علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۲، تابستان ۱۳۹۵ (ص ۳۱۵-۳۰۷) DOI: 10.22059/ijhs.2016.58530

بررسی الگوی بیانی ژن‌های ایمپورتین در قلمۀ ژنوتیپ‌های زیتون (*Olea europaea* L.) با توان ریشه‌زایی بالا و پایین

وحیده هدایتی[۱]، سید مهدی حسینی مزینانی[۲*]، روبرتو ماریوتی[۳]، خدیجه رضوی[۴]، لوسیانا بالدونی[۵] و امیر موسوی[۶*]

۱، ۲، ٤ و ٦. دانشجوی سابق دکتری، دانشیار، استادیار و دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (NIGEB)، تهران، ایران

۳ و ۵. پژوهشگران انستیتو علوم زیستی و منابع طبیعی (IBBR-CNR)، پروجا، ایتالیا

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۲/٦)

چکیده

ریشه‌زایی قلمه‌ها یکی از فرآیندهای اساسی و کاربردی در افزایش گیاهان چوبی به‌ویژه زیتون است. این امر انتخاب درختان برتر با ساختار ژنتیکی مطلوب را امکان‌پذیر می‌کند. تشکیل ریشه‌های نابجا مرحلۀ کلیدی در ریشه‌زایی به شمار می‌آید. لذا، شناسایی ژن‌های درگیر در این فرآیند ضروری است. در این تحقیق، برای نخستین بار ژن‌های *importin* بر پایۀ تطابق داده‌های ناقص نخستین نقشۀ ژنتیکی زیتون و صفات دخیل در ریشه‌زایی شناسایی شدند. به‌طور عموم ژن‌های این خانواده به ورود و خروج ماکرومولکول‌ها از راه منافذ هسته کمک می‌کنند. الگوی بیان ژن‌های *importin* با روش qRT-PCR در نتاج ناشی از تلاقی دو ژنوتیپ با ریشه‌زایی متوسط در دوره‌های مختلف زمانی پس از قلمه‌گیری نشان داد که بیان این ژن‌ها در نتاج با ریشه‌دهی پایین نسبت به نتاج با ریشه‌دهی بالا افزایش می‌یابد، که این تفاوت بیانی در ژن *importin2* ملموس‌تر است. دراین‌ارتباط، پیشنهاد می‌شود که ایمپورتین‌ها به‌احتمال پروتئین‌های بازدارندۀ ریشه‌زایی را وارد یاخته می‌کنند و بنابراین به‌منظور استفادۀ کاربردی از این ژن‌ها برای انتخاب قلمه‌های زیتون با ریشه‌زایی بالا و پایین در مراحل اولیۀ رشد، نیاز به آزمایش‌های تکمیلی ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: ریشه‌زایی، زیتون، ژن‌های *importin*، qRT-PCR.

مقدمه

زیتون (*Olea europaea* L.) درختی همیشه‌سبز از تیرۀ Oleaceae و از کهن‌ترین گیاهان منطقۀ مدیترانه و به‌ویژه خاورمیانه است. این گیاه دولاد یا دوگان (دیپلوئید 2n=46)، ناخالص (هتروزیگوت) و تک‌پایه است (Johnson *et al*., 1957) که ۲۰ تا ۳۰ جنس و ۲۲۰ گونه دارد. افزایش این گیاه به‌صورت جنسی و غیرجنسی صورت می‌گیرد. افزایش جنسی از راه بذر است ولی چون تفرق صفات ایجاد می‌شود چندان استفاده نمی‌شود. بیشترین افزایش زیتون از راه روش غیرجنسی است که در روش سنتی آن از پاجوش‌ها با دورۀ نونهالی طولانی، ولی در روش رایج، از قلمه‌های نیمه خشبی استفاده می‌شود. در این روش، به دلیل استفاده از اندام‌های غیرجنسی گیاه برای افزایش، اغلب تغییرات ژنتیکی در گیاهان به‌دست‌آمده ایجاد نخواهد شد و همچنین امکان افزایش گیاهانی با

* تلفن: ۰۹۱۲۲۰۸۶۳۶۰، ۰۹۱۲۲۱۷۷۵۱۸
E-mail: hosseini@nigeb.ac.ir; m-amir@nigeb.ac.ir

ترکیب ژنومی خاص و تولید گیاهانی که از لحاظ ژنتیکی همگن (هموژن) و به‌صورت یکنواخت هستند را فراهم می‌کند. در سال‌های اخیر افزایش زیتون به روش غیرجنسی و تهیهٔ قلمه بسیار موردتوجه واقع شده است زیرا بسیار ارزان‌تر و سریع‌تر از روش‌های دیگر است و بنابراین می‌توان پایه‌های مطلوب و قوی‌تر از نظر صفات اقتصادی را در مدت زمان کوتاهی افزایش کرد. افزون بر این، بسیاری از رقم (کولتیوار)های ارزشمند ریشه‌دهی کمتر از ۲۰ درصد دارند (Santos Machedo *et al*., 2012)، بنابراین شناسایی عامل‌های کنترل‌کنندهٔ تولید ریشه اعم از عامل‌های فیزیولوژیکی، ریخت‌شناسی (مورفولوژیکی) و مولکولی امری ضروری است.

