

مطالعه ساختار ژن *OeAOX2* مرتبط با ریشه‌زایی در بین ژنوتیپ‌های زیتون*(Olea europea L.)* بومی ایرانوحیده هدایتی<sup>۱</sup>، امیر موسوی<sup>۱\*</sup>، ثریا موسوی<sup>۲</sup>، زهرا هاشم‌آبادی<sup>۱</sup> و سید مهدی حسینی مزینانی<sup>۱</sup><sup>۱</sup> تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (NIGEB)<sup>۲</sup> ایتالیا، پروجا، انستیتو علوم زیستی و منابع طبیعی (IBBR-CNR)

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۵



## چکیده

زیتون (*Olea europaea L.*) یکی از مهمترین گونه‌های باغی در حوزه مدیترانه است که روش تکثیر آن از طریق قلمه می‌باشد. ریشه‌زایی قلمه‌ها یکی از فرایندهای اساسی در ازدیاد گیاه زیتون است. توانایی ریشه‌زایی در قلمه گیاهان و ارقام مختلف بطور معنی‌داری با یکدیگر متفاوت است. از طرفی ژن‌های متعددی در این فرایند نقش دارند. یکی از این ژن‌ها *OeAOX2* می‌باشد که در تعادل انواع اکسیژن واکسنی نقش اصلی را بر عهده دارد و به‌عنوان ژن کاندید در القای ریشه‌زایی در جمعیت زیتون ایتالیایی حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های لچینو و دلچه آگوجا معرفی شده است. در این مطالعه، توانایی ریشه‌زایی در قلمه‌های ۹۹ ژنوتیپ زیتون ایران از استان‌های مختلف بررسی شد و ژنوتیپ‌ها با توانایی ریشه‌زایی بالا و پایین تعیین شدند. سپس بررسی طول کامل ژن *OeAOX2* در دو ژنوتیپ زیتون ایران، دالاهو (ریشه‌زایی بالا) و اوزینه (ریشه‌زایی پایین) به ترتیب از استان‌های کرمانشاه و گلستان، انجام شد. همچنین، توالی این ژن در ۲۰ ژنوتیپ زیتون ایران با ریشه‌زایی بالا و پایین در ناحیه 5' UTR و آگزون شماره ۱ نیز بررسی گردید. بررسی‌های بیوانفورماتیکی طول کامل ژن *OeAOX2* در دالاهو و اوزینه نشان داد که چندشکلی‌های زیادی در نواحی اینترون وجود دارد ولی در سطح آگزون‌ها تنها یک چندشکلی مشاهده شد. از سوی دیگر، بررسی چند شکلی‌های این ژن در ۲۰ ژنوتیپ دیگر زیتون ایران مشخص نمود که این چند شکلی‌ها منجر به تغییر اسیدهای آمینه‌ها نمی‌شود و احتمالاً ژن *OeAOX2* در سطح ترانسکریپتوم و تفاوت بیان، القای ریشه‌زایی را می‌تواند تحت تأثیر قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: ژنوتیپ‌های زیتون ایران، توان ریشه‌زایی، چندشکلی، ژن *OeAOX2*

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۳۰۵، پست الکترونیکی: m-amir@nigeb.ac.ir

## مقدمه

مدت‌زمان کوتاه‌تری تکثیر نمود. تولید ریشه از بخش‌هایی نظیر ساقه یا قلمه از نظر مولکولی فرایندی بسیار پیچیده است که بصورت طبیعی در گیاه رخ می‌دهد. بنابراین، شناسایی عوامل کنترل‌کننده‌ی تولید ریشه اعم از عوامل فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و مولکولی گام مهمی در فرایند ازدیاد زیتون محسوب می‌شود. شناسایی ژن‌های مؤثر در ریشه‌زایی قلمه‌های زیتون به‌منظور افزایش توان ریشه‌زایی ارقام و ژنوتیپ‌های بومی زیتون ایرانی از

زیتون (*Olea europaea L.*) درختی همیشه سبز از تیره Oleaceae و از قدیمی‌ترین گیاهان منطقه مدیترانه و ایران است. این گیاه دیپلوئید ( $2n=46$ )، هتروزیگوت و تک‌پایه است. ازدیاد زیتون به دو روش جنسی و غیرجنسی می‌باشد که روش ازدیاد غیرجنسی از طریق قلمه ارزان‌تر و سریع‌تر از روش‌های دیگر می‌باشد. شایان ذکر است که با روش ازدیاد غیرجنسی می‌توان پایه‌های مطلوب و امیدبخش را با حفظ خصوصیات ژنتیکی گیاه‌پایه، در

ریشه‌زایی از جمله تعداد قلمه‌های ریشه‌دار شده، درصد ریشه‌زایی، طول و تعداد ریشه‌ها اندازه‌گیری شدند و ژنوتیپ‌های زیتون با ریشه‌زایی بالا و پایین از یکدیگر تفکیک گردیدند.

