است.



شکل ۵– شبکه پروتئین‌های دارای همکنش با (a) یوبی‌کوئیتین و (b) متالوتیونین در نخل خرما بر اساس داده‌های پایگاه String (https://string-db.org/). خانواده پروتئین‌های کاینزین (دایره‌های قرمز رنگ) و پروتئین گلیسرول-۳-فسفات دهیدروژناز در نمو بذر و نر عقیمی موثر می‌باشند.

Fig 5-The network of proteins having interaction with (a) ubiquitin and (b) metallutionin in date palm based on String database (https://string-db.org/). Kainin's family proteins (red circles) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, which having interaction with metallotionine, are effective on seed development and male sterility.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6]

در این خصوص می‌توان به کارهای گورویش و همکاران (Gurevich *et al.*, 2005)، الخلیفه و همکاران (Al-Khalifah *et al.*, 2007)، میرانی و همکارن (Mirani *et al.*, 2022) و المیاحی (Al-Mayahi, 2022) اشاره کرد. با توجه به موارد ذکر شده در بالا می‌توان اذعان کرد که تنوع سوماکلونال که در برخی از ارقام خرما نظیر برحی دیده شده‌است منشاء اپی ژنتیک داشته و ناشی از تغییر در بیان برخی از ژن‌ها می‌باشد.

احتمال حدوث تغییرات اپی‌ژنتیک در گذشته از طریق نشانگرهای بیوشیمیایی نظیر آیزوزایم‌ها قابل ردیابی بود. در این خصوص زیودار و همکاران (Zivdar *et al.*, 2008) نخل خرمای رقم برحی حاصل از کشت بافت (با دو پروتوکل ایرانی و خارجی از انگلیس) را با نخل خرمای تکثیر شده با پاجوش از همان رقم را بوسیله سه سیستم آنزیمی شامل پراکسیداز، شیکیمات دهیدروژناز و اسید فسفاتاز با استفاده از تکنیک ایزوالکتریک فوکوسینگ مقایسه کردند. نتایج این آزمایش نشان داد که آیزوزایم‌های پراکسیداز و شیکیمات دهیدروژناز در نخل تکثیر شده از طریق کشت بافت با پروتوکل ایرانی نسبت به نخل خرمای تکثیر شده با پاجوش و کشت بافت با پروتوکل خارجی اندکی اختلاف داشتند. تغییرات اپی‌ژنتیک نیز با روش‌های دقیق تر از جمله تعیین میزان بیان ژن‌ها (رونوشت ژن‌های منفرد یا کل ترانسکریپتوم) و بررسی الگوی متیلاسیون قابل تشخیص و شناسایی می‌باشند. در این خصوص می‌توان به کارهای یوال و همکاران (Yuval *et al.*, 2010)، استروند و همکاران (Stroud *et al.*, 2013)، وانگ (Wang *et al.* 2013)، ویب وو و همکاران (Wibowo *et al.*, 2018)، ساعی‌اهق و همکاران (Saeiahagh *et al.*, 2019) و رجایی‌بهبهانی و همکاران (Rajaee Behbahani *et al.*, 2020) اشاره کرد. همچنین بررسی میزان بیان ژن‌های مرتبط، محققین را قادر به شناسایی گیاهان کاملاً شبیه با پایه‌ی مادری و گیاهان دارای ناهنجاری می‌نماید (Morcillo *et al.*, 2006).

