زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال ششم، شماره بیست و دوم، زمستان ۱۳۹۳، صفحه ۱۲۷-۱۳۳
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۱/۲۶
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۳/۰۴/۰۹
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۵/۰۵

مطالعه و بررسی الگوی بیان ژن *AUX1* و تأثیر آن در ایجاد ریشه‌های نابجا در قلمه‌های زیتون (*Olea europaea* L.)

وحیده هدایتی [۱]، امیر موسوی [۱]*، فیامتا آلاگنا [۲]، ساوریو پاندولفی [۲]، خدیجه رضوی [۱]، لوسیانا بالدونی [۲] و سید مهدی حسینی مزینانی [۱]*
[۱] گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
[۲] مؤسسه تحقیقات علوم زیستی و منابع زیستی (CNR-IBBR)، پروجا، ایتالیا

چکیده

زیتون (*Olea europaea* L.) از مهم‌ترین محصولات حوزه مدیترانه است که صرفا با قلمه تکثیر می‌شود. اگرچه ظرفیت ریشه دهی پایین در برخی از ارقام کارآیی تکثیر غیرجنسی زیتون را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد اما رشد ریشه های نابجا مرحله کلیدی در تکثیر رویشی این گیاه است. ژن ناقل برون شارش اکسین ۱ (*AUX1*) نقش کلیدی را در تشکیل ریشه جانبی در بسیاری از گونه‌های گیاه ایفا می‌کند. این ژن صدور IAA از برگ‌های تازه نمویافته به پریموردیای ریشه جانبی را تحریک می‌کند. همولوگ پیش فرض این ژن در زیتون با روش طراحی آغازگر چندحالتی از مناطق حفاظت‌شده رونوشت‌های *AUX1* در گیاهان دیگر جداسازی شد. توالی رونوشت و آمینو اسید این ژن در ریشه (*OeAUX1R*) و انتهای قلمه (*OeAUX1B*) با هم تفاوت داشت. احتمالا این چندشکلی ها می‌تواند مربوط به نقش کلیدی ژن در بافت‌های مختلف باشد. به منظور بررسی حالت‌های بیانی این ژن، آزمایش PCR در زمان واقعی روی قلمه‌های جمع‌آوری شده طی ریشه‌دهی از ژنوتیپ‌هایی با توان ریشه‌دهی بالا و پایین انجام شد. همچنین، بیان ژن در بافت‌های مختلف زیتون نیز بررسی گردید. نتایج مقدماتی نشان داد که بیان ژن های *OeAUX1R* و *OeAUX1B* در انتهای قلمه و ریشه ژنوتیپ‌های با ریشه‌دهی بالا افزایش می‌یابد و پیشنهاد می‌شود که *OeAUX1* در ریشه‌دهی زیتون دخالت دارد. همچنین بررسی‌های بیوانفورماتیک نشان داد که ژن *AUX1* در زیتون دارای ۸ اگزون است که توالی آن طی تکامل گیاهان حفاظت شده است.

واژه‌های کلیدی: زیتون (*Olea europaea* L.)، بیان ژن، ریشه‌دهی زیتون، ژن *AUX1*

مقدمه

زیتون (*Olea europaea* L.) یکی از فراوان‌ترین محصولات میوه‌دار در حوزه مدیترانه و از قدیمی‌ترین محصولات باغی است که عموماً برای استخراج روغن

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: m-amir@nigeb.ac.ir و hosseini@nigeb.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۱۴۴۵۸۰۳۶۸

