Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 49, No 4, Winter 2019 (151-160)
DOI: 10.22059/ijfcs.2018.232809.654314

علوم گیاهان زراعی ایران
دورۀ ۴۹، شمارۀ ۴، زمستان ۱۳۹۷ (ص۱۶۰-۱۵۱)

آنالیز پایداری بیان برخی از ژن‌های مرجع به منظور مطالعات بیان ژن در برنج با استفاده از Real-time PCR

امین ابراهیمی[1*]، محمد رضا عامریان[1] و آرمان بیرقدار کشکولی[2]
۱. دانشگاه صنعتی شاهرود، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات
۲. دانشگاه واخنینگن هلند، گروه فیزیولوژی گیاهی
(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۸)

چکیده

با ابداع واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی، تحول عظیمی در زمینه تجزیه بیان ژن در موجودات زنده ایجاد شد، چراکه یکی از روش‌های مناسب برای ارزیابی میزان بیان ژن‌ها محسوب می‌گردد. در این روش، برای ارزیابی دقیق بیان ژن، کنترل خطای بین نمونه‌ها ضروری می‌باشد. روشی که به صورت گسترده برای کنترل خطا مورد استفاده قرار می‌گیرد، نرمال کردن سطوح **RNA**، با یک ژن مرجع یا خانه‌دار می‌باشد. این مطالعه، به منظور بررسی کارایی۱۰ ژن خانه‌دار در گیاه برنج در شرایط تنش شوری انجام شد. تیمار شوری صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار، بعد از گذشت هشت هفته از رشد گیاهان اعمال شد. همچنین در زمان‌های صفر، شش، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار شوری، از اندام‌های ریشه و برگ نمونه‌گیری صورت گرفت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار **geNorm** نشان داد که ژن‌های ***eIF-4a*** و ***ACT7*** در بافت ریشه و ژن‌های ***GAPDH*** و ***ACT11*** در بافت برگ، به عنوان پایدارترین ژن‌های مرجع می‌توانند در نرمال‌سازی مطالعات بیان ژن مورد استفاده قرار گیرند. بر اساس آماره توصیفی در برنامه **BestKeeper**، ژن ***eIF-4a*** در اندام ریشه و ژن‌های ***UBQ10*** و ***eIF-4a*** در اندام برگ، دارای بیشترین همبستگی با شاخص **BestKeeper** (به ترتیب ۰/۸۸۵، ۰/۸۹۱و ۰/۸۸۶) می‌باشند. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که ژن‌های ***eIF-4a***، ***ACT7***، ***UBQ10*** ، ***GAPDH*** و ***ACT11*** می‌توانند به عنوان ژن‌های مرجع مناسب در برنج، به منظور نرمال‌سازی داده‌های بیانی، مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: برنج، تنش شوری، ژن مرجع، **BestKeeper**، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی.

Analysis of the stability of housekeeping genes expression to study the gene expression in rice using by Real-time PCR

Amin Ebrahimi[*1], Mohammad Reza Amerian [1], Arman Beyraghdar Kashkooli[2]
1.Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
2. Laboratory of Plant Physiology, Wageningen University, Wageningen, Netherlands
(Received: May 7, 2017- Accepted: January 8, 2018)

ABSTRACT

A significant progress has been made in the expression profiling of living organism with invention of real time PCR, because this method is one of the suitable methods for evaluating the gene expressions . In this method, it is crucial to control the error observed between samples. Normalization with a housekeeping gene is widely utilized to check the errors observed among samples in this method. In the current study, expression patterns of 10 housekeeping genes under salinity stresses were evaluated. eight-week old plants were evaluated under salinity stress at concentrations of 0, 200 and 400 Mm. Leaves and roots Samples were collected from the treated plants at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hour post treatment. Expression analysis of the obtained data was performed via geNorm software and it was shown that the *eIF-4a* as well as *ACT7* genes in the root tissues and *GAPDH* and *ACT11* in the leaf tissues was constitutively expressed. Based on the results of the analysis trough Best Keeper, the *eIF-4a* gene (in root) and *UBQ10* and *eIF-4a* (in leaf) showed the highest correlation with the index of BestKeeper. Thus, it was concluded that the *eIF-4a*, *ACT7*, *GAPDH*, *UBQ10* and *ACT11* genes could be considered as suitable housekeeping genes to be used in the normalization of the derived from Rice.

Key words: *Oryza sativa*, Real time PCR, Salinity stress, Reference gene and Best Keeper.