ارزیابی تغییرات میزان بیان ژن‌های یوبی‌کوئیتین و متالوتیونین در مقایسه‌ی نخل خرمای رقم برحی بدست آمده از روش کشت بافت و بدست آمده از پاجوش، کمتر بودن بیان هر دو ژن را در پایه‌های کشت بافتی نشان داد. بر اساس نتایج بدست آمده در گل خرما، مرحله‌ی رشدی اسپات تحت تأثیر نحوه‌ی تکثیر گیاه، در میزان بیان ژن‌های یوبی‌کوئیتین و متالوتیونین تأثیرگذار بود. توان و همکاران (Tavan *et al.*, 2014) نیز در ارزیابی اثرات متقابل رقم در روش تکثیر در میزان رونویسی ژن یوبی‌کوئیتین در نمونه‌های برگی نخل خرما اظهار داشتند که اثرات متقابل رقم در روش تکثیر معنی‌دار نبوده است امّا با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، اثر متقابل روش تکثیر در مرحله‌ی رشدی اسپات در اندام گل بر میزان بیان ژن یوبی‌کوئیتین در سطح احتمال ۵٪ مؤثر بود. یوبی‌کوئیتین پروتئینی با وزن مولکولی کم است که در طی مسیر چند مرحله‌ای، شناسایی و تجزیه پروتئین هدف حذف را در کمپلکس آنزیمی پروتئوزوم انجام می‌دهد. کاهش در بیان ژن یوبی‌کوئیتین تجمع پروتئین‌های ناقص و مزاحم را به دنبال دارد که پیامد آن مختل شدن برخی فرایندهای سلولی از جمله کنترل ثبات، عملکرد و جایگزینی درون سلولی بسیاری از پروتئین‌ها خواهد بود (Hershko and Ciechanover, 1998; Pickart and Eddins, 2004; von Mikecz, 2006). القاء پاسخ ایمنی گیاهان نسبت به پاتوژن‌ها بوسیله سالیسیلیک اسید و از طریق فعال سازی مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) صورت می‌گیرد که باعث برنامه‌ریزی مجدد مجموعه رونوشت‌های فراوان برای اولویت دادن به دفاع نسبت به دیگر عملکردهای سلولی است. استقرار SAR و برنامه‌ریزی مجدد مجموعه رونوشت‌ها توسط فعال‌ساز رونویسیNPR1 انجام می‌شود. بطوریکه اکثر ژن‌های القا شده با SA وابسته بهNPR1 هستند و این نشان می‌دهد کهNPR1 تنظیم کنندی اصلی ایمنی گیاه است، بطوری که از دست دادن عملکرد NPR1 باعث نقص ایمنی گیاهان می‌شود. NPR1 فعالیت خود را در هسته اعمال می‌کند و در سلول‌های در حال استراحت NPR1 در سیتوپلاسم قرار دارد. مونومرهای NPR1 که وارد هسته می‌شوند توسط یک لیگاز یوبیکوئیتین بنامCullin-RING Ligase 3 (CRL3) یوبیکوئیتینه شده و در نهایت توسط پروتئوزوم S26 تجزیه می‌شوند. بنابراین پاکسازی سازنده NPR1 از هسته سلول‌های در حال استراحت با عملکرد هماهنگ CRL3 و پروتئوزوم برای جلوگیری از فعال‌سازی نابه‌موقع ژن‌های هدف و خودایمنی مرتبط ضروری است (Geng *et al.*, 2012; Saleh *et al.*, 2015; Skelly *et al.*, 2016; Withers and Dong, 2016; Skelly *et al.* 2019). در آرابیدوپسیس، تخریب پروتئین به‌واسطه یوبیکوئیتین برای تنظیم بیان و ثبات تنظیم

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6]

کننده‌های گلدهی مهم است (Song *et al.*, 2015). پروتئین *OsELF3* باعث افزایش گلدهی تحت شرایط روز بلند می‌شود. *OsELF3* درون هسته سلول گیاهی به‌صورت فیزیکی با پروتئین HAF1 ارتباط برقرار کرده و از طریق مسیر پروتئازوم ۲۶ (26S proteasome) یوبیکوئیتینه می‌شود. HAF1 یک لیگاز یوبیکوئیتین C3HC4 RING domain-containing E3 است. در واقع HAF1 ریتم شبانه‌روزی (Circadian Rhythm) را برای *OsELF3* حفظ می کند (Zhu *et al.*, 2018). مطالعه پروتئین هایی که با یوبیکوئیتین همکنش و ارتباط نزدیک دارند نشان داد که این پروتئین عمدتا با پروتئین‌های ریبوزمی 40S و 60S در ارتباط و همکنش می‌باشد (شکل ٦).