**همسانه‌سازی ژن *OeAOX2* در ۲۲ ژنوتیپ زیتون بومی ایران:** به منظور توالی‌یابی طول کامل ژن *OeAOX2* در ژنوتیپ‌های منتخب ایرانی، از نواحی مختلف آن نظیر انتهای ۳' و ۵' ژن، نواحی داخل آگزون و گاهای اینترون، آغازگرهای کاملاً اختصاصی طراحی گردید (جدول ۱). از برگ‌های تازه، نمونه‌ها DNA استخراج شد و کیفیت DNA با دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ ۲۰۰۰C (Thermo Scientific) تأیید گردید، سپس حدود ۳۰-۲۰ نانوگرم از DNAها جهت انجام واکنش PCR استفاده شد و با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده از ژن *OeAOX2* بهینه‌سازی آزمون PCR صورت گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۰ μl شامل ۲۰ تا ۳۰ نانوگرم از DNA، ۲ μl از بافر 10X، ۱ μl از MgCl<sub>2</sub> (50mM)، آغازگرها 10 pmol به مقدار ۱ μl و آنزیم *Taq* به مقدار ۰/۲ μl و با شرایط ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با ۹۴ °C، ۲۵ ثانیه، ۵۸ °C، ۲۵ ثانیه و ۷۲ °C، ۲ دقیقه و تکثیر نهایی ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده گردید.

سپس قطعات تکثیر شده وارد ناقل پلاسمیدی pTG19-T (*Sinaclone*) شدند. واکنش اتصال شامل، DNA ناقل (25 μl) و ۱ μl ng/μl بافر اتصال (10X)، محصول PCR ۵ μl و آنزیم *T4 DNA Ligase* ۱ μl در حجم ۱۰ μl بود و به مدت ۱ ساعت در ۲۲ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت یک شبانه روز در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول آزمایش اتصال وارد سویه‌ی *E. coli* DH5a شد و باکتری‌ها بر روی محیط LB/Amp/IPTG/X-GAL کشت شدند. جهت تأیید مجدد کلونی‌های رشد کرده در محیط کشت، واکنش Colony PCR انجام شد و محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده گردید. از هر ژنوتیپ

اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدایتی و همکاران در سال ۲۰۱۵ برای اولین بار ژن اکسیداز تناوبی ۲ زیتون (*OeAOX2*) را کاندید مناسبی جهت غربالگری زیتون‌های با توان ریشه‌زایی متفاوت در جمعیت زیتون ایتالیایی معرفی نمودند. این ژن از زنجیره‌ی تنفسی در UQ مشتق شده و بدون انتقال پروتون، اکسید شدن UQH<sub>2</sub> را کاتالیز کرده و اکسیژن (O<sub>2</sub>) را به آب احیا می‌کند و بیان آن در قلمه‌های زیتون با ریشه‌زایی بالا در جمعیت زیتون ایتالیایی مورد مطالعه افزایش می‌یابد (۹). در تحقیق حاضر برای اولین بار، صفات مرتبط با ریشه‌زایی در ۹۹ ژنوتیپ زیتون ایرانی ثبت گردید و بر آن اساس ژنوتیپ‌های با ریشه‌زایی بالا (۹۳ تا ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی) و ژنوتیپ‌های با ریشه‌زایی پایین (۶ تا ۳۱ درصد ریشه‌زایی) مشخص شدند. سپس توالی کامل ژن *OeAOX2* با طول حدود ۴۰۰۰ جفت باز در ژنوتیپ‌های دالاهو با ۹۴ درصد ریشه‌زایی از استان کرمانشاه و اوزینه با ۳۱ درصد ریشه‌زایی از استان گلستان همسانه‌سازی و بررسی شد. از سوی دیگر، منطقه 5'UTR و آگزون ۱ در ۲۱ ژنوتیپ دیگر با ریشه‌زایی بالا و پایین نیز جهت یافتن چندشکلی مرتبط با القای ریشه‌زایی مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روشها

**مواد گیاهی:** در این تحقیق از ۹۹ ژنوتیپ زیتون ایران از استان‌های گلستان، کرمانشاه، گیلان، زنجان، خراسان جنوبی، لرستان، خوزستان، کهگیلویه، بوشهر، یزد، ایلام و فارس، موجود در کلکسیون زیتون ایران واقع در استان گلستان، استفاده شد (۱۴ و ۱۵). قلمه‌گیری از بخش بالای کانبوی و شاخه‌های یکساله صورت گرفت. هر قلمه حاوی ۴ گره (Node) و ۴ برگ رأسی بود. حداقل ۲۰ قلمه از هر ژنوتیپ، تهیه شد و از هورمون IBA (Indole-3-Butyric Acid) با غلظت ۲۰۰۰ ppm به منظور ریشه‌دار شدن استفاده گردید. قلمه‌ها در گلخانه میست با رطوبت بالاتر از ۹۰ درصد و دمای بستر ۲۳ درجه سانتی‌گراد و دمای محیط ۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از دو ماه، صفات

دیگر از آغازگرهای 5'UTR-For و Intron 1-Rev جهت تکثیر آگرون ۱ و ناحیه 5'UTR در ۲۱ ژنوتیپ استفاده و محصول PCR مستقیماً توالی یابی شد.