* Corresponding author E-mail: aminebrahimi@shahroodut.ac.ir

مقدمه

امروزه تقاضای روزافزون تولیدات گیاهی، با کاهش سطح زمین‌های قابل کشت، به واسطه محدودیت منابع آب و خاک، فرسایش خاک و ... همراه شده است. از طرفی، تنش‌های محیطی، به صورت گسترده، به عنوان تهدید اصلی امنیت غذایی جهان محسوب می‌شوند (Fedoroff *et al*., 2010). تنش‌های محیطی، منجر به کاهش رشد و عملکرد گیاهان زراعی می-شوند؛ بنابراین، بررسی پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی، از اهمیت زیادی برخوردار است. درک پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی نظیر شوری، خشکی، سرما و گرما، به عنوان ابزاری برای مطالعه و شناخت مکانیسم‌های مقاومت در گیاه و تولید و اصلاح ارقام متحمل به تنش، کاربرد دارد (Chinnusamy *et al*., 2005). تنش شوری، جزء تنش‌های غیر زیستی مهمی است که اثرات زیانباری بر کمیت و کیفیت محصول دارد و موجب کاهش عملکرد در گیاهان زراعی می-شود (Ruiz-Carrasco *et al*., 2011). با وجود تلاش-های زیاد در زمینه شناخت و درک مکانیسم‌های مقاومت به شوری در گیاهان، تاکنون موفقیت چندانی حاصل نشده است. از جمله دلایل این امر می‌توان به کمّی بودن این صفت و پیچیدگی مکانیسم‌های مقاومت اشاره کرد. تغییر در الگوی بیان ژن در گیاهان، یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت در زمان بروز تنش محسوب می‌شود (Bohnert *et al*.,2001). در میان روش‌های مورد استفاده در مطالعات بیان ژن، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (qRT-PCR)، یکی از روش‌های کارا و موثر برای ارزیابی سطح بیان ژن است (Gutierrez *et al*., 2008). این روش، منجر به ایجاد تحولی عظیم در زمینه تجزیه بیان ژن در موجودات زنده شد (Jain *et al*., 2008). از مزیت‌های این تکنیک می‌توان به حساسیت بالا، اختصاصی بودن و کاربرد گسترده آن اشاره کرد که این روش را به یک روش عمومی و پر کاربرد در مطالعات تجزیه بیان ژن تبدیل کرده است (Jian *et al*., 2008). با وجود مزایای این تکنیک بسیار قدرتمند، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی، از مشکلات خاصی برخوردار است که مهم‌ترین آن، نرمال‌سازی داده‌ها با ژن مرجع می‌باشد. در حقیقت، زمانی‌که پارامتر مورد مطالعه، RNA باشد، کنترل خطا بین نمونه‌ها ضروری است. یک روش برای نرمال سازی مطالعات بیان RNA، استفاده از ژن‌های خانه‌دار یا مرجع می‌باشد (Dheda *et al*., 2004). به نظر می‌رسد که ژن‌های خانه‌دار که به عنوان کنترل درونی مد نظر هستند، دارای بیان پایدار در بافت‌های مختلف و در همه مراحل تکاملی باشند (Jian *et al*., 2008). اگر این مقادیر ثابت نباشند، نرمال‌سازی متفاوت می-شود و منجر به افزایش خطا یا نتایج اشتباه خواهد شد (Garson *et al*., 2005). ژن‌های خانه‌دار درگیر در فرآیندهای سلولی پایه از قبیل *18S rRNA*، *UBIQUITIN (UBQ)*، *ACTIN (ACT)*، *25S rRNA*، *TUBULIN (TUB)* و گلیسرآلدئید۳- فسفات دهیدروژناز *(GAPDH)*، به‌عنوان کنترل‌های درونی در تجزیه بیان ژن استفاده می‌شوند (Jain *et al*., 2006). با این وجود، ثابت شده است که سطوح رونویسی این ژن‌ها، به میزان قابل توجهی تحت شرایط مختلف آزمایشی تغییر خواهد کرد (Czechowski *et al*., 2005; Lee *et al*., 2002; Bevitori *et al*. (2014). در تحقیق خود گزارش کردند که *UBQ5*، *GAPDH* و *eEF-1α*، ژن‌های مرجع مناسبی هستند که کارایی بالایی دارند؛ بنابراین لذا می‌توان در مطالعات بیانی در تنش‌های زیستی و غیرزیستی از آنها استفاده کرد. Jian-Feng *et al*. (2014) در تحقیق خود نشان دادند که ژن‌های *UBQ* و *β-TUB*، ژن‌های مناسب با سطوح پایدار در تنش‌های زیستی هستند؛ بنابراین می‌توانند به عنوان ژن‌های مرجع در مطالعات نرمال‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی مورد استفاده قرار گیرند. Xu *et al*. (2015) در مطالعه خود نتیجه گرفتند که ژن‌های *Fb15* و *eIF-4a*، ژن‌های پایدار در آندوسپرم و در مراحل مختلف تکاملی هستند درحالی‌که در تیمار دمای بالا، ژن‌های *Fb15* و *UBQ5*، دارای بیشترین پایداری بودند. الگوریتم‌های آماری از قبیل geNorm و BestKeeper، برای ارزیابی بهترین ژن(های) مرجع مناسب در نرمال سازی