متالوتیونین‌ها نیز پروتئین‌هایی غنی از سیستئین با وزن مولکولی پایین هستند که در ایجاد مقاومت به فلزات سنگین و خنثی کردن اثرات سمی آن‌ها نقش ایفا می‌کنند (Carpene *et al.*, 2007; Hassinen *et al.*, 2011) و بیان ژن کدکننده‌ی آن‌ها در حضور فلزات سنگین فعال می‌شود. پروتئین‌های متالوتیانین قادرند از طریق کلاته کردن فلزات سنگین، سلول ها را در مقابل سمیت این فلزات محافظت نماید. بر اساس گزارش‌های موجود کاهش بیان ژن‌های مرتبط با افزایش تحمل نسبت به فلزات و از جمله متالوتیونین‌ها، تحریک سنتز رادیکال‌های اکسیژن فعال و اختلال در متابولیسم قندها را موجب می‌شود که نتیجه‌ی آن اختلال در فعالیت برخی آنزیم‌های سلول، تأثیر بر ساختارهای سلولی و ماده‌ی ژنتیکی است (Ghorbanli *et al.*, 2000; Hassinen *et al.*, 2011). مطالعه شبکه String برای پروتئین‌هایی که با متالوتیونین همکنش و ارتباط نزدیک دارند نشان داد که این پروتئین با دو دسته پروتئین‌های موثر در گرده افشانی و تلقیح ارتباط مستقیم و همکنش دارد. دسته اول شامل پروتئین‌های خانواده کاینزین‌ها (Kinesins) می‌باشد (شکل ٦). کاینزین‌ها از طریق اثر بر پویایی کرموزمی (Chromosomal dynamics)، گامتوژنز نر و کنترل شکافته شدن بساک، باعث ایجاد نر عقیمی می‌شوند (Zhou *et al.*, 2011). جهش در دامنه ALECTIN DOMAIN KINESIN 2 (MDKIN2) مربوط به کاینزین‌ها در گیاه آرابدوپسیس سبب ناقص ماندن دانه گرده، جنین و اندوسپرم گردید (Galindo-Trigo et al., 2020). دسته دوم پروتئین‌های دارای همکنش با متالوتیونین شامل پروتئین گلیسرول-۳-فسفات دهیدروزناز می‌باشد (شکل ٦). این پروتئین در فرآیند انرژی‌زای گلیکولیز نقش دارد و علاوه بر فعالیت آنزیمی آن، عملکردهای بسیاری مهم دیگری نیز دارد. یکی از عملکردهای آنزیم گلیسرول-۳-فسفات دهیدروزناز اثر بر رشد و نمو بذر است. جهش در ژن کد کننده این پروتئین باعث عدم تجمع نشاسته در بذر گندم و روغن در دانه روغنی کرچک کردید (Piattoni *et al.*, 2017). با در نظر گرفتن نقش محصول ژن متالوتیونین و اثر آن در حفظ تعادل فلزات در درون سلولی و همچنین نقش محصول ژن یوبی‌کوئیتین در پاک‌سازی سلول از پروتئین‌های ناقص و ناصحیح بنابراین بیان کم‌تر این دو ژن در اسپات نخل خرمای تکثیر شده با کشت بافت نسبت به نخل خرمای تکثیر شده از پاجوش در مراحل مختلف رشد اسپات، را می‌توان به‌عنوان یکی از دلایل بروز تنوع فنوتیپی و در واقع تغییرات اپی‌ژنتیک مشاهده شده در نخل خرمای حاصل از کشت بافت دانست. قندها در تنظیم برخی ژن‌ها از جمله ژن‌های مرتبط با گلدهی نقش دارند، کمبود ذخیره‌ی قندی در طی فرایند میوز ریزش گل‌ها را سبب می‌شود و فروکتوز یکی از قندهای اصلی تغذیه کننده‌ی گل‌آذین در حال رشد است (Lebon *et al.*, 2008). آنزیم فسفوفروکتوکیناز با کاتالیز ATP و تبدیل آن به ADP، فروکتوز ٦- فسفات را به فروکتوز ۱ و ٦- بیس فسفات تبدیل می‌کند (Mustroph *et al.*, 2013). این آنزیم در بیوسنتز نشاسته در گیاه نقش اساسی ایفا می‌نماید (Gu *et al.*, 2021). برای تکامل گل (اندام‌های نر و اندام‌های ماده) از مرحله تقسیم میوز تا مرحله تکامل اندام‌های گل وجود نشاسته ضروری می‌باشد (Hedhly *et al.*, 2016). بررسی تغییرات بیان این ژن در طول مراحل رشدی اسپات در پژوهش حاضر افزایش بیان فسفوفروکتوکیناز را تنها در مرحله‌ی اولیه‌ی رشد اسپات نشان داد و در طول رشد اسپات میزان بیان آن تحت تأثیر اثرات متقابل روش تکثیر و مرحله‌ی رشدی اسپات در نخل خرمای حاصل از کشت بافت نسبت به نخل خرمای حاصل از پاجوش، کم‌تر بود. بر این اساس چنین به نظر می‌رسد که ممکن است یکی از دلایل ریزش گل و میوه در نخل‌های برحی تولید شده به روش کشت بافت، کم‌تر بودن میزان بیان ژن فسفوفروکتوکیناز نسبت به نخل خرمای حاصل از پاجوش باشد. توان و همکاران (Tavan *et al.*, 2014) نیز در ارزیابی تغییرات بیان ژن فسفوفروکتوکیناز در برگ ارقام نخل