کشت می‌شده است (Wu *et al*., 2004). این گونه متعلق به تیره Oleaceae، دیپلوئید (2*n*=46)، هتروزیگوت و تک‌پایه است (Johnson, 1957). تکثیر زیتون با روش‌های جنسی و غیرجنسی صورت می‌گیرد. از کشت بذر برای دستیابی به تنوع ژنتیکی و از ازدیاد غیرجنسی برای تولید گیاهان مشابه با گیاه مادری استفاده می‌شود. سیستم ریشه‌دهی زیتون بسیار قوی است. با توجه به این که ۷۰ تا ۹۰ درصد تکثیر این گیاه به ریشه‌دهی موفق قلمه‌ها بستگی دارد (Santos Macedo *et al*., 2009)، شناسایی عوامل تنظیم‌کننده تولید ریشه اعم از عوامل ژنتیکی، وضعیت غذایی، مرحله فنولوژیکی، فیزیولوژی گیاه مادری و شرایط محیطی ضروری است (Santos Macedo *et al*., 2009). یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در کارآیی گیاه، تنش‌های زیستی و غیرزیستی (شوری، خشکی و سرما) هستند که بر سرعت رشد و نمو و القای اندام‌هایی نظیر بخش‌های هوایی، ریشه و ریشه‌های مویین تأثیرگذار هستند (Santos Macedo *et al*., 2009). همچنین، عوامل ژنتیکی نیز تأثیر به‌سزایی بر قابلیت ریشه‌زایی زیتون دارند (Wu *et al*., 2004).

با توجه به اهمیت این گیاه روغنی در ایران و جهان، لازم است تا ژن‌های مهم دخیل در فرآیند ریشه‌زایی شناسایی و همسانه‌سازی شود تا بتوان در فرآیندهای به‌گزینی از آن بهره برد و به انتخاب گیاهانی با ریشه‌دهی بالا در مراحل نونهالی کمک نمود.

تاکنون مطالعات اندکی پیرامون ژن‌های دخیل در ریشه‌زایی زیتون انجام شده است و تنها Santos Macedo و همکاران (۲۰۰۹ و ۲۰۱۲) این موضوع را به صورت محدود در سطح مولکولی بررسی نموده‌اند در حالی که اغلب مطالعات بیانگر تأثیر ترکیباتی نظیر هورمون‌ها در القای ریشه‌زایی قلمه‌های زیتون است (Sebastiani and Tognetti, 2004).

پرسش‌های بی‌پاسخ متعددی در زمینه تنظیم ژنتیکی صفت ریشه‌زایی در زیتون وجود دارد و بر اساس بررسی‌های انجام شده، اهداف مطالعه حاضر تاکنون در طرح‌های مشابه انجام نشده است.

با توجه به طولانی بودن مرحله نونهالی زیتون (۵ سال) و زمان‌بر بودن روش‌های اصلاح سنتی و ناکارآمد بودن این روش‌ها و با توجه به این که کیفیت پایین ریشه‌زایی از عوامل محدودکننده باغات زیتون به شمار می‌رود، اصلاح ضعف ریشه زایی و افزایش کارآیی آن موجب افزایش مزیت‌های اقتصادی قلمه‌های زیتون و کاهش مدت زمان ایجاد باغستان‌های آن می‌شود (Sebastiani and Tognetti, 2004). از دیگر مزایای ریشه‌زایی، افزایش تحمل گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی است (Santos Macedo *et al*., 2009).

هدف از مطالعه حاضر، شناسایی و بررسی ژن یا ژن‌های تأثیرگذار در فرآیند ریشه‌زایی در قلمه‌های زیتون است. از آنجا که قابلیت ریشه زایی از جمله مشکلات مطرح در تولید و تکثیر پایه‌های مطلوب زیتون در ایران است، با شناسایی ژن یا ژن های دخیل در ریشه‌زایی می‌توان درختان زیتون با توان ریشه‌دهی بالا را در مراحل نونهالی شناسایی نمود و از این ویژگی در برنامه‌های اصلاح و به‌نژادی زیتون استفاده کرد، ضمن این که تکثیر غیرجنسی ارقام ارزشمند ایرانی با درک سازوکار ژنتیکی بهبود خواهد یافت. به طور کلی، نتایج این تحقیق پاسخگوی مشکلات اساسی در مطالعات ژنومیک و برنامه‌های به‌نژادی مولکولی زیتون در جهت بهبود و ارتقای ریشه زایی در ارقام کنسروی و روغنی زیتون ایران خواهد بود.