اطلاعات Real-time PCR در مجموعه نمونه‌های بیولوژیکی خاص توسعه یافته‌اند (Pfaffl *et al*., 2004; Vandesompele *et al*., 2002). یکی از روش‌های مطالعه پاسخ مولکولی گیاهان به تنش‌های محیطی، بررسی پروفایل بیانی ژن‌ها در سطح RNA می‌باشد زیرا تنظیم فعالیت ژن، ابتدا در سطح رونویسی اتفاق می‌افتد و پاسخ‌های بیولوژیک و برنامه‌ریزی تکاملی موجود، بر اساس تنظیم دقیق بیان ژن‌ها کنترل می‌شوند. در نتیجه، مقایسه محتوای رونویسی در مراحل فیزیولوژیک خاص، الگوهای اختصاصی بیان ژن در آن مرحله را مشخص می‌کند. هدف از این تحقیق، بررسی کارایی تعدادی از ژن‌های مرجع در ریشه و برگ برنج، به منظور شناسایی ژن‌های کنترل درونی مناسب، برای نرمال‌سازی اطلاعات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار

بذرهای برنج (*Oryza sativa* L .*ssp. japonica*) رقم Nipponbare، با استفاده از محلول هیپوکلریت سه درصد و سپس قارچ‌کش ویتاواکس، با نسبت دو در هزار ضدعفونی شدند. از محیط هیدروپونیک حاوی محلول غذایی هوگلند ۱/۲ (با pH حدودا ۵/۷ – ۵/۵)، برای کشت و رشد گیاهچه‌ها تا پایان مراحل نمونه‌برداری استفاده شد. هر روز pH محلول غذایی کنترل می‌شد و هر سه روز یکبار، محلول غذایی با محلول جدید جایگزین می‌شد. محیط رشد گیاهان، اتاقک رشد با شرایط ۸/۱۶ ساعت روشنایی/تاریکی، دمای روز/شب ۲۰/۲۵ درجه سانتی‌گراد بود و رطوبت نسبی آن بین ۶۵ تا ۵۵ درصد حفظ شد. تیمارهای شوری صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار (Vaidyanathan *et al*., 2003)بعد از گذشت هشت هفته از رشد گیاهان، اعمال شدند. همچنین در زمان‌های صفر، شش، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار شوری، نمونه‌گیری از اندام‌های ریشه و برگ انجام شد و نمونه‌ها بلافاصله جهت استخراج RNA، به فریزری با دمای ۸۰°C- منتقل شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA با استفاده از کیت RNeasy® Plant Mini Kit، ساخت شرکت QIAGEN و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده، از ژل الکتروفورز یک درصد و دستگاه نانودراپ و جهت ساخت رشته اول cDNA از کیت سنتز رشته cDNA، ساخت شرکت Fermentas استفاده شد.

انتخاب ژن‌های مرجع مختلف

با توجه به بررسی منابع مختلف (Bevitori *et al*., 2014; Fang et al., 2015; *Jain et al*., 2006)، ۱۰ ژن مرجع مختلف در این تحقیق انتخاب شدند. اسامی و مشخصات این آغازگرها در جدول ۱ ارائه شده است.

واکنش زنجیره پلی‌مراز زمان واقعی

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی با سه تکرار تکنیکی و سه تکرار بیولوژیکی، در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر، حاوی ترکیبات موجود در جدول شماره ۲ و با شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به شرح ذیل انجام شد: ابتدا دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۵۶ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد (دمای Tm آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. در این واکنش، جهت مطالعه تغییر رونوشت ژن‌ها، از کیت iQTM SYBR® Green Supermix، ساخت شرکت Bio-Rad استفاده شد.