تشکیل ریشه‌های نابجا گامی کلیدی در افزایش رویشی به منظور افزایش رقم‌های تجاری است. ریشه‌های نابجا به‌طور طبیعی، در پاسخ به تنش‌های محیطی یا به‌وسیلهٔ آسیب‌های مکانیکی از بافت‌های مختلف گیاه اعم از ساقه و برگ‌ها ایجاد می‌شوند. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهند که ایجاد ریشه فرآیند پیچیده‌ای است که تحت تأثیر عامل‌های محیطی و داخلی زیادی قرار دارد. به‌رغم اهمیت ریشه‌زایی، اطلاعات بسیار کمی در مورد بیان ژن(های) مرتبط با ریشه‌زایی در درختان به‌ویژه زیتون وجود دارد. تحقیقات زیادی درزمینهٔ تأثیر موادی مانند تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در القای ریشه‌زایی قلمه‌های زیتون انجام شده است (Sebastiani & Tognetti, 2004; Santos Macedo *et al*., 2009) ولی در زمینه‌های مولکولی، بررسی‌های محدودی صورت گرفته است. Santos Macedo *et al*. (2009, 2012) گزارش کردند که ژن *AOX2* به عنوان ژن نامزد (کاندید) و دخیل در ریشه‌زایی زیتون بوده و تأثیر بازدارنده‌ها و محرک‌های این ژن را روی رقم‌های زیتون سهل ریشه‌زا بررسی کردند. همچنین *et al.* Hedayati برای نخستین بار طول کامل ژن *AOX2* را در دو ژنوتیپ زیتون به دست آورند و بیان آن را از راه روش Real-Time qPCR در جمعیت ناشی از تفرق در صفت ریشه‌زایی، بررسی کردند.

*importin*ها اعضایی از خانوادهٔ انتقال‌دهنده‌ها (کاریوفرین‌ها) هستند که انتقال نوکلئوسیتوپلاسمی محموله‌های پروتئینی و RNA را بر عهده دارند. Importin-11 عضوی از خانوادهٔ کاریوفرین انسانی است که ورود آنزیم متصل‌شونده به یوبی‌کویتین (UbcM2) را به هسته تعدیل می‌کند و تاکنون در گیاهان گزارش نشده است (Plafker & Macara 2000). این ژن با RanGAPها میانکنش دارد و بارها بین سیتوپلاسم و هسته منتقل می‌شود و مشخص شده که RanGAPها در ارتباط با کنترل رشد گیاهان هستند به‌طوری‌که نقص آن در ریشه‌های علف تال (آرابیدوپسیس) منجر به مختل شدن سازمان‌یابی یاخته می‌شود (Xu *et al*., 2007, Zhao *et al*., 2008). بررسی‌ها روی ژن‌های دیگر این خانواده از جمله *Importin α* و *Importin β* نشان داده است که این ژن‌ها در وارد و صادر کردن ماکرومولکول‌ها از راه منافذ هسته‌ای نقش دارند که یکی از این ماکرومولکول‌ها، Ran است که در فرآیند میتوز از جمله تشکیل دوک، اتصال کینه‌توکور (Kinetochore)، کنترل محل بازرسی دوک، تشکیل پوشش غشا هسته پس از میتوز و تجمع کمپلکس‌های پروتئینی در هسته نقش ایفا می‌کند (Clarke & Zhang, 2008; Joseph 2006). در سال‌های اخیر Meier & Brkljacic (2009)، بیان کردند که ترکیبات در حال عبور و مرور از بعضی منافذ هسته‌ای برای رشد و نمو و مسیرهای پیام‌رسانی ضروری هستند. بررسی‌ها روی جهش‌یافته‌ها نشان داده است که به‌احتمال پیام‌رسانی اکسین به نفوذپذیری نوکلئوسیتوپلاسم ارتباط دارد (Meier & Brkljacic 2009). همچنین آنان اظهار کردند که *Importin α* و *Importin β* به محموله‌های پروتئینی متصل شده و آنها را از سیتوپلاسم وارد هسته می‌کنند یکی از این پروتئین‌ها می‌تواند مهارکنندهٔ AUX/IAA باشد. ازآنجایی‌که پاسخ به اکسین‌ها توسط کمپلکس AUX/IAA تنظیم می‌شود، ورود مهارکنندهٔ آنها به هسته منجر به سرکوب آنها می‌شود ولی سازوکار عمل به‌طور دقیق روشن نشده است. از سوی دیگر، Zazimalova & Napier (2003) گزارش کردند که در غلظت پایین اکسین، عامل‌های رونویسی ARF به

مهارکنندهٔ AUX/IAA متصل شده و منجر به سرکوب آن می‌شود و در غلظت‌های بالای اکسین از آنها جدا شده تا یوبی‌کویتینه و سپس پروتئولیز شوند. به‌هرحال، اکسین نقش ضروری را در گیاهان به‌ویژه در ریشه‌زایی ایفا می‌کند و ورود و خروج ترکیبات مرتبط با آن می‌تواند روی عملکرد اکسین تأثیر بگذارد.