مواد و روش‌ها

مـــواد گیـــاهی: در پـژوهش حاضـر، از جمعیـت ژنتیکی حاصـل از تلاقـی دو رقـم زیتـون (Leccino به عنوان پایه مادری با ریشه‌دهـی قـوی و Dolce Agogia به عنوان پایه پدری با ریشـه دهـی ضـعیف) و ۱۱۵ نتـاج حاصله دارای تفرق برتر در صفت ریشه‌زایـی نسـبت بـه والدین استفاده شد. از هرکدام از نتاج حاصل از تلاقی، ۶ قلمه با دو تکرار تهیه شد. از هورمون IBA بـا غلظـت ۲۰۰۰ ppm به منظـور ریشـه دار شـدن اسـتفاده گردیـد. قلمه ها در اتاقک رشد حاوی پرلیت استریل بـا رطوبـت ۱۰۰ درصـد و دمـای ۲۳ درجـه سـانتیگراد نگهـداری شدند. پس از دو ماه، صفات ریشه‌زایی از جملـه: تعـداد قلمه های ریشه‌دار شده، درصد ریشه‌زایی، طول و تعداد ریشه‌ها اندازه‌گیری شد. بر اساس ایـن صـفات، گیاهـان با قابلیت ریشه‌دهی بـالا و پـایین انتخـاب شـدند. از ایـن گیاهان در زمـان‌هـای ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پـس از قلمه‌گیری (به ترتیب T0، T1، T2، T3 و T4) قلمه تهیه شد. در فواصل زمانی یاد شده، از ناحیه پـایین قلمـه هـر گیاه (یک سـانتی‌متـر انتهـای قلمـه زیـر نخسـتین گـره) نمونه‌برداری انجام و نمونه‌ها جهت اسـتخراج RNA بـه سرعت در نیتروژن مایع فریز شد. همچنین، برای بررسی بیان ژن ها در اندام‌های مختلف، از گل، بـرگ، ریشـه و انتهـای قلمـه یکـی از نتـاج بـا ریشـه‌دهـی بـالا نیـز نمونه‌برداری انجام گرفت.

انتخاب و جداسازی ژن کاندید

بر اسـاس پـژوهش‌هـای Shen و همکـاران (۲۰۱۰) و Corinne و همکـــاران (۲۰۱۲) چنـــدین ژن دخیـــل در ریشه زایی انتخاب شد و از میان آنها ژن ناقل برون شارش اکسین ۱ (*AUX1*) انتخاب گردید. با توجه به این که ایـن ژن تـاکنون در زیتـون گـزارش نشـده بـود، بـا نـرم‌افـزار Primer 3-0.40 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0) از مناطق حفاظت شده در سایر گونـه‌هـای زیتـون یک آغازگر چندحالتی برای این ژن طراحـی گردیـد. از ریشه و انتهای قلمه یکی از نتاج با ریشـه دهـی بـالا RNA اسـتخراج شـد (QIAGEN, Cat No: 74904) پـس از تیمار با *DNase* (Ambion, Cat No: 1011015) جهـت حذف آلودگی DNA، سنتز cDNA (Invitrogen, Cat No: 18080-093) صورت گرفت. همسانه‌سـازی ژن در حامل pGEM T-easy vector 2.1 و تـوالی‌یـابی توسـط دسـتگاه Genetic Analyzer (مـدل ABI PRISM 3130، شرکت Life Technologies، آمریکا) انجام شد.

بررســی کمـ ی بیــان ژن: PCR در زمـان واقعـی (Real-Time PCR) با سـایبرگرین (Power SYBR® Green, Applied Biosystem (AB) Lot: 1208368) به صورت تک مرحله ای و در حجم نهـایی ۱۰ میکرولیتـر انجـام شـد. مخلـوط واکـنش شـامل ۵ میکرولیتر از سایبرگرین و ۱ میکرومولار از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از تـوالی ژن *AUX1* در انتهـای قلمـه و ریشـه، بـا غلظـت ۲ پیکومـول بـود. واکـنش در دستگاه ABI طبق این شرایط انجام شد: یک چرخـه بـا ۹۵ درجه سانتیگراد بـه مـدت ۱۰ دقیقـه و ۴۰ چرخـه بـا دمـــای ۹۵ درجـــه ســـانتیگراد، ۱۰ ثانیـــه و ۶۰ درجـــه سـانتیگراد، ۱ دقیقـه. منحنـی ذوب در دمـای ۹۵ درجـه سانتیگراد، ۱۵ ثانیه؛ ۶۰ درجه سـانتیگراد، ۱ دقیقـه و ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱۵ ثانیه رسم شد. داده‌ها بـر اسـاس دو تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی بودند. تحلیل نتایج با روش Livak و Schmittgen (۲۰۰۱) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) انجـــام شد و با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری

P<0.01 بررسی شد.