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6]

خرمای کشت بافتی و تولید شده از پاجوش در رابطه با هم‌بستگی میان بیان این ژن و صفات مرتبط با میوه‌دهی عنوان کردند که با توجه به نقش ژن فسفوفروکتوکیناز در تشکیل قند فروکتوز، افزایش بیان آن در نهایت منجر به تولید میوه‌ی بیشتر شده است.

پلی‌آدنیلات بایندینگ ژن دیگری است که در پژوهش حاضر به آن پرداخته شد. محصول این ژن کنترل میزان فرآیند ترجمه را برعهده دارد، پلی‌آدنیلات بایندینگ به دم پلی آدنیلی mRNA متصل شده و در حفاظت و نیز اتصال آن به ریبوزوم نقش دارد (Ivanov *et al.*, 2019). بررسی میزان بیان ژن پلی‌آدنیلات بایندینگ توسط توان و همکاران (Tavan *et al.*, 2014) در نمونه‌های برگی نخل‌های حاصل از کشت بافت برای ارقام دیری، برحی و زاهدی، افزایش بیان را نسبت به نخل‌های خرمای بدست آمده از پاجوش نشان داد. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر با توجه به نقش این ژن در اتصال به ریبوزوم و تنظیم میزان فرآیند ترجمه لذا رونویسی از ژن پلی‌آدنیلات بایندینگ با تقاضای بیش‌تر برای انجام رونویسی از سایر ژن‌ها همراه است که ممکن است در اثر پیام‌های هورمونی ناشی از کشت بافت باشد. بنابراین می‌توان افزایش رونویسی از آن را یک پاسخ عمومی به تولید mRNA کل گیاه دانست و هر دلیلی که میزان تولید mRNA کل را افزایش دهد سبب افزایش بیان این ژن نیز می‌گردد و مختص روش کشت بافت نیست. با در نظر گرفتن این نکته که محصول ژن پلی‌آدنیلات بایندینگ حفاظت از دم پلی‌آدنیلات mRNA و شروع ترجمه را بر عهده دارد می‌توان چنین استنباط کرد که دستورالعمل کشت بافت به کار رفته، تغییرات قابل توجهی در تنظیم بیان ژن‌ها در نخل خرمای تکثیر شده به این روش بر جای گذاشته است.

نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش برای ژن‌های مورد مطالعه نشان داد که ژن‌های متالوتیونین و یوبی‌کوئیتین در هر سه مرحله رشد اسپات نخل خرمای رقم برحی حاصل از کشت بافت بیان کمتری نسبت به رقم پاجوشی داشتند. امّا ژن‌های فسفوفرکتوکیناز و پلی‌آدنیلات بایندینگ در مرحله اول رشد اسپات رقم برحی حاصل از کشت بافت بیان بیشتری نسبت به رقم پاجوشی داشتند. اگرچه در مراحل بعدی رشد اسپات بیان آن‌ها کمتر شد. مطالعه شبکه پروتئین‌های مرتبط با پروتئین های متالوتیونین و یوبی کوئیتین نشان داد که پروتئین متالوتیونین با پروتئین‌های دخیل در رشد و نمو بذر و نرعقیمی گیاهان دارای ارتباط و همکنش می‌باشد. بنابراین می‌توان اذعان کرد که ژن متالوتیونین نسبت به سایر ژن‌های مورد مطالعه، نقش عمده‌ای در بروز عارضه عدم گرده افشانی و تلقیح گل‌های نخل خرمای رقم برحی حاصل از کشت بافت دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز بابت حمایت در انجام پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌کنند (شماره پژوهانه: ۹۷/۳/۰۲/۲۶۲۴۷).