هدف از این تحقیق، شناسایی ژن(های) مؤثر در ریشه‌زایی قلمه‌های زیتون به منظور یافتن ارتباط بین بیان آنها و توان ریشه‌زایی رقم‌های زیتون در زمان‌های مختلف پس از قلمه‌گیری است، در صورت امکان می‌توان از نتایج این تحقیق برای انتخاب ژنوتیپ‌های زیتون با ریشه‌زایی بالا یا پایین در مراحل اولیهٔ رشد استفاده کرد. در این بررسی، با استفاده از تنها نقشهٔ ژنتیکی ولی ناقص گزارش‌شده در زیتون (La Rosa *et al., 2003*) و صفات ریشه‌زایی نتاج ناشی از تلاقی و دارای تفرق در صفت موردنظر، ژن‌های نامزدشده شناسایی شدند. همچنین برای یافتن ارتباط این ژن‌ها با توان ریشه‌زایی در قلمه‌های زیتون، بررسی الگوی بیانی در نتاج با ریشه‌دهی بالا (HR) و ریشه‌دهی پایین (LR) با روش qRT-PCR انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از جمعیت ژنتیکی ناشی از تلاقی دو رقم زیتون ایتالیایی، Leccino به عنوان پایهٔ مادری و Dolce Agogia به عنوان پایهٔ پدری و ۱۰۴ فرد ناشی از تلاقی این دو والد که برای صفت ریشه‌زایی تفرق برتر از والدین نشان داده‌اند، استفاده شد. از هرکدام از افراد ناشی از تلاقی، شش قلمه با دو تکرار تهیه شد. از IBA با غلظت ۲۰۰۰ppm به منظور ریشه‌دار شدن استفاده شد. قلمه‌ها در اتاقک رشد با رطوبت ۱۰۰درصد و دمای ۲۳ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. پس از دو ماه، صفات ریشه‌زایی از جمله شمار قلمه‌های ریشه‌دار شده، درصد ریشه‌زایی، طول و شمار ریشه‌ها اندازه‌گیری شدند (Bassil *et al.*, 1991; Al Salem & Nabila, 2001; Henrique *et al.*, 2006). بر پایهٔ صفات بیان‌شده، گیاهان با قابلیت ریشه‌دهی بالا و پایین انتخاب شدند. از این گیاهان قلمه تهیه شد و در زمان‌های ۰، ۱، ۶، ۲۴ ساعت و ۱۵ روز پس از قلمه‌گیری، ناحیهٔ پایین قلمهٔ هر گیاه جداسازی و در نیتروژن مایع فریز شد.

انتخاب ژن نامزد و بررسی‌های بیوانفورماتیکی

برای یافتن مکان ژنی مرتبط با ریشه‌زایی از نرم‌افزار MapQTL و داده‌های مربوط به نخستین نقشهٔ ژنتیکی و ناقص زیتون و صفات ریشه‌زایی ثبت‌شده در طی دو سال استفاده شد. سپس نشانگر SSR یافت‌شده در ناحیهٔ QTL در پایگاه اطلاعاتی داده‌های توالی‌یابی ژنگان والد مادری جستجوی BLAST شد. با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Softberry، mRNAهای توالی‌های با همسانی بیشتر از ۹۰درصد با توالی نشانگر به دست آمد. سپس mRNAهای پیشگویی‌شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI جستجوی BLAST و ژن‌های *importin* شناسایی شدند. به منظور بررسی بیان این ژن‌ها، از نرم‌افزار آغازگر (پرایمر)۳ (http://primer3.sourceforge.net/) برای طراحی آغازگرهای اختصاصی، از مناطق 3'-UTR و آخرین اگزون استفاده شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA

انتهای قلمه‌های جداسازی‌شده از نتاج با ریشه‌دهی بالا و پایین با هاون و با نیتروژن مایع به‌طور کامل پودر شد و RNA با استفاده از کیت کیاژن (QIAGEN) استخراج شد. به منظور رفع آلودگی DNA، RNAها با آنزیم *DNase* I (Ambion) تیمار شدند. سپس ۵۰۰ نانوگرم از RNAهای تیمارشده برای ساخت cDNA (Invitrogen) استفاده شد و واکنش PCR به منظور کنترل کیفیت cDNAها توسط آغازگرهای ژن *EF 1α* بر طبق شرایط دمایی ۹۵ ^{o}C پنج دقیقه، ۳۵ چرخه با ۹۵^{o}C سی ثانیه، ۶۰^{o}C سی ثانیه، ۷۲^{o}C سی ثانیه و در نهایت ۷۲^{o}C به مدت پنج دقیقه انجام شد.

بررسی‌های کمی بیان ژن

qPCR Real-Time با کمک سایبرگرین (Power SYBR® Green, Applied Biosystem) و در حجم

نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۵ میکرولیتر از سایبرگرین و ۰/۳ میکرومولار از آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده از توالی ژن‌های *Importin1* و *Importin2* بود. واکنش در دستگاه ABI 7300 برابر شرایط زیر انجام شد: $95^{o}C$ برای ده دقیقه و چهل چرخه با دمای $95^{o}C$، ده ثانیه و $60^{o}C$، یک دقیقه. منحنی ذوب در دمای $95^{o}C$، پانزده ثانیه؛ $60^{o}C$، یک دقیقه و $95^{o}C$، پانزده ثانیه رسم شد. همهٔ داده‌ها در این بررسی بر پایهٔ سه تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی بودند.

بررسی‌های آماری

تجزیه‌وتحلیل نتایج qPCR Real-Time با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام شد (Livak and Schmittgen 2001) و تفاوت بین تیمارها و مقایسهٔ میانگین بیان ژن‌ها در نتاج و زمان‌های مختلف برای نتایج به‌دست‌آمده با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۰/۰۱ با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1.3 و MSTATC انجام شد.

نتایج و بحث

از بین ۱۰۴ گیاه به‌دست‌آمده از تلاقی، چهار نتاج با ریشه‌دهی بالا (HR; 206, 228) و ریشه‌دهی پایین (LR; 304, 315) بر مبنای صفات ریشه‌زایی از جمله شمار قلمه‌های ریشه‌دار ده، درصد ریشه‌زایی، طول و شمار ریشه‌ها شناسایی شدند. نتایج MapQTL روی نقشهٔ اولیه و ناقص ژنتیکی زیتون و صفات ریشه‌زایی، قله‌ای را مشخص کرد که در آن ناحیهٔ یک SSR نشانگری به نام DCA10 قرار داشت. BLAST توالی سیصد جفت‌بازی DCA10 با داده‌های ناشی از توالی‌یابی ژنگان مادری، منجر به شناسایی شماری توالی با همسانی بالا با این نشانگر شد.