بررسی‌های بیوانفورماتیک: با استفاده از داده‌های توالی‌یابی ژنوم والد مادری (Leccino)، توالی‌هایی با تشابه بیش از ۹۰ درصد با توالی ژن *AUX1* گزارش شده در سایر گیاهان انتخاب شد. سپس با نرم افزار برخط Softberry (http://linux1.softberry.com) توالی mRNAهایی به دست آمد، هر کدام از توالی‌ها به طور جداگانه در پایگاه اطلاعاتی NCBI بلاست شدند تا توالی منطبق با ژن *AUX1* مشخص شود. با هم‌ردیفی توالی پیش‌گویی شده، ژن *AUX1* و توالی نوکلئوتیدی ژنوم والد مادری، تعداد اگزون و اینترون‌های این ژن مشخص شد. سپس با نرم‌افزار برخط ExPASy (http://web.expasy.org/translate) توالی پروتئینی این ژن مشخص و برای توالی مذکور در پایگاه اطلاعاتی NCBI بلاست انجام شد.

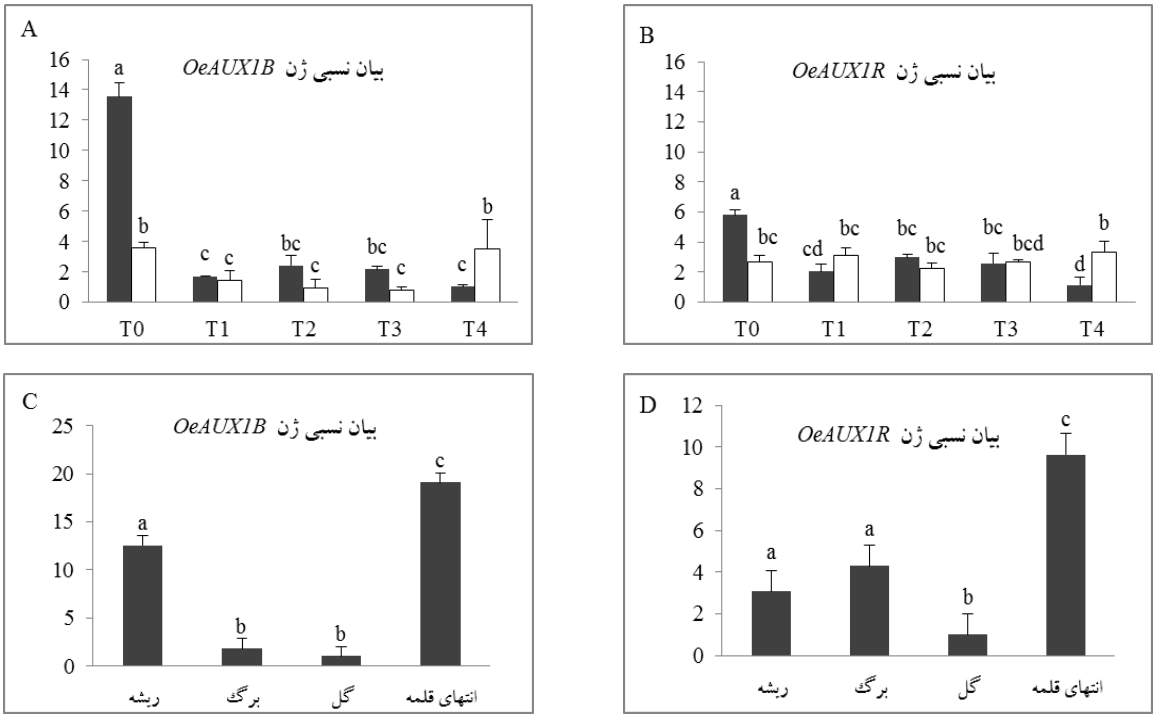
تحلیل آماری: آنالیز واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین بیان ژن در زمان‌های مختلف برای نتایج به دست آمده از PCR با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۰/۰۱ با نرم‌افزار R Console نسخه ۳/۰/۲ انجام شد.