استانداردسازی و آنالیز داده‌ها

در این آزمایش، به منظور تنظیم دستگاه و به‌دست آوردن کارایی مناسب، از سری رقت‌های مختلف استفاده شد، به‌طوری‌که غلظت‌های ۰/۱ ، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ از تمامی cDNAهای سنتز شده، به عنوان سری‌های رقت، برای تمامی ژن‌های مرجع در نظر گرفته شد و در انتها، کارآیی PCR برحسب میزان Ct هر نمونه در سه تکرار و منحنی استاندارد محاسبه شد. در ضمن، از منحنی ذوب، به عنوان فاکتور تکثیر

اختصاصی محصولات استفاده شد (شکل ۱). از نرم‌افزارهای geNorm (Vandesompele *et al*., 2002) و BestKeeper (Pfaffl *et al*., 2004)، به منظور تعیین مناسب‌ترین ژن رفرنس و با ثبات‌ترین مقادیر بیان ژن استفاده شد.

جدول۱- مشخصات آغازگرهای ژن‌های مرجع استفاده شده در این تحقیق

Table 1- The primer sequences of housekeeping genes used in this study

Gene description	Gene Name	Sequence of primer (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Length (bp)
Actin 11	*ACT11*	CAGCCACACTGTCCCCATCTA AGCAAGGTCGAGACGAAGGA	58 58	67
Actin 7	*ACT7*	CTTCCCTCAGCACCTTCCAA GGTCCAGCTTTCACACTCCAT	56 57	110
Eukaryotic elongation factor 1-alpha	*eEF-1a*	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT GACTTCCTTCACGATTTCATCGTAA	57 57	103
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	*GAPDH*	AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT	56 57	79
Beta-tubulin	*b-TUB*	GCTGACCACACCTAGCTTTGG AGGGAACCTTAGGCAGCATGT	57 58	82
Eukaryotic initiation factor 4a	*eIF-4a*	TTGTGCTGGATGAAGCTGATG GGAAGGAGCTGGAAGATATCATAGA	56 56	76
Ubiquitin 10	*UBQ10*	TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGG GCACCACAAATACTTGACGAACAG	57 57	81
Ubiquitin 5	*UBQ5*	ACCACTTCGACCGCCACTACT ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	60 60	69
18S ribosomal RNA	*18S rRNA*	CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA ACACTTCACCGGACCATTCAA	59 58	65
25S ribosomal RNA	*25S rRNA*	AAGGCCGAAGAGGAGAAAGGT CGTCCCTTAGGATCGGCTTAC	58 57	68

جدول۲- اجزا واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی

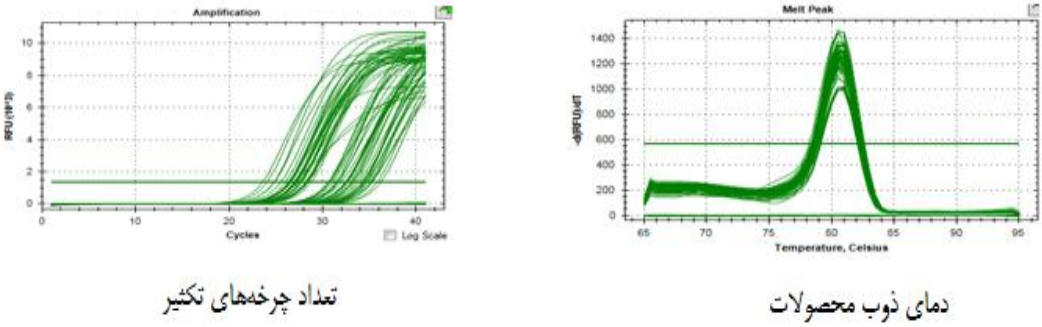
Table 2- Components of master mix used in Real time PCR

Material	Concentration	Volume (ml)
iQ™ SYBR® Green Supermix	1X	12.5
Primer (Forward)	10 Pmol	1
Primer (Reverse)	10 Pmol	1
cDNA	250 ng	5
Strile Water		5.5
Total volume		25