نتایج BLAST این توالی‌ها در پایگاه اطلاعاتی NCBI مشخص کرد که یکی از توالی‌ها با ژن *importin-11-Like* در گیاه انگور (XP_002262626.2) همسان است. این بررسی‌ها بیوانفورماتیکی نشان داد که زیتون دو ژن *importin* دارد که *importin1* و *importin2* نامیده شدند.

به منظور روشن شدن ارتباط بین بیان ژن‌های *importin1* و *importin2* با توان ریشه‌زایی در زیتون، آزمون Real-Time qPCR انجام شد و نتایج نشان داد که الگوی بیان ژن *importin1* در دو نتاج LR نزدیک به همسان است و بیان در زمان پانزده روز پس از قلمه‌گیری نسبت به HR (228) افزایش معنی‌داری داشت درصورتی‌که نسبت به HR (206) تفاوت معنی‌داری نداشت. این در حالی است که اگر تنها LR (315) را با HR (228) مقایسه کنیم مشاهده می‌شود که یک ساعت پس از قلمه‌گیری، بیان ژن به‌طور مشهودی در LR (315) بالاتر است (شکل ۱). بااین‌وجود تجزیه‌وتحلیل آماری نشان داد که بیان ژن *importin1* در LR (315) طی زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت پس از قلمه‌گیری به‌طور معنی‌داری از دیگر نتاج بالاتر است (جدول‌های ۱ و ۲).

از سوی دیگر، ژن *importin2* به‌طور دقیق یک ساعت پس از قلمه‌گیری در همهٔ نتاج افزایش بیان داشت ولی این افزایش در LRها به‌طور معنی‌داری (حدود ۱۲-۸ برابر) به‌ویژه در ۳۱۵ بیشتر از HRها بود و در طی پنج ساعت بعدی کاهش بیان در همهٔ نتاج دیده شد. به‌تقریب از زمان شش ساعت به بعد، بیان *importin2* در همهٔ نتاج تا اندازه‌ای افزایش یافت ولی تنها میزان بیان در HR (228) در زمان ۲۴ ساعت پس از قلمه‌گیری حدود ده برابر بیشتر از دیگر نتاج شد و در طی پانزده روز پس از قلمه‌گیری هم کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲، جدول ۲).

جدول ۱. تجزیهٔ واریانس تأثیر زمان‌های مختلف و نتاج با ریشه‌زایی متفاوت بر بیان ژن‌های *importin 1* و *importin 2*

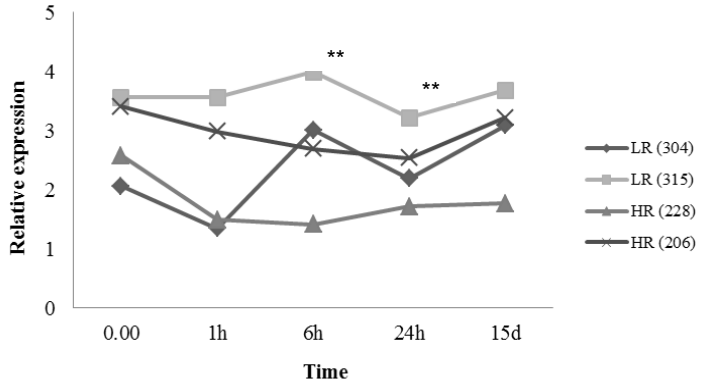
Table 1. Analysis of different time effects and different rooting ability of olive progeny on *importin1* and *importin2* genes expression

Sources of changes	Degrees of freedom	Mean Sauer	
		Importin 1 gene	*Importin 2* gene
Genotype	4	68.9 **	74.46 **
Time	3	28.24 **	1396.73 **
Genotype × Time	12	70.59 **	563.3 **
Error	40	38.6	213.94
Coefficient of variation	-	32.76	31.58

جدول ۲. مقایسهٔ میانگین تأثیر زمان‌های مختلف و نتاج با ریشه‌زایی متفاوت بر بیان ژن‌های *importin 1* و *importin 2*

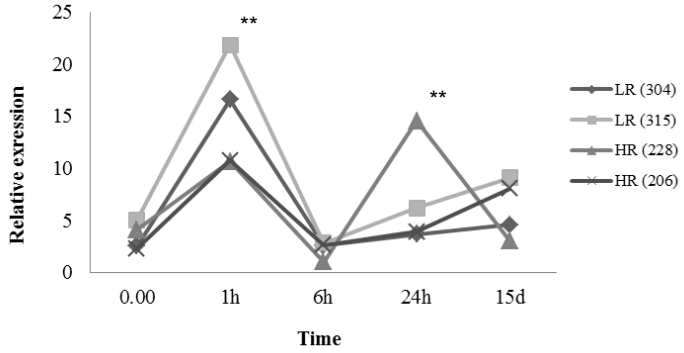
Table 2. Comparisons of different time effects and different rooting ability of olive progeny on *importin1* and *importin2* genes expression