دو کلون حاوی قطعه ژن مورد نظر برای توالی‌یابی ارسال گردید. به‌منظور توالی‌یابی ژن *OeAOX2* از آغازگرهای متفاوت و همپوشان، استفاده گردید (جدول ۱). از سوی

جدول ۱- فهرست آغازگرهای مورد استفاده جهت همسانه‌سازی ژن *OeAOX2*

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگرها (3'>5')
<i>OeAOX2</i> -5' UTR-For2	GTTTTTCACCGGGCGTAGTA
<i>OeAOX2</i> -exon 1-For	GCGGAGATCTCTGATGAAGC
<i>OeAOX2</i> -intron 1-Rev	TGTGGATCGAGCTCACAGAG
<i>OeAOX2</i> -exon 2-Rer	CTGGA AAAAATATATCTGTTGGAATT
<i>OeAOX2</i> -intron 2-For	TCAATTTATGTTGCATATCTTAACCAG
<i>OeAOX2</i> -exon 3-Rev	CTCGATGGTGGGCTTCAT
<i>OeAOX2</i> -3'UTR-Rev	TGTATAACAAAACCGGGACCA

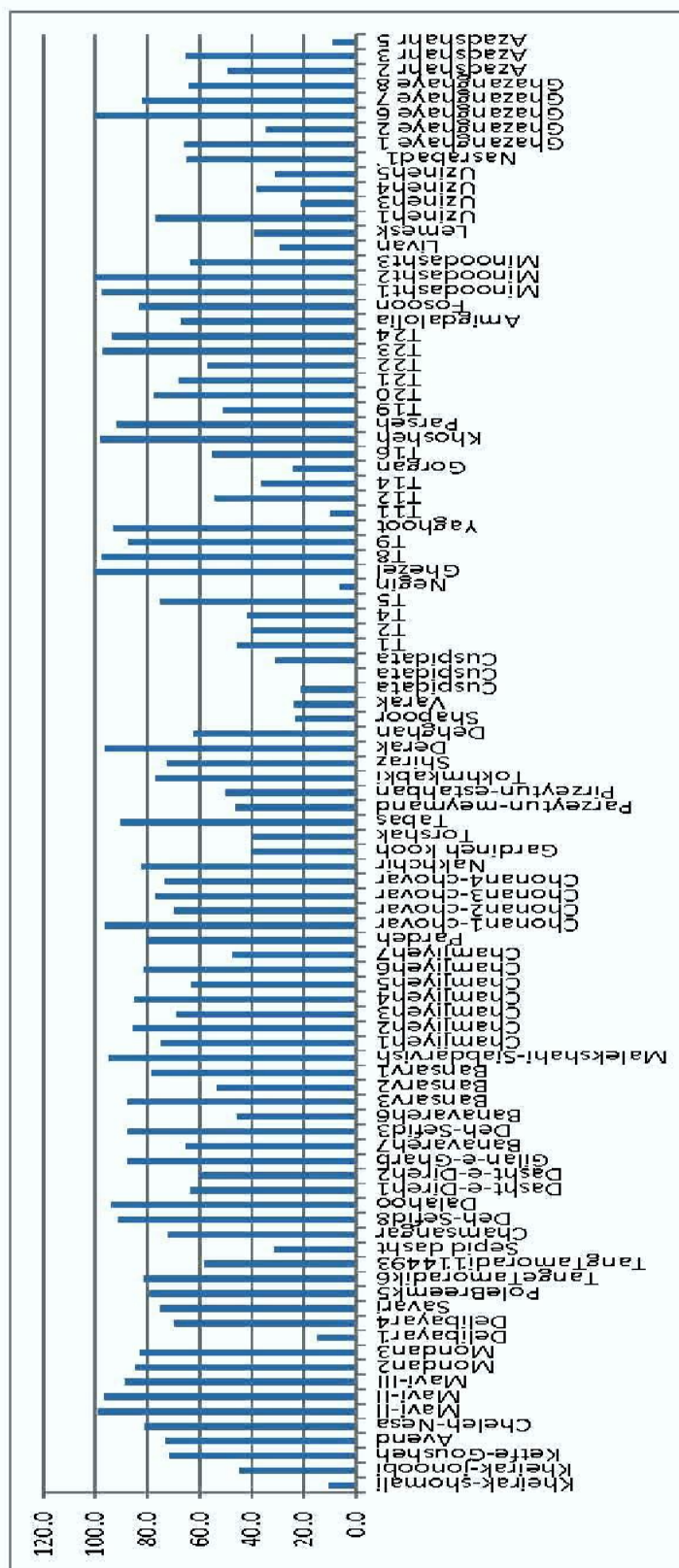
سفید ۸ (استان کرمانشاه)، ملکشاهی سیاب درویش و چونان ۱- چوار (استان ایلام)، طبس (استان یزد) و دراک (استان فارس) بعنوان ژنوتیپ‌های با توان ریشه‌زایی بالا و ژنوتیپ‌های اوزینه، لیوان و آزادشهر ۶ (استان گلستان)، سپید دشت (استان لرستان)، دلی بایار ۱ (استان کهگیلویه) و وارک (استان فارس) بعنوان ژنوتیپ‌های با توان ریشه‌زایی پایین انتخاب شدند (جدول ۲). ژن اکسیداز تنابویی (*AOX*) در گیاهان، خانواده‌ی چند ژنی هسته‌ای کوچکی هستند که در تک لپه‌ای‌ها فقط *AOX1* و در دولپه‌ای‌ها *AOX1* و *AOX2* وجود دارد (۱۰ و ۱۹). البته ژن‌های ارتولوگ *AOX* در گونه‌های مختلف به صورت متفاوتی به تنش‌های زیستی و غیرزیستی پاسخ می‌دهند (۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۷) تاکنون مطالعات بیانی در مورد ژن‌های *AOX* در گیاهان تک‌لپه‌ای (۶، ۷، ۲۱ و ۲۳) و دولپه‌ای علفی نظیر آرابیدوپسیس (۷ و ۲۳)، سویا (۶)، یونجه (۴)، هویج (۳)، ذرت (۱۸)، کاساوا (۲۴) و خیار (۲۰) انجام شده است. درحالی که در درختان گزارشات محدودی در این زمینه وجود دارد (۲۲ و ۵). برای اولین بار هدایتی و همکاران (۲۰۱۵) ژن *OeAOX2* را به‌عنوان ژن کاندید و مؤثر در القای ریشه‌زایی زیتون معرفی کردند (۸)، این ژن با طول حدود ۴۰۰۰ جفت باز دارای چهار آگرون و سه اینترون می‌باشد (شکل ۲). همچنین نوگالس و همکاران در سال ۲۰۱۵ به دلیل چندشکلی زیاد در این ژن، آن را بعنوان یک نشانگر مولکولی جهت برنامه‌های اصلاحی در هویج معرفی نمودند (۱۶).