نتایج و بحث

نتاج با ریشه‌دهی بالا (۱۰۰ درصد) و ریشه‌دهی پایین (۰ درصد) بر مبنای صفات ریشه زایی از جمله: تعداد قلمه‌های ریشه‌دار شده، درصد ریشه‌زایی، طول و تعداد ریشه‌ها شناسایی شدند. به دنبال آن، ژن *AUX1* در انتهای قلمه و ریشه در یکی از نتاج حاصل از تلاقی با ریشه دهی بالا همسانه‌سازی شد و نتایج نشان داد که توالی ژن در این دو منطقه دارای چندشکلی است به طوری که توالی ژن *AUX1* جداسازی شده از انتهای قلمه و ریشه در سطح رونوشت و آمینو اسید به ترتیب ۸۴ و ۸۵ درصد با یکدیگر تشابه داشتند. بر این اساس، ژن جداسازی شده از ریشه و انتهای قلمه به ترتیب *OeAUX1R* و *OeAUX1B* نام‌گذاری شد. احتمالا این چندشکلی نشان دهنده وجود دو آلل برای این ژن است که بر مبنای تفاوت بافت عمل می‌نمایند. با توجه نقش عمده اکسین‌ها در تشکیل ریشه‌های نابجا به ویژه در آغاز تشکیل و نمو پریموردیای ریشه های نابجا، افزایش تعداد ریشه‌های نابجا در اثر استفاده از اکسین خارجی و کاهش تعداد ریشه‌های نابجا در اثر ممانعت از انتقال اکسین (Fukaki and Tasaka, 2009)، بررسی الگوی بیان نسبی این ژن ها در بافت‌ها در زمان‌های مختلف ضروری به نظر می‌رسد. به این منظور از آزمون کمی PCR در زمان واقعی با دقت بسیار بالا جهت بررسی بیان استفاده گردید.

نتایج در زمان واقعی PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *OeAUX1R* و *OeAUX1B* در زمان‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از قلمه گیری برای نتاج با ریشه‌دهی بالا و پایین نشان داد که در نتاج با ریشه دهی بالا بیان هر دو ژن در زمان ۰ افزایش و سپس کاهش معنی‌داری داشت و در زمان‌های بعد میزان بیان تقریبا ثابت بود (شکل ۱-A و B). از سوی دیگر، بیان ژن *OeAUX1B* در نتاج با ریشه‌دهی پایین در زمان‌های ۰ و ۴۰ روز پس از قلمه‌گیری اختلاف معنی‌داری با بیان همین ژن در سه زمان دیگر داشت، اما در مقایسه با نتاج با ریشه‌دهی بالا بیان این ژن در زمان ۰ تقریبا ۶ برابر بیشتر از بیان در نتاج با ریشه دهی پایین بود ضمن این که تفاوتی در میزان بیان ژن *OeAUX1R* طی

مدت زمانی معین در نتاج با ریشه‌دهی پایین مشاهده نشد. این نتایج نشان داد که با توجه به این که قلمه ها از شاخه‌های جدید گرفته شدند و بر اساس این که سطوح اکسینی که به صورت طبیعی در بافت‌های قلمه‌زده وجود دارد به گیاه مادری بستگی دارد (George *et al.*, 2008)، بنابراین سطوح بالای بیان ژن در زمان ۰ می‌تواند به علت توان بالای گیاه مادری در ایجاد ریشه باشد. Costa و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده‌اند که طی ساعات اولیه پس از جداسازی قلمه گیاه جاسمونات، ترکیبات فنلی و اکسین در انتهای قلمه به صورت محلی افزایش می‌یابند و بلافاصله پس از جداسازی قلمه ها از گیاه مادری، محتوای بالایی از اکسین را مشاهده کردند که می‌تواند در بهبود ریشه‌زایی مؤثر باشد. همچنین گزارش شده است که محتوای اولیه و ترکیبات فنلی منتقل شده از گیاه مادری به قلمه ها، ممانعت از تجزیه اکسین در انتهای قلمه توسط ترکیبات فنلی و نیز میان‌کنش بین این متابولیت‌ها، اکسین‌ها و پراکسیدها می‌تواند تشکیل ریشه‌های نابجا را تحت تأثیر قرار دهد (De Klerk *et al.*, 1999). با توجه به این شواهد می‌توان احتمال داد که ژن *AUX1* در گیاهان با توان ریشه‌دهی بالا از ابتدا بیان بالایی داشته است به همین دلیل می‌تواند پس از قلمه گیری، اکسین بیشتری به انتهای قلمه منتقل کند و به ایجاد ریشه در این منطقه منجر شود.