Genotype	Time	Mean squer	
		Importin 1	Importin 2
Plant 206	0	1.96 def	2.37 gh
	1 hour	2.98 defc	14.81 bc
	6 hour	2.68 def	3.05 gh
	24 hour	2.53 def	3.97 fgh
	15 day	3.22 efc	8.13 def
Plant 228	0	2.89 defc	4.13 fgh
	1 hour	1.49 ef	11.25 dc
	6 hour	1.41 ef	1.01 h
	24 hour	1.71 ef	17.09 b
	15 day	1.96 def	3.14 gh
Plant 304	0	2.06 def	2.7 gh
	1 hour	1.34 f	17.04
	6 hour	4.51 c	3.43 gh
	24 hour	2.19 def	3.68 fgh
	15 day	3.09 def	4.91 fgh
Plant 315	0	3.62 dc	5.20 efgh
	1 hour	6.52 d	21.91 a
	6 hour	8.10 a	3.19 gh
	24 hour	1.93 def	6.21 fge
	15 day	3.69 dc	9.13 de



شکل۱. الگوی بیان نسبی ژن *importin1* . چگونگی بیان ژن در زمان‌های ۰، ۱، ۶، ۲۴ ساعت و پانزده روز پس از قلمه‌گیری در دو نتاج ۲۰۶ و ۲۲۸ با ریشه‌دهی بالا (HR) و دو نتاج ۳۰۴ و ۳۱۵ با ریشه‌دهی پایین (LR) نمایش داده شده است.
** معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ با آزمون دانکن را نشان می‌دهد.

Figure 1. Relative gene expression pattern of *importin1*. Gene expression at 0, 1, 6, 24 hours and 15 days after preparation of cuttings of progenies 206 and 228 with high rooting ability (HR) and progenies 304 and 315 with low rooting ability (LR). (** Signification in 0.01 level by dancan test.)



شکل ۲. الگوی بیان نسبی ژن *importin2*. چگونگی بیان ژن در زمان‌های ۰، ۱، ۶، ۲۴ ساعت و پانزده روز پس از قلمه‌گیری در دو نتاج ۲۰۶ و ۲۲۸ با ریشه‌دهی بالا (HR) و دو نتاج ۳۰۴ و ۳۱۵ با ریشه‌دهی پایین (LR) نمایش داده شده است.
** معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ با آزمون دانکن را نشان می‌دهد.

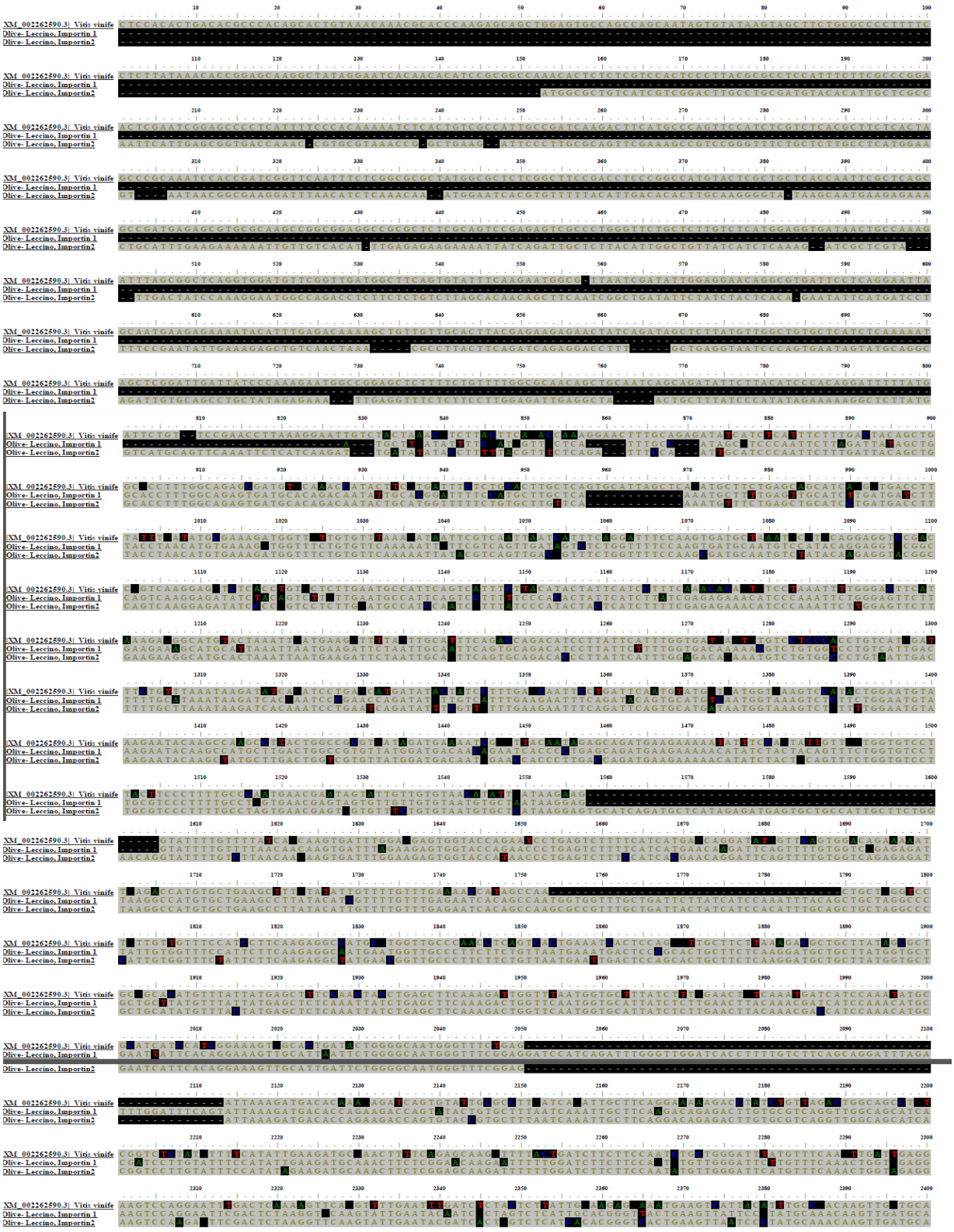
Figure 1. Relative gene expression pattern of *importin2*. Gene expression at 0, 1, 6, 24 hours and 15 days after preparation of cuttings from progenies 206 and 228 with high rooting ability (HR) and from progenies 304 and 315 with low rooting ability (LR). (** Signification in 0.01 level by dancan test.)