**بررسی بیوانفورماتیکی ژن *OeAOX2* در ژنوتیپ‌های زیتون ایرانی:** نتایج توالی‌یابی‌های مرتبط با یک کلونی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit مورد بررسی قرارگرفت و با ساختن قطعات Contig طول کامل ژن در هر کلونی بدست آمد. سپس توالی‌های کامل ژن *OeAOX2* از ژنوتیپ‌های دالاهو (از استان کرمانشاه) و اوزینه (از استان گلستان) با ۴ آلل ثبت شده از این ژن در دو والد زیتون ایتالیایی در بانک اطلاعاتی NCBI، هم‌ردیف و مقایسه شد. از سوی دیگر توالی پروتئینی *OeAOX2* در ژنوتیپ‌های دالاهو و اوزینه از طریق Expasy translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>) بدست آمد. سپس این توالی پروتئینی با توالی پروتئینی حاصل از این ژن در ژنوتیپ‌های زیتون ایتالیایی مقایسه گردید. از سوی دیگر، ناحیه 5'UTR و آگرون اول ژن *OeAOX2* در ۲۱ ژنوتیپ زیتون ایرانی شامل ۱۴ ژنوتیپ با ریشه‌زایی بالا و ۶ ژنوتیپ با ریشه‌زایی پایین (جدول ۲) تکثیر و توالی‌یابی شد و با ژنوتیپ‌های دالاهو و اوزینه مقایسه شدند. چندشکلی‌های مشاهده‌شده در آگرون شماره ۱ ژن با تبدیل به اسیدآمین و پروتئین نیز بررسی شدند.

## نتایج و بحث

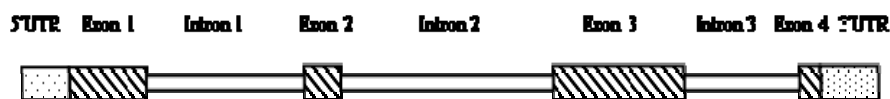
نمودار میزان ریشه‌زایی برای ۹۹ ژنوتیپ زیتون بومی ایران بر مبنای ثبت صفات ریشه‌زایی (۹) ترسیم شد (شکل ۱). سپس ژنوتیپ‌های دالاهو (استان کرمانشاه)، ماوی ۲ (استان خوزستان)، مینودشت ۲ و قاضانقایه ۶ (استان گلستان)، ده

شکل ۱- توزیع ریش‌آبایی در ۴۹ ژنوتیپ زیتون بومی ایران



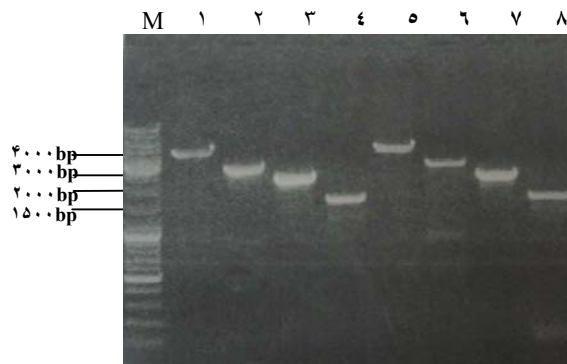
جدول ۲- ژنوتیپ‌های زیتون ایران با ریشه‌زایی بالا و پایین