نتایج و بحث

در این بررسی، پایداری بیان ۱۰ ژن مرجع در شرایط تنش شوری و نرمال، در برگ و ریشه در برنج، بررسی شد . از آن‌جا که تنوع بین نمونه‌ها ممکن است در مقدار و کیفیت مواد آغازین، آماده سازی RNA، سنتز cDNA، رقیق سازی و پیپت کردن، منجر به ایجاد خطا شود، بنابراین کنترل خطا بین نمونه‌های آزمایشی در مطالعات بیان ژن، امری ضروری است (Dheda *et al*.,2004). انحراف معیار سطوح بیانی، از جمله شاخص‌هایی است که در بررسی پایداری بیان ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد. انحراف معیار، بیشتر نشان دهنده پایداری کمتر ژن مورد نظر است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ژن‌های *eIF-4a*، *b-TUB*، *UBQ5* و *ACT7*، دارای بیشترین پایداری بیان (دارای کمترین انحراف معیار و ضریب تغییرات) در اندام‌های ریشه و برگ در حالت نرمال و تنش هستند (جدول ۳). ضریب تغییرات، شاخص دیگری است که در بررسی پایداری بیان ژن‌های مرجع استفاده می-

شود. ضریب تغییرات کمتر، دلالت بر تنوع کمتر و پایداری بیشتر دارد (Xu *et al.*, 2015). با توجه به نتایج جدول ۳، ژن‌های *eIF-4a*، *b-TUB*، *UBQ5* و *ACT7*، دارای کمترین ضریب تغییرات و بیشترین پایداری در اندام‌های ریشه و برگ، در هر دو شرایط تنش و نرمال می‌باشند. در حقیقت، ژن‌های مذکور در هر دو اندام و در دو حالت تنش و نرمال، دارای ضریب تغییرات و انحراف معیار کمتری بودند، بنابراین می‌توان از آن‌ها در مطالعات بیان ژن، به عنوان ژن-های مرجع قابل اعتماد استفاده کرد. مهم آن‌که بیان ژن‌های مذکور، نه تنها در شرایط تنش شوری و نرمال، پایدار بود، بلکه پایداری آن‌ها حتی در زمان-های مختلف بعد از قرار گرفتن در معرض تیمار شوری (زمان‌های شش، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار شوری) نیز ثابت ماند.



شکل ۱- منحنی تکثیر (سمت چپ) و منحنی ذوب (سمت راست) در ریشه و برگ برنج مربوط به ژن مرجع *eIF-4a*

Figure 1- Amplification curve (left) and melting curve (right) in rice roots and leafs related to *eIF-4a*

جدول ۳- آماره‌های توصیفی ژن‌های خانه‌دار در اندام‌های ریشه و برگ در برنج

Table 3- Descriptive statistics of housekeeping genes in roots and leaves of Rice

Gene		*UBQ10*	*UBQ5*	*eIF-4a*	*GAPDH*	*ACT11*	*18S rRNA*	*eEF-1a*	*ACT7*	*25S rRNA*	*b-TUB*
Minimum	Root	20.57	26.50	25.35	23.05	23.75	12.20	25.26	23.53	13.75	27.4
	Shoot	20.57	29.40	24.82	23.05	23.75	12.27	25.26	23.53	13.52	21.73
Maximum	Root	32.99	35.20	32.38	32.16	33.16	21.10	40.70	30.09	27.97	31.94
	Shoot	32.99	35.75	32.09	32.16	33.16	22.96	40.70	30.09	27.19	26.38
Standard deviation	Root	2.81	1.25	1.22	2.44	2.22	1.97	3.68	1.45	3.14	1.25
	Shoot	2.43	1.26	1.83	2.56	2.07	1.90	4.17	1.46	3.19	1.07
CV (%)	Root	11.34	4.07	7.73	9.16	7.79	12.21	12.24	5.31	16.00	4.26
	Shoot	10.18	4.08	6.56	9.85	7.42	12.16	13.37	5.39	16.57	4.53

آماره توصیفی محاسبه شده توسط نرم‌افزار BestKeeper، در حقیقت ثبات ژن‌های مرجع را بر اساس مقادیر خام Ct رتبه‌بندی می‌کند. بر اساس این شاخص، ژن *eIF-4a* در ریشه و ژن‌های *UBQ10* و *eIF-4a* در برگ، در هر دو شرایط تنش و نرمال، دارای بیشترین همبستگی با شاخص BestKeeper (به ترتیب ۰/۸۸۵، ۰/۸۹۱و ۰/۸۸۶) بودند (جدول ۴). بنابراین با توجه به نتایج حاصل از برنامه BestKeeper، ژن‌های *eIF-4a* و *UBQ10*، به عنوان ژن مرجع قابل اعتماد در نرمال‌سازی بیان ژن‌های هدف در برنج انتخاب شد.