با توجه به اینکه فرآیند ریشه‌زایی توسط شمار زیادی ژن کنترل می‌شود که بیان آنها به شدت تحت تأثیر محیط است، لذا یافته‌های ما نشان داد که بیان ژن‌های *importin* در دو نتاج با ریشه‌دهی بالا و می‌تواند متفاوت باشد و در مقابل، این تفاوت بین نتاج با ریشه‌دهی پایین هم مشهود است. البته بخشی از این تفاوت به دلیل ویژگی ژنتیکی به ارث رسیده در این نتاج است و بخشی از آن هم به شرایط محیطی وابسته است. بنابراین کشف ارتباط بین توان ریشه‌زایی قلمه و نحوهٔ بیان ژن‌های *importin* بر پایهٔ بررسی رونوشت‌ها لازم است ولی کافی نیست. همچنین، سازوکارهای مولکولی و فیزیولوژیکی ژن‌های خانوادهٔ *Importin* در گیاهان تاکنون به‌طور جزئی بررسی شده است (Joseph, 2006; Clarke & Zhang, 2008; Meier & Brkljacic, 2009).

نتایج هم‌ردیفی ژن‌های *importin1* و *importin2* با ژن *Importin-11-like* در شکل ۳ آمده است. همچنین توالی mRNAی ژن Importin-11 در گیاه کنجد (XM_011096737.1 که در سال‌های اخیر گزارش شده است با توالی mRNAی ژن‌های *importin1* و *importin2* به ترتیب ۸۴درصد و ۷۹درصد هماهنگی نشان داد. از سویی این توالی‌ها در درختانی مانند صنوبر، کاج، کاکائو و مرکبات نیز گزارش شده است و حدود ۷۵-۷۰درصد با *importin*های زیتون شباهت داشتند. باوجوداین، سازوکار عمل این ژن‌ها در درختان نامبرده مشخص نشده است و گزارش‌ها هم بر مبنای روش‌هایی مانند RNA Seq یا توالی‌یابی ژنگان‌ها بوده است. نظر به اینکه بررسی بیان این ژن‌ها در زیتون برای یافتن ارتباط با توان ریشه‌زایی قلمه‌ها برای نخستین بار گزارش شده است، این بررسی نشان داد که ژن‌های *importin1* و *importin2* به‌احتمال می‌توانند تأثیر منفی روی القای ریشه‌زایی اعمال کند و ممکن است ژن‌های تأثیرگذار در فرآیند ریشه‌زایی قلمه‌های زیتون باشد ولی با توجه به الگوی بیانی پیچیدهٔ ژن‌های *importin* در نتاج با ریشه-دهی بالا و پایین در جمعیت موردبررسی ما، تأیید نتایج، به آزمون‌های تکمیلی مانند خاموش یا بیش بیان کردن ژن‌ها و یا بررسی‌های ژنومیکس و پروتئومیکس نیاز دارد. از سوی دیگر، با توجه به اینکه این ژن‌ها برای نخستین بار از زیتون جداسازی و گزارش شده‌اند، می‌توان برای روشن شدن ارتباط آنها با ریشه‌زایی، از ژنوتیپ‌های ارزشمند ایرانی با ریشه‌دهی بالا و پایین که اخیراً توسط گروه تحقیقاتی ما گزارش شده است، استفاده کرد (Mousavi *et al.*, 2014; Hosseini-Mazinani *et al.*, 2014).