شکل ۱- الگوی بیان نسبی ژن‌های *OeAUX1B* و *OeAUX1R*. A و B: بیان ژن‌ها در زمان‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از قلمه‌گیری (به ترتیب T0، T1، T2، T3 و T4) در یکی از نتاج با ریشه‌دهی بالا (سیاه) و یکی از نتاج با ریشه‌دهی پایین (سفید)؛ C و D: نحوه بیان ژن‌ها در بافت‌های گوناگون یکی از نتاج با ریشه‌دهی بالا. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۱ است.

مطالعات نشان داده است که نیمه عمر پروتئین کد شده توسط ژن *AUX1* بسیار کوتاه است (Corinne *et al.*, 2012) و احتمالا طی ساعات اولیه پس از قلمه گیری بیان این ژن تغییر خواهد یافت. بر اساس مطالعات موجود اکسین می‌تواند در مراحل اولیه ایجاد پریموردیای ریشه پس از قلمه‌گیری افزایش یابد که می‌تواند بر بیان ژن‌های وابسته هم اثر بگذارد (Costa *et al.*, 2013). به منظور درک بیشتر لازم است بیان ژن طی ساعات مختلف پس از قلمه گیری در نتاج با ریشه‌دهی بالا و پایین بررسی گردد، همچنین اثر اکسین خارجی بر بیان ژن *AUX1* در آزمایشی با حضور اکسین و بدون آن در زمان‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از قلمه‌گیری در حال بررسی است.

نتایج بررسی بیان این ژن‌ها در بافت‌های مختلف از جمله: برگ، گل، ریشه و انتهای قلمه در نتاج با ریشه‌دهی بالا نشان داد که بیشترین بیان ژن‌ها در ناحیه انتهای قلمه و ریشه است (شکل ۱-C و D).

تحلیل بیوانفورماتیک نشان داد که ژن *AUX1* در زیتون دارای ۸ اگزون و طول کامل ژن حدود ۴۰۰۰ جفت باز است. توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی این ژن با تشابه بالای ۸۰ درصد با توالی نوکلئوتید و پروتئین همین ژن در گیاهان دیگر هم‌ردیف شدند و مشخص شد که توالی ژن *AUX1* در بین گیاهان، طی تکامل حفاظت شده است.

با توجه به این که خانواده ژنی *AUX/LAX* از انتقال دهنده های اکسین برون شارش برای استقرار و سازماندهی سلول‌های ریشه جنینی آرابیدوپسیس هستند (Shen *et al.*, 2010) و پژوهش‌های دیگر نشان داد که معمولا انتقال اکسین از برگ و تجمع آن در انتهای قلمه برای ایجاد ریشه های نابجا در ارقام سهل‌ریشه‌زا کافی است (Costa *et al.*, 2013) و این امر می‌تواند توسط ژن های ناقل اکسین نظیر *AUX1* صورت گیرد، بنابراین انتظار می‌رود این ژن در زیتون نیز به عنوان یکی از ژن‌های کاندید دخیل در ریشه‌زایی باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بابت تأمین هزینه‌ها (طرح پژوهشی شماره ۴۳۷) و فراهم نمودن امکانات و همچنین مؤسسه تحقیقات علوم زیستی و منابع زیستی پروجا در ایتالیا در ایتالیا سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

Corinne, A. D., Bassa, C., Mila, I., Regard, F., Zouine, M. and Bouzayen, M. (2012) Genome-wide identification, functional analysis and expression profiling of *Aux/IAA* gene family in tomato. Plant Cell Physiology 53: 1583-1595.