شماره	ژنوتیپ‌های زیتون ایران	استان	درصد ریشه‌زایی (%)	ریشه‌زایی بالا/پایین
۱	سپید دشت	لرستان	۳۲	ریشه‌زایی پایین
۲	دلی بابار ۱	کهگیلویه	۱۵	ریشه‌زایی پایین
۳	وارک	فارس	۲۴	ریشه‌زایی پایین
۴	لیوان	گلستان	۲۹	ریشه‌زایی پایین
۵	اوزینه ۵	گلستان	۳۱	ریشه‌زایی پایین
۶	آزادشهر ۵	گلستان	۹	ریشه‌زایی پایین
۷	نگین	گلستان	۶	ریشه‌زایی پایین
۸	گرگان	گلستان	۲۴	ریشه‌زایی پایین
۹	ماوی ۲	خوزستان	۱۰۰	ریشه‌زایی بالا
۱۰	مینودشت ۲	گلستان	۱۰۰	ریشه‌زایی بالا
۱۱	قاضانقایه ۶	گلستان	۱۰۰	ریشه‌زایی بالا
۱۲	ده سفید ۸	کرمانشاه	۹۳	ریشه‌زایی بالا
۱۳	دالاهو	کرمانشاه	۹۴	ریشه‌زایی بالا
۱۴	طبس	یزد	۹۷	ریشه‌زایی بالا
۱۵	ملکشاهی-سیابدرویش	ایلام	۹۵	ریشه‌زایی بالا
۱۶	چونان ۱-چوار	ایلام	۹۶	ریشه‌زایی بالا
۱۷	دراک	فارس	۹۶	ریشه‌زایی بالا
۱۸	قزل	گلستان	۱۰۰	ریشه‌زایی بالا
۱۹	T8	گلستان	۹۸	ریشه‌زایی بالا
۲۰	یاقوت	گلستان	۹۳	ریشه‌زایی بالا
۲۱	خوشه	گلستان	۹۸	ریشه‌زایی بالا
۲۲	پارسه	گلستان	۹۲	ریشه‌زایی بالا
۲۳	T23	گلستان	۹۷	ریشه‌زایی بالا

شکل ۲- طول کامل ژن *OeAOX2* (شامل ۴ اگزون و ۳ اینترون)

و توالی‌یابی طول کامل ژن *OeAOX2* از دو ژنوتیپ دالاهو (با توان ریشه‌زایی بالا) و اوزینه (با توان ریشه‌زایی پایین) انجام شد (شکل ۳) و از ترکیب آغازگرهای مختلف برای تأیید قطعه مربوط براساس جدول ۳ استفاده گردید.

همچنین آنها نشان دادند که ژن *OeAOX2* در زیتون‌های ایتالیایی لچینو و دلچه آگوجا هتروزیگوت است و تفرق حاصل از تلاقی آل‌های این دو والد، منجر به بروز نتایج با ریشه‌دهی متفاوت می‌شود. به‌منظور یافتن ارتباط بین ژن مذکور و ریشه‌زایی در ژنوتیپ‌های زیتون ایران، جداسازی



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR انجام شده از مسیرهای ۱ و ۵ (M1)، ۲ و ۶ (M2)، ۳ و ۷ (M3)، ۴ و ۸ (M4)؛ همچنین مسیرهای ۱ تا ۴ DNA اوزینه و مسیرهای ۵ تا ۸ DNA دالاهو می‌باشد. مسیر M مربوط به نشانگر وزن مولکولی (Fermentas) Ladder Mix است و مسیرهای ۱-۴ در جدول ۳ توصیف شده‌اند.

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن *OeAOX2*

نام Master تهیه شده	جفت آغازگرهای اختصاصی ( <i>OeAOX2</i> )	دمای اتصال	طول محصول تکثیر یافته
M1	5'-UTR-For2 و 3'-UTR-Rev	۶۰°C	۳۸۰۸ bp
M2	exon 1-For و Exon 3-Rev2	۶۰°C	۲۵۷۲ bp
M3	intron 2-For و 3'-UTR-Rev	۶۰°C	۲۵۸۰ bp
M4	intron 2-For و exon 3-Rev	۶۰°C	۱۶۰۵ bp

بررسی‌های بیوانفورماتیکی طول کامل ژن *OeAOX2* در ژنوتیپ‌های دالاهو و اوزینه مشخص نمود که چهار چندشکلی در اگزون ۱ و چهار چندشکلی در اینترون‌ها و حذف ۳ نوکلئوتید در اینترون دوم اوزینه وجود دارد. مقایسه ژن مذکور در ژنوتیپ‌های دالاهو و اوزینه با آلل ۴ گزارش شده از آن در ارقام زیتون ایتالیایی (۸) در بانک اطلاعاتی NCBI مشخص نمود که چندشکلی‌های موجود در ناحیه 5'UTR ژن *OeAOX2* در ارقام زیتون ایتالیایی، در ژنوتیپ‌های ایرانی وجود ندارد ولی حذف شدگی ۵۸ جفت بازی ناحیه اینترون دوم در هر دو ژنوتیپ ایرانی مشاهده شد در حالی که این حذف‌شدگی در همین ناحیه تنها در آلل شماره ۲ رقم لچینو وجود داشت. از سوی دیگر به دلیل مشاهده چندشکلی در اگزون ۱ ژن *OeAOX2* در دالاهو و اوزینه، این ناحیه به همراه 5'UTR در ۲۱ ژنوتیپ دیگر زیتون ایران با ریشه‌زایی بالا و پایین نیز بررسی شد. مطالعات نشان داد که سه چندشکلی در ناحیه 5'UTR در موقعیت‌های ۴۵، ۶۰ و ۱۱۲ جفت بازی و ۴ چندشکلی در موقعیت‌های ۱۸۳، ۲۱۶، ۳۱۸ و ۳۷۷ در اگزون شماره یک وجود دارد ولی تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های با توان ریشه‌زایی بالا و پایین یافت نشد. در بعضی از ژنوتیپ‌های با توان ریشه‌زایی بالا و پایین، جفت‌بازهای هتروزیگوت هم مشاهده شد (جدول ۴) ولی چندشکلی‌های موجود در اگزون ۱، اسیدآمینو را در سطح پروتئین تغییر نداد و فقط تغییر نوکلئوتید در باز ۳۷۷ (T بجای A) در ژنوتیپ‌های دراک و مینودشت ۶، اسیدآمینو والین را جایگزین گلوتامیک اسید نمود. در اکثر ژنوتیپ‌ها نوکلئوتید آدنین در موقعیت ۳۷۷ مشاهده شد، در حالی که در ژنوتیپ‌های لیوان با ۲۹ درصد ریشه‌زایی، قازانقایه ۶، ملکشاهی-سیاب درویش و T18 به ترتیب با ۱۰۰٪، ۹۴/۶٪ و ۹۱/۶٪ ریشه‌زایی در این موقعیت نوکلئوتید A یا T قرارداشت.