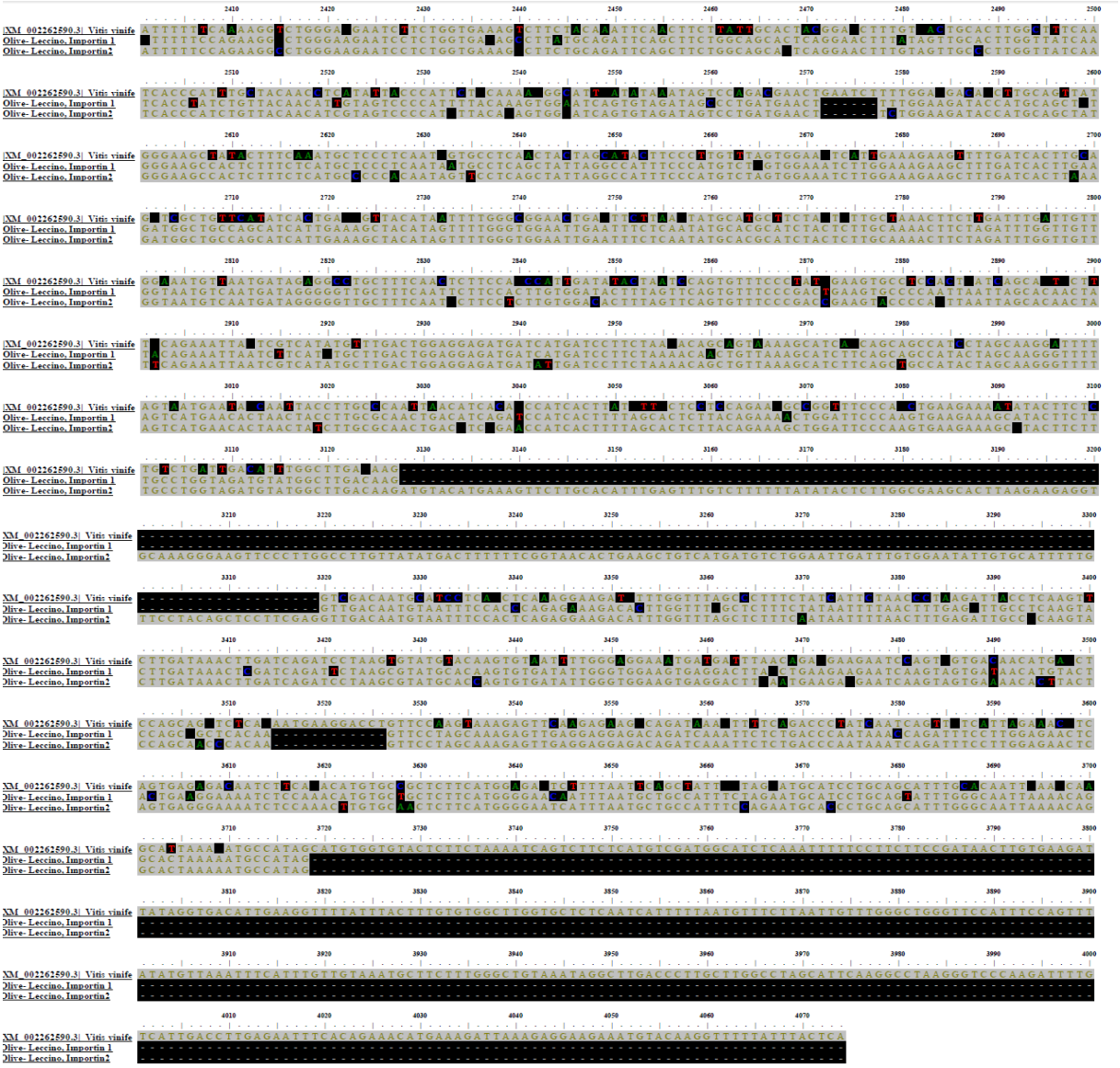
نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اینکه ریشه‌دار کردن قلمه‌های گیاهان چوبی با صفات اقتصادی مطلوب به‌ویژه زیتون از جمله مشکلات اساسی درزمینهٔ افزایش آنها است، لذا شناسایی ژن(های) دخیل در این فرآیند ضروری به نظر می‌رسد. از سوی دیگر، ریشه‌زایی صفت کمی است که توسط شمار زیادی ژن کنترل می‌شود و تحت تأثیر محیط هم است. در این بررسی، برای نخستین بار با استفاده از نقشهٔ ژنتیکی ناقص زیتون و صفات ریشه‌زایی نتاج ناشی از تلاقی دو ژنوتیپ ایتالیایی، ژن *importin* شناسایی شد. بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که ژن *importin* در زیتون، دو توالی متفاوت دارد که *importin1* و *importin2* نامیده شدند و با ژن *importin-11* در گیاه کنجد همسانی بالایی داشتند. سازوکار عمل این ژن‌ها تاکنون در گیاهان شناسایی نشده است ولی مشخص شده که *importin*های α و β در گیاهان در ورود و خروج ماکرومولکول‌ها از منافذ هسته دخالت دارند که از جمله منجر به ورود مهارکنندهٔ AUX/IAA به درون هسته می‌شوند. بررسی الگوی بیان ژن‌های *importin* شناسایی‌شده در نتاج با ریشه‌دهی بالا و پایین در زمان‌های متفاوت پس از قلمه‌گیری با استفاده از روش Real-Time qPCR نشان داد که احتمال دارد ژن *importin* در نتاج با ریشه‌دهی پایین، بیان بالاتری نسبت به نتاج با ریشه‌دهی بالا داشته ولی تفاوت‌های بیانی در درون دو نتاج با ریشه‌دهی بالا و یا پایین هم وجود داشت که می‌تواند متأثر از عامل‌های محیطی یا تغییرات ژنتیکی باشد. لذا، تأیید نهایی نقش ژن‌های *importin* و معرفی آنها به عنوان ژن‌های کاندید و مؤثر در ریشه‌زایی، مستلزم بررسی‌های گسترده و تکمیلی روی آنها به‌ویژه با استفاده از رقم‌های با ارزش زیتون‌های ایرانی و دیگر روش‌های بررسی‌های مولکولی است.



شکل ۳. هم‌ردیفی ClustalW بین ژن‌های *importin 1* و *importin 2* در Leccino با *importin-like-11* در انگور (XP_002262626.2).

Figure 3. ClustalW alignment between *importin 1* and *importin 2* genes in Leccino with *importin-like-11* gene in grape (XP_002262626.2).



ادامه شکل ۳. هم‌ردیفی ClustalW بین ژن‌های *importin 1* و *importin 2* در Leccino با *importin-like-11* در انگور (XP_002262626.2).

Figure 3. ClustalW alignment between *importin 1* and *importin 2* genes in Leccino with *importin-like-11* gene in grape (XP_002262626.2).