منابع

Al Kaabi, H., Zaid, A., Shephard, H. & Ainsworth, C. (2006). AFLP variation in tissue culture-derived date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants. Paper presented at the III International Date Palm Conference 736. **doi: 10.17660/ActaHortic.2007.736.12**

Al-Khalifah, N.S., Askari, E., Hadi, S., Al-Wasel, A.S., & Metawei, M. (2007). Genetic analysis of abnormal fruiting in tissue culture-drivedtrees of date palm 'Barhy' grown in Saudi Arabia. Acta Hortic, 763: 155-165. **doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.763.20**

Al-Mayahi, A.M.W. (2022) .In vitro propagation and assessment of genetic stability in date palm as affected by chitosan and thidiazuron combinations. J Genet Eng Biotechnol, 20: 165. **doi.org/10.1186/s43141-022-00447-9**

Carpene, E., Andreani, G. & Isani, G. (2007). Metallothionein functions and structural characteristics. Journal of trace elements in medicine and biology, 21: 35-39. **doi: 10.1016/j.jtemb.2007.09.011**

Cui, X., Lu, F., Li, Y., Xue, Y., Kang, Y., Zhang, S., et al. (2013). Ubiquitin-specific proteases UBP12 and UBP13 act in circadian clock and photoperiodic flowering regulation in Arabidopsis. Plant Physiol. 162: 897-906. **doi: 10.1104/pp.112.213009**

Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? Frontiers in plant science, 10: 536. **doi.org/10.3389/fpls.2019.00536**

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6]

Galindo-Trigo, S., Grand, T.M., Voigt, C.A., & Smith, L.M. 2020. A malectin domain kinesin functions in pollen and seed development in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany, 71(6): 1828-1841. **doi: 10.1093/jxb/eraa023**

Ghorbanli, M., Kaveh, S.H. & Sepehr, M.F. (2000). Effects of cadmium and gibberellin on growth and photosynthesis of *Glycine max.* Photosynthetica, 37: 627-631. **doi.org/10.1023/A:1007135928024**

Gu, A.Y., Han, S., Chen, L., Mu, J., Duan, L., Li, Y., Yan,Y., & Li, X. (2021). Expression and regulation of genes involved in the reserve starch biosynthesis pathway in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). The Crop Journal, 9(2): 440-455. **doi.org/10.1016/j.cj.2020.08.002**

Gurevich, V., Lavi, U. & Cohen, Y. (2005). Genetic variation in date palms propagated from offshoots and tissue culture. Journal of the American Society for Horticultural Science, 130: 46-53. **doi:10.21273/JASHS.130.1.46**

Hassinen, V., Tervahauta, A., Schat, H. & Kärenlampi, S. (2011). Plant metallothioneins–metal chelators with ROS scavenging activity? Plant Biology, 13: 225-232. **doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00398.x**

Hedhly, A., Vogler, H., Schmid, M.W., Pazmino, D., Gagliardini, V., Santelia, D., Grossniklaus, U. (2016). Starch turnover and metabolism during flower and early embryo development. Plant Physiology. 172(4): 2388–2402. **doi.org/10.1104/pp.16.00916**

Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. Annual review of biochemistry, 67: 425-479. **doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425**

Hussain Mallhi, T., Qadir, MI, Ali, M., Ahmad, B. & Khan, Y.H. (2014). Ajwa date (*Phoenix dactylifera*): an emerging plant in pharmacological research. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 27(3): 607-616.

Ivanov, A., Shuvalova, E., Egorova, T., Shuvalov, A., Sokolova, E., Bizyaev, N., Shatsky, I., Terenin, I. & Alkalaeva, E. (2019). Polyadenylate-binding protein–interacting proteins PAIP1 and PAIP2 affect translation termination. Journal of Biological Chemistry, 294: 8630-8639. **doi: 10.1074/jbc.RA118.006856**

Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F. & Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant gene silencing: 59-68. **doi: 10.1023/a:1006423110134**

Kordrostami, M., Mafakheri, M. & Al-Khayri, J.M. (2022). Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) genetic improvement via biotechnological approaches. Tree Genetics & Genomes, 18: 26. **doi.org/10.1007/s11295-022-01559-6**

Lebon, G., Rondeau, M., Sanchez, L., Barka, E.A., Vaillant-Gaveau, N., Clément, C. & Jacquard, C. (2016). Modulation of the activity of enzymes involved in carbohydrate metabolism during flower development of grapevine (*Vitis Vinifera* L.). Plant Sci, 1: 010-017. https://www.peertechzpublications.org/articles/OJPS-1-103.pdf