Costa, C. T., Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schwambach, J, Maraschin, F. S. and Fett-Neto, A. G. (2013) When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. Frontiers in Plant Science 4: 133.

De Klerk, G. J., Van der Krieken, W. and De Jong, J. C. (1999) The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 35: 189-199.

ExPASy, SIB bioinformatics Resource Portal. Retrieved from http://www.expasy.org. On: 30 June 2011.

Fukaki, H. and Tasaka, M. (2009) Hormone interactions during lateral root formation. Plant Molecular Biology 69(4): 437-449.

George, E. F., Hall, M. A. and De Klerk, G. J. (2008) Plant propagation by tissue culture. 3rd edition, Dordrecht, Netherlands.

Johnson, L. (1957) A review of the family *Oleaceae*. Contributions from the New South Wales National Herbarium 2: 397-418.

Livak, K. J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCT method. Methods 25: 402-408.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. Retrieved from http://blast.ncbi.nlm.nih.gov. On 14 November 2013.

Santos Macedo, E., Cardoso, H. G. and Hern´andez, A. (2009) Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction. Physiologia Plantarum 137: 532-552.

Santos Macedo, E., Sircar, D., Cardoso, H. G., Peixe, A. and 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. The Plant Cell Report 31: 1581-1590.

Sebastiani, L. and 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.

Shen, C. J., Bai, Y., Wang, S., Zhang, S., Wu, Y., Chen, M., Jiang, D. and Qi, Y. (2010) Expression profile of *PIN*, *AUX/ LAX* and *PGP* auxin transporter gene families in *Sorghum bicolor* under phytohormone and abiotic stress. Federation of European Biochemical Societies Journal 277: 2954-2969.

Softberry Software and Services. Retrieved from http://linux1.softberry.com. On 10 August 2013.

Wu, S., Collins, G. and Sedgley, M. (2004) A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite and SCAR markers. Genome 47: 26-35.

Identification and gene expression analysis of *AUX1* influencing adventitious root induction in olive cuttings (*Olea europaea* L.)

Vahideh Hedayati [1], Amir Mousavi [1]*, Fiammetta Alagna [2], Saverio Pandolfi [2], Khadijeh Razavi [1], Luciana Baldoni [2] and Seyed Mehdi Hosseini Mazinani [1]*

[1] Department of Plant Molecular Biotechnology, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
[2] Institute of Biosciences and Bioresources (CNR-IBBR), Perugia, Italy

Abstract
Olive is one of the most important fruit crops throughout the Mediterranean Basin, mainly propagated by cuttings. The adventitious root development is a key stage in vegetative propagation; however the low rooting capacity of some cultivars severely affects the efficiency of olive clonal propagation. Auxin Influx Carrier gene (*AUX1*), plays a key role in lateral root formation in many plant species promoting the export of IAA from newly developing leaves to lateral root primordia. Putative olive homologues were amplified by using degenerate primers designed on the conserved regions of *AUX1* transcripts identified in other plants. Transcript and amino acid sequences in root (*OeAUX1R)* and base of cutting (*OeAUX1B)* were different causes of polymorphisms relating to possible distinct roles in these tissues. In order to investigate the gene expression patterns, Real-time PCR was performed on cuttings during the rooting stage collected from genotypes characterized by high and low rooting ability. Moreover, the gene expression was investigated on different olive tissues. Preliminary results showed that the expression of *OeAUX1B* and *OeAUX1R* in base of cuttings and roots of the high-rooting genotype were higher which suggests the hypothesis of the involvement of *OeAUX1* in olive rooting. Bioinformatics analysis revealed that AUX1 gene had 8 exons in olive and the sequence of this gene in plant was conserved during evolution.
Key words: *Olea europaea* L., Gene expression, Olive rooting, *AUX1* gene

* Corresponding Authors: m-amir@nigeb.ac.ir, hosseini@nigeb.ac.ir