سپاسگزاری

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری بابت تأمین هزینه‌های این تحقیق در قالب طرح پژوهشی شمارهٔ ۴۳۷ و انستیتو علوم زیستی و منابع طبیعی پروجا در ایتالیا، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Al-Salem, M.M. & Nabila, S.K. (2001). Auxin, wounding and propagation medium affect rooting response of stem cuttings of *Arbutus andrachne*. *HortScience*, 36 (5), 976-978.
2. Bassil, N.V., Proebsting, W.M., Moore, M.W. & Lightfoot, D.A. (1991). Propagation of Hazelnut stem cuttings using *Agrobacterium rhizogenes*. *HortScience*, 26 (8), 1058-1060.
3. Clarke, P.R. & Zhang, C. (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 464-477.

4. Hedayati, V., Mousavi, A., Razavi, K., Cultrera, N., Alagna, F., Mariotti, R., Hosseini Mazinani, M. & Baldoni, L. (2015). Polymorphisms in *AOX2* gene are associated with rooting ability of olive cuttings. *Plant Cell Report*, 34(7), 1151-64.
5. Henrique, A., Campinhos, E.N., Ono, E.O. & Pinho, S.Z.D. (2006). Effect of plant growth regulators in the rooting of Pinus cuttings. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(2), 189-196.
6. Hosseini-Mazinani, M. Mariotti, R. Torkzaban, B. Sheikh-Hassani, M. Ataei, S. Cultrera, N. Pandolfi, S. & Baldoni, L. (2014). High genetic diversity detected in olives beyond the boundaries of the Mediterranean sea. *PLOS ONE,* 9(4), 1-16.
7. Johnson, L. (1957). A review of the family Oleaceae. Contributions *from the New South Wales national herbarium*, 2, 397-418.
8. Joseph, J. (2006). Ran at a glance. *Journal of the Cell Science*, 119, 3481-3484.
9. La Rosa, R., Angiolillo, A., Guerrero, C., Pellegrini, M., Rallo, L., Besnard, G., Bervill, A., Martin, A. & Baldoni, L. (2003) A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theatrical and Applied Genetics*, 106, 1273-1282.
10. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-DDCT} method. *Methods*, 25, 402-408.
11. Meier, I. & Brkljacic, J. (2009). Adding pieces to the puzzling plant nuclear envelope. *Current Opinion Plant Biology*, 12, 752-759.
12. Meier, I. & Brkljacic, J. (2009). The nuclear pore and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 87-95.
13. Mousavi, S., Hosseini-Mazinani, M., Arzani, K., Yadollahi, A., Pandolfi, S., Baldoni, L. & 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, 775-785.
14. Plafker, S. & Macara, I. (2000). Importin-11, a nuclear import receptor for the ubiquitin-conjugating enzyme, UbcM2. *The EMBO Journal*, 20, 5502-5513.
15. Santos Macedo, E., Cardoso, H.G. & Hernandez, A. (2009). Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction. *Plant Physiology*, 137, 532-552.
16. 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 Reoport*, 31, 1581-1590.
17. Sebastiani, L. & Tognetti, R. (2004). Growing season and hydrogen peroxide effects on root induction and development in *Olea europaea* L. (cvs 'Frantoio' and 'Gentile di Larino') cuttings. *Scientia Horticulturae*, 100, 75-82.
18. Xu, X.M., Meulia, T. & Meier, I. (2007). Anchorage of plant RanGAP to the nuclear envelope involves novel nuclear-pore associated proteins. *Current Biology*, 17, 1157-1163.
19. Zazimalova, E. & Napier, R. M. (2003). Points of regulation for auxin action. *Plant Cell Report*, 21, 625-634.
20. Zhao, Q., Brkljacic, J. & Meier, I. (2008). Two distinct, interacting classes of nuclear envelope-associated coiled-coil proteins are required for the tissue-specific nuclear envelope targeting of Arabidopsis RanGAP. *Plant Cell*, 20, 1639-1651.

Iranian Journal of Horticultural Science, Vol. 47, No. 2, Summer 2016

Importin genes expression in high and low rooting olive genotypes (*Olea europaea* L.)

Vahideh Hedayati[1], Mehdi Hosseini-Mazinani[2*], Roberto Mariotti[3], Khadijeh Razavi[4], Luciana Baldoni[5] and Amir Mousavi[6*]

1, 2, 4, 6. Former PhD. Student, Associate Professor, Assistant Professor and Associate Professor of National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

3, 5. Research Assistant and Senior Researcher of Institute of Biosciences and Bioresources (IBBR-CNR), Perugia, Italy

(Received: Dec. 10, 2014 - Accepted: Feb. 25, 2015)

ABSTRACT

One of the fundamental processes in woody plant propagation especially olive is rooting ability of cuttings. Thus the selection of superior trees with desirable genetic structure is essential. Adventitious root formation is a key step in rooting ability. Therefore, identification of inducible genes in these processes is necessary. In this study, for the first time importin genes were identified based on incomplete data of the first linkage map of olive and rooting traits. Generally, *importin* gene family are contributed to export and import of macromolecules through nuclear pores. Results of qRT-PCR in cross progenies during different time courses showed that *importin*s expression were increased in low rooting than the high rooting progenies, which *importin2* gene expression was more tangible. It is suggested that *importin* genes probably import the rooting inhibitor protein into the cell. Therefore, to select high- and low-rooting olive genotypes in the early stages of development, requires further complementary experiments.

Keywords: Rooting ability, *importin* genes, olive, qRT-PCR.

* Corresponding author E-mail: hosseini@nigeb.ac.ir; m-amir@nigeb.ac.ir Tel: +98 912 2086360; +98 912 2177518