Lebon, G., Wojnarowiez, G., Holzapfel, B., Fontaine, F., Vaillant-Gaveau, N. & Clément, C**.** (2008). Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). Journal of experimental botany, 59: 2565-2578. **doi: 10.1093/jxb/ern135**

Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods, 25: 402-408. **doi: 10.1006/meth.2001.1262.**

Manzari-Fallah, M., Pazhouhandeh, P., & Bordbar, M. (2020). Delayed flowering in lettuce using MSI4 gene silencing by RNAi. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 9(2): 136-148. **DOR:20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0** (In Farsi with English abstract)

McCubbin, M., Zaid, A. and Van Stade, J. (2004). A southern African survey conducted for off-types on date palms produced using somatic embryogenesis. Emirates Journal of Food and Agriculture, 16(1): 8-14. **doi: https://doi.org/10.9755/ejfa.v12i1.5213**

Mirani, A.A., Teo, C.H., Markhand, G.S. et al. (2020). Detection of somaclonal variations in tissue cultured date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using transposable element-based markers. Plant Cell Tiss Organ Cult 141, 119–130. **doi.org/10.1007/s11240-020-01772-y**

Mirani, A.A., Jatoi, M.A., Bux, L., Teo, C.H., Kabiita, A.I., Harikrishna, J.A., Markhand, G.S., Jatt, T., Solangi, N., Abro, S., & Channa, G.S. (2022). Genetic stability analysis of tissue culture derived date palm cv. Dedhi plants using IRAP markers. Acta Ecologica Sinica, 42(1):76-81. **doi.org/10.1016/j.chnaes.2021.02.011**

Moradi, B., Maivan, H.Z., Sorahinobar, M., & Hashtroudi, M.S. (2018). Determination of suitable housekeeping genes for normalization of quantitative real time PCR analysis of *Avicennia marina* under crude oil treatment. The Journal of Marine Sciences and Techniques,17(4): 58-69. (In Farsi with English abstract). **doi.org/10.22113/jmst.2017.50082**

Morcillo, F., Gagneur, C., Adam, H., Richaud, F., Singh, R., Cheah, S.-C., Rival, A., Duval, Y. & Tregear, J.W. (2006). Somaclonal variation in micropropagated oil palm. Characterization of two novel genes with enhanced expression in epigenetically abnormal cell lines and in response to auxin. Tree Physiology, 26: 585-594. **doi: 10.1093/treephys/26.5.585**

Mustroph, A., Stock, J., Hess, N., Aldous, S., Dreilich, A. & Grimm, B. (2013). Characterization of the phosphofructokinase gene family in rice and its expression under oxygen deficiency stress. Frontiers in plant science, 4: 125. **doi.org/10.3389/fpls.2013.00125**

Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., & Ziegler-Graff V. (2006). F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. PNAS, 103(6):1994-1999. **Doi.org/10.1073/pnas.0510784103**

Pazhouhandeh, M., Karvan G. & Razavi AS. (2017). A review on potato genetic engineering researches yet. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 6(1): 175-188. **DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.1.3** (In Farsi with English abstract)

Piattoni, C.V., Ferrero, D.M.L., Dellaferrera, I., Vegetti, A., & Iglesias A.Á. (2017). Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated during seed development. Front. Plant Sci. 8:522. **doi.org/10.3389/fpls.2017.00522**

Pickart, C.M. & Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1695: 55-72. **DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.019**

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6]

Qadir, A., Shakeel, F., Ali, A. & Faiyazuddin, M. (2020). Phytotherapeutic potential and pharmaceutical impact of *Phoenix dactylifera* (date palm): current research and future prospects. Journal of food science and technology, 57: 1191-1204. **doi: 10.1007/s13197-019-04096-8**

Rajaee Behbahani, S., Iranbakhsh, A., Ebadi, M., Majd, A., & Ardebili, Z.O. (2020) Red elemental selenium nanoparticles mediated substantial variations in growth, tissue differentiation, metabolism, gene transcription, epigenetic cytosine DNA methylation, and callogenesis in bittermelon (*Momordica charantia*); an *in vitro*

experiment. PLoS ONE 15(7): e0235556. **doi: 10.1371/journal.pone.0235556**

Saeiahagh H, Mousavi M, Wiedow C. et al. (2019). Effect of cytokinins and sucrose concentration on the efficiency of micropropagation of 'Zes006' *Actinidia chinensis* var. Chinensis, a red-fleshed kiwifruit cultivar. Plant Cell Tiss Organ Cult, 138: 1–10. **doi.org/10.1007/s11240-019-01597-4**