بررسی‌های بیوانفورماتیکی طول کامل ژن *OeAOX2* در ژنوتیپ‌های دالاهو و اوزینه مشخص نمود که چهار چندشکلی در اگزون ۱ و چهار چندشکلی در اینترون‌ها و حذف ۳ نوکلئوتید در اینترون دوم اوزینه وجود دارد. مقایسه ژن مذکور در ژنوتیپ‌های دالاهو و اوزینه با آلل ۴ گزارش شده از آن در ارقام زیتون ایتالیایی (۸) در بانک اطلاعاتی NCBI مشخص نمود که چندشکلی‌های موجود در ناحیه 5'UTR ژن *OeAOX2* در ارقام زیتون ایتالیایی، در ژنوتیپ‌های ایرانی وجود ندارد ولی حذف شدگی ۵۸ جفت بازی ناحیه اینترون دوم در هر دو ژنوتیپ ایرانی مشاهده شد در حالی که این حذف‌شدگی در همین ناحیه تنها در آلل شماره ۲ رقم لچینو وجود داشت. از سوی دیگر به دلیل مشاهده چندشکلی در اگزون ۱ ژن *OeAOX2* در دالاهو و اوزینه، این ناحیه به همراه 5'UTR در ۲۱ ژنوتیپ دیگر زیتون ایران با ریشه‌زایی بالا و پایین نیز بررسی شد. مطالعات نشان داد که سه چندشکلی در

جدول ۴- چند شکلی‌های مشاهده شده در ناحیه 5'UTR و آگزون شماره ۱ در ژن *OeAOX2* در ۲۳ ژنوتیپ زیتون ایران

	Rooting%	5' UTR			Exon 1				Protein			
		45 bp	60 bp	112 bp	183 bp	216 bp	318 bp	377 bp	23	34	68	88
سپید دشت	31.4	C	A	A	G	G	G	A	M	R	S	E
دلی بایار ۱	14.5	C	A	A	G	G	G	A	M	R	S	E
وارک	23.5	C	A	A	G	G	G	A	M	R	S	E
لیوان	29	T	A/C	A	G	G	G	A/T	M	R	S	E/V
اوزینه ۵	31	T	A	A	G	A	G	A	M	R	S	E
آزادشهر ۵	8.9	T	A	A	G	G	G	A	M	R	S	E
نگین	6	T	A	A/C	G	G	G	A	M	R	S	E
گرگان	24.2	T	A	A	G	A	G	A	M	R	S	E
ماوی ۲	98.8	T	A	A	G	A	G	A	M	R	S	E
مینودشت ۲	100	T	C	A	G	G	G	T	M	R	S	V
قازانقایه ۶	100	T	A/C	A	G	G	G	T/A	M	R	S	E/V
ده سفید ۸	91.3	T	A	A	G	A/G	G	A	M	R	S	E
دالاهو	93.8	T	A	A	G	G	G	A	M	R	S	E
طبس	97.2	T	A	A	G	G	G	A	M	R	S	E
ملکشاهی-سپادرویش	94.6	T	A/C	A	G	G	G	T/A	M	R	S	E/V
چونان-۱چوار	96	T	A	A	G	A/G	G	A	M	R	S	E
دراک	96.3	T	A	A	G	A/G	G	T	M	R	S	V
T7	100	T	A	A/C	A/G	A/G	G	A	M	R	S	E
T8	97.5	T	A	A/C	A/G	A/G	G	A	M	R	S	E
یاقوت	93	T	A	A	G	A	G	A	M	R	S	E
خوشه	97.8	T	A	A	G	A	G	A	M	R	S	E
پارسه	91.6	T	A/C	A	A/G	G	G/T	T/A	M	R	x	E/V
T23	97.2	T	A	A	G	A	G	A	M	R	S	E

زایی بالا و پایین می‌تواند راهکار مناسبی جهت اطمینان از نقش اصلی این ژن در فرایند ریشه‌زایی محسوب گردد، هرچند تأثیر عوامل محیطی، تنش‌ها و سایر فاکتورهای فیزیکی قلمه را نیز در طی این فرایند همواره باید مدنظر قرارداد (او ۲).

#### سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های بین‌المللی وزارت عتف و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری انجام شده است. همچنین از حمایت مالی شرکت زیتون گلستان نمونه برای جمع‌آوری قلمه‌های زیتون و در اختیار گزاردن امکانات گلخانه میست سپاسگزاری می‌شود.

نظر به اینکه بررسی توالی پروتئین *OeAOX2* نیز نشان داد که تغییری در سطوح اسیدآمین‌هایی در ژنوتیپ‌های دالاهو و اوزینه نیز رخ نداده است، بنابراین استنتاج می‌گردد که ژن *OeAOX2* در سطح توالی ژنومی و پروتئینی بین ۲۳ ژنوتیپ زیتون ایران با ریشه‌زایی بالا و پایین تفاوت معنی‌داری ندارد و به احتمال قوی اثرات این ژن بر روی ریشه‌زایی در مرحله بیانی یا ترانسکریپتوم، تغییرات پس از رونویسی یا ترجمه می‌باشد. شایان ذکر است در مطالعات قبلی نیز تفاوت بیانی این ژن در مراحل مختلف ریشه‌زایی بین ارقام زیتون ایتالیایی با ریشه‌زایی بالا و پایین مشهود بوده است (۸). لذا برای اثبات این فرضیه، بررسی کمی سطوح بیان این ژن در ژنوتیپ‌های زیتون ایران با ریشه-

## منابع

- ۱- امینی، ز.، معلمی، ن.، و سعادت، س.، ۱۳۹۳. مقایسه اثر تنش کم‌آبی بر تغییرات میزان پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سه رقم زیتون (*Olea europaea* L.). مجله پژوهش‌های گیاهی، ۲۷(۲)، صفحات ۱۵۶-۱۶۷.
- ۲- درودی، ه.، اکبری نیا، م.، جلالی، غ.، و خسروجردی، ا.، ۱۳۸۷. تأثیر قطر قلمه و بستر کاشت بر ریشه دهی و زنده مانی قلمه سماق (*Rhus coriaria* L.). زیست‌شناسی ایران، ۲۱(۲)، صفحات ۲۷۰-۲۷۷.
- 3- Campos, M. D., Cardoso, H. G., Linke, B., Costa, J. H., Melo, D. F., and Justo, L., 2009. Differential expression and co-regulation of carrot AOX genes (*Daucus carota* L.). *Physiology Plant*, vol. 137, PP: 578–91.
- 4- Cavalcantia, J. H. F., Oliveiraa, G. M., Saraivaa, K. D., Torquatoa, J. P. P., Maiab, I. G., Melo, D. F., and Costaa, J. H., 2013. Identification of duplicated and stress-inducible Aox2b gene co-expressed with *Aox1* in species of the Medicago genus reveals a regulation linked to gene rearrangement in leguminous genomes, *Journal of Plant Physiology*, vol. 170, PP: 1609–1619.
- 5- Costa, J. H., Mota, E. F., Cambursano, M. V., Lauxmann, M. A., Oliveira, L. M. N., and Silva, M. G. L., 2010. Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (*VuAox1* and 2b) genes in *Vigna unguiculata*. *Journal of Plant Physiology*, vol. 167, PP: 561–70.
- 6- Djajanegara, I., Finnegan, P., Mathieu, C., McCabe, T., Whelan, J., and Day, D. A., 2002. Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean. *Plant Molecular Biology*, vol. 50, PP: 735–742.
- 7- Fu, A., Liu, H., Yu, F., Kambakam, S., Luan, S., and Rodermele, S., 2012. Alternative oxidases (AOX1a and AOX2) can functionally substitute for plastid terminal oxidase in Arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell*, vol. 24, no. 4, PP: 1579–1595.
- 8- Hedayati, V., Mousavi, A., Razavi, K. H., Cultrera, N., Alagna, F., Mariotti, R., Hosseini Mazinani, S. M., and Baldoni, L., 2015. Polymorphisms in *AOX2* gene are associated with rooting ability of olive cuttings. *Plant Cell Reports*, DOI 10.1007/s00299-015-1774-0.
- 9- Hedayati, V., Hosseini Mazinani, M., Pandolfi, S., Alagna, F., and Baldoni, L., 2012. Molecular and morphological analyses to explore the genetic bases of rooting ability olive (*Olea europaea* L.). Proceedings of the 56th Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Perugia, Italy, 17-20 September 2012, ISBN 978-88-904570-1-2
- 10- Li, C. R., Liang, D. D., Li, J., Duan, Y. B., Li, H., Yang, Y. C., and Qin, R. Y., 2013. Unravelling mitochondrial retrograde regulation in the abiotic stress induction of rice ALTERNATIVE OXIDASE 1 genes. *Plant Cell Environment*, vol. 36, PP: 775–788.
- 11- Maxwell, D. P., Wang, Y., and McIntosh, L., 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 96, PP: 8271–8276.
- 12- McIntosh, L., Eichler, T., Gray, G., Maxwell, D., Nickels, R., and Wang, Y., 1998. Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta: Bioenerg*, vol. 1365, PP: 278–284.
- 13- Mizuno, N., Sugie, A., Kobayashi, F., and Takumi, S., 2008. Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat. *Journal of Plant Physiology*, vol. 165, PP: 462–467.
- 14- Mousavi, S., Hosseini-Mazinani, M., Arzani, K., Yadollahi, A., Pandolfi, S., Baldoni, L., and Mariotti, R., 2014. Molecular and morphological characterization of Golestan (Iran) olive ecotypes provides evidence for the presence of promising genotypes. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61, PP: 775–785.
- 15- Mousavi, S., Mariotti, R., Bagnoli, F., Costantini, L., Cultrera, N. G., Arzani, K., Pandolfi, S., Vendramin, G. G., Torkzaban, B., Hosseini-Mazinani, M., and Baldoni, L., 2017. The eastern part of the Fertile Crescent concealed an unexpected route of olive (*Olea europaea* L.) differentiation. *Annals of Botany*, 119(8), PP: 1305–1318.
- 16- Nogales, A., Nobre, T., Cardoso, H. G., and Muñoz-Sanhueza, L., et al., 2015. Allelic variation on *DcAOX1* gene in carrot (*Daucus carota* L.): An interesting simple sequence repeat in a highly variable intron. *Plant gene*, vol. 5, PP: 49–55.
- 17- Ohtsu, K., Ito, Y., Saika, H., Nakazono, M., Tsutsumi, N., and Hirai, A., 2002. ABA independent expression of rice alternative