Saker, M., Adawy, S., Mohamed, A. & El-Itriby, H. (2006). Monitoring of cultivar identity in tissue culture-derived date palms using RAPD and AFLP analysis. Biologia Plantarum, 50: 198-204. **doi.org/10.1007/s10535-006-0007-3**

Skelly, M.J., Furniss, J.J., Grey, H., Wong, K.W., & Spoel. S.H. (2019). Dynamic ubiquitination determines transcriptional activity of the plant immune coactivator NPR1. eLife 8:e47005. **doi: 10.7554/eLife.47005**

Song, Y.H., Shim, J.S., Kinmonth-Schultz, H.A., & Imaizumi, T. (2015). Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves. Annu. Rev. Plant Biol. 66: 441–464. **doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-115555**

Stroud, H., Stacey, B.D., A Simon, S.A., Feng, D., Bellizzi, M., Pellegrini, M., Wang, G.L., Meyers, B.C., & Jacobsen, S.E. (2013). Plants regenerated from tissue culture contain stable epigenome changes in rice. eLife 2:e00354. **doi.org/10.7554/eLife.00354**

Tavan, Z., Alami-Saeid, K., Shafee Nia, A.R.V, & Pour-Mohammadi, P. (2014). Comparison of the expression level of important plant genes obtained from palm tissue culture with the plant of offshoot by qRT-PCR method. Biotechnology master's thesis, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University. (In Farsi with English abstract).

von Mikecz, A. (2006). The nuclear ubiquitin-proteasome system. Journal of cell science, 119: 1977-1984. **doi: 10.1242/jcs.03008**

Wang, X., Wu, R., Lin, X. et al. (2013) Tissue culture-induced genetic and epigenetic alterations in rice pure-lines, F1 hybrids and polyploids. BMC Plant Biol, 13:77. **doi.org/10.1186/1471-2229-13-77**

Wibowo, A., Becker, C., Durr, J., & Gutierrez-Marcos, J. (2018). Partial maintenance of organ-specific epigenetic marks during plant asexual reproduction leads to heritable phenotypic variation. PNAS, 115 (39): E9145-E9152 **doi.org/10.1073/pnas.1805371115**

Yu, Z., Lin, J., & Li, Q.Q. (2019). Transcriptome analyses of Fy mutants reveal its role in mRNA alternative polyadenylation. Plant Cell, 31: 2332-2352. **doi.org/10.1105/tpc.18.00545**

Yuval, C., Christopher A.C., & Lavi Uri. (2010) Molecular analyses of soma-clonal variation in date palm and banana for early identification and control of off-types generation" Date Palm Biotechnology, 221-235. **doi: 10.32747/2010.7592124.bard**

Zahri, S., & Malaki, F. (2017). Increment of ascorbate peroxidase and metalothionin gene expressions by the cold stress in varieties of rape (*Brassica napus*). Iranian Journal of Plant Biology, 6(20): 47-54. (In Farsi with English abstract). **dor: 20.1001.1.20088264.1393.6.20.5.8**

Zaid, A. & De Wet, P. (1999). Chapter V Date palm propagation. FAO Plant Production and Protection Papers: 74-106. https://www.fao.org/3/Y4360E/y4360e09.htm

Zhou, S., Yang Wang, Y., Wanchang Li, W. et al. (2011). Pollen semi-sterility1 encodes a Kinesin-1–Like Protein

important for male meiosis, anther dehiscence, and fertility in rice. The Plant Cell, 23: 111–129. **doi: 10.1105/tpc.109.073692**

Zhu, C., Peng,Q., Fu,D., Zhuang, D., Yu, Y., Duan,M., Xie,W., Cai, Y., Ouyang, Y., Lian, X., & Wua, C. (2018). The E3 Ubiquitin Ligase HAF1 modulates circadian accumulation of EARLY FLOWERING3 to control heading date in rice under long-day conditions. The Plant Cell, 30: 2352–2367. **doi.org/10.1105/tpc.18.00653**

Zivdar, S., Mousawi, M., & Ansari, N.A. (2008). Genetic stability in date palm micropropagation. Asian Journal of Plant Science, 7(8): 775-778. **doi:10.3923/ajps.2008.775.778**

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.12.6]