- oxidase genes under environmental stresses. *Plant Biotechnology Journal*, vol. 19, PP: 187–190.
- 18- Olga, V. K., Evgeny, V. K., Elthon, T. E., and Newton, K. J., 2002. Differential expression of alternative oxidase genes in maize mitochondrial mutants. *The Plant Cell*, Vol. 14, PP: 3271–3284.
- 19- Polidoros, A. N., Mylona, P. V., and Arnholdt-Schmitt, B., 2009. AOX gene structure, transcript variation and expression in plants. *Physiology Plant*, vol. 137, PP: 342–353.
- 20- Qi, X. H., Xu, X. W., Lin, X. J., Zhang, W. J., and Chen, X. H., 2012. Identification of differentially expressed genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) root under waterlogging stress by digital gene expression profile. *Genomics*, vol. 99, PP: 160–168.
- 21- Saika, H., Ohtsu, K., Hamanaka, S., and Nakazono, M., 2002. AOX1c, a novel rice gene for alternative oxidase, comparison with rice AOX1a and AOX1b. *Genes and Genetics Systems*, vol. 77, PP: 31–38.
- 22- Santos Macedo, E., Sircar, D., Cardoso, H. G., Peixe, A., Arnholdt-Schmitt, B., 2012. Involvement of alternative oxidase (AOX) in adventitious rooting of *Olea europaea* L. microshoots is linked to adaptive phenylpropanoid and lignin metabolism. *Plant Cell Report*, vol. 31, PP: 1581–1590.
- 23- Umbach, A. L., Fiorani, F., and Siedow, J. N., 2005. Characterization of transformed Arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiology*, vol. 139, PP: 1806–1820.
- 24- Zidenga, T., Leyva-Guerrero, E., Moon, H., Siritunga, D., and Sayre, R., 2012. Extending cassava root shelf life via reduction of reactive oxygen species production. *Plant Physiology*, vol. 159, PP: 1396–1407.

## Study on the structure of *OeAOX2* gene related to rooting among native olive genotypes (*Olea europaea* L.) of Iran

Hedayati V.,<sup>1</sup> Mousavi A.,<sup>1</sup> Mousavi S.,<sup>2</sup> Hashemabadi Z.<sup>1</sup> and HosseiniMazinani S.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup> CNR-Institute of Biosciences and Bioresources (IBBR), Perugia, Italy

### Abstract

Olive (*Olea europaea* L.) is one of the most important fruit crops throughout the Mediterranean Basin, mainly propagated by cuttings. One of the fundamental processes in woody plant propagation, especially olive is rooting ability of cuttings. Rooting ability in various plants and ecotypes is different significantly. Also, many genes are affecting rooting ability process in plants. One of these is *OeAOX2* gene which plays a central role in the balance of reactive oxygen species in plants. *OeAOX2* as a candidate gene has been introduced and it induces rooting in an Italian olive population (Cross progenies of Leccino and Dolce Agogia). In this project, rooting ability of 99 semi-hard cutting of Iranian olive genotypes was studied from different provinces of Iran, so genotypes with high- and low-rooting ability were determined. Then, the full length of *OeAOX2* gene was evaluated in two Iranian olive genotypes such as Dalahoo (high rooting) and Uzineh (low rooting) from Kermanshah and Golestan provinces, respectively. Also, the sequence of this gene was studied in 20 Iranian olive genotypes with high and low rooting in 5'UTR and exon 1 region. Bioinformatics studies of the *OeAOX2* gene indicated that there are many polymorphisms in the introns, but only one polymorphism was observed in the exon levels. On the other hand, polymorphism of the *OeAOX2* gene in 20 Iranian olive genotypes did not lead to protein alteration and probably it influenced rooting induction in transcript level.

**Key words:** Iranian olive genotypes, rooting ability, polymorphism, *OeAOX2* gene