برای تجزیه پایداری ژن‌های مرجع کاندید تحت شرایط آزمایشی، از دو الگوریتم NormFinder و geNorm استفاده شد (Pettengill *et al.*, 2012).

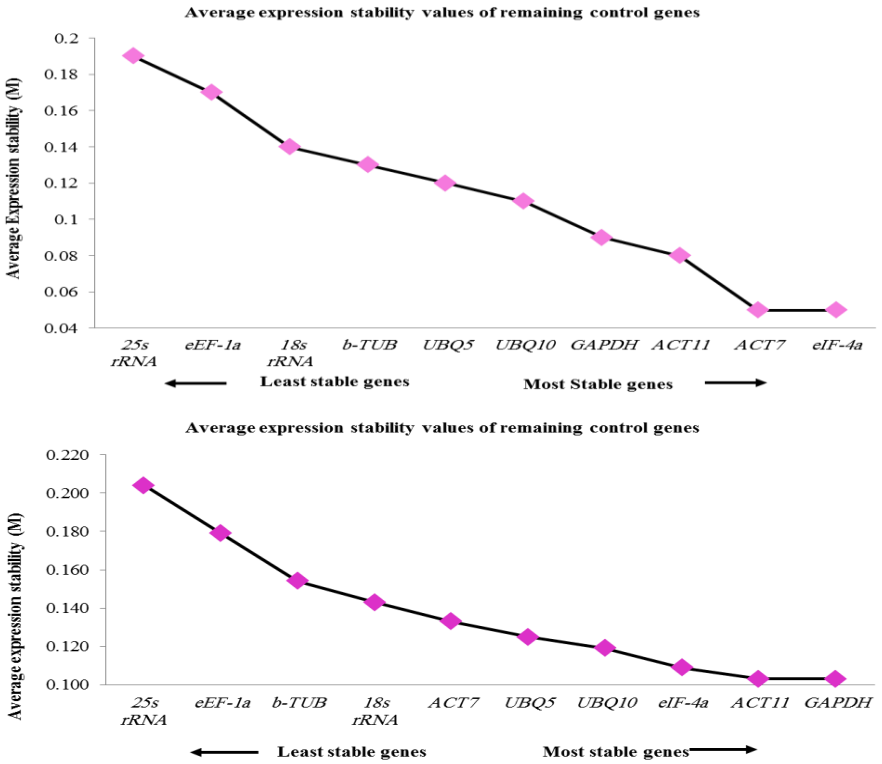
پایدارترین ژن مرجع، دارای حداقل مقدار متوسط پایداری بیان (M) است، درحالی‌که ژن مرجع با پایداری کمتر، دارای بالاترین مقدار متوسط پایداری بیان می‌باشد (Bevitori *et al.*, 2014). بر اساس الگوریتم geNorm، مقدار متوسط پایداری بیان ۰/۵، به عنوان نقطه برش در نظر گرفته می‌شود، بنابراین ژن‌ها با میزان متوسط پایداری بیان کمتر از ۰/۵، به عنوان ژن‌های مرجع کاندید مناسب مدنظر قرار می‌گیرند. با توجه به نتایج حاصل از geNorm و متوسط پایداری

مورد نظر، تمامی ژن‌های مورد مطالعه، دارای مقدار متوسط پایداری بیان کمتر از ۰/۵ بودند. ژن‌های *eIF-4a* و *ACT7* با کمترین مقدار متوسط پایداری بیان، به عنوان پایدارترین ژن‌های مرجع در ریشه شناسایی شدند (شکل ۲). همچنین در برگ، ژن‌های *GAPDH* و *ACT11*، دارای بیشترین پایداری بیان بودند. این ژن‌ها، به علت ثبات و پایداری بیان، در هر دو شرایط تنش و نرمال می‌توانند به عنوان ژن‌های مرجع مناسب در مطالعات مختلف استفاده شوند. Bevitori *et al.* (2014)، در مطالعه خود، با بررسی پایداری بیان ژن‌های *UBQ5*، *TUB*، *elF-4α*، *GAPDH* و *18S rRNA* نشان دادند که تمامی ژن‌های مورد آزمایش در شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی، دارای مقدار متوسط پایداری بیان کمتر از ۰/۵ هستند، بنابراین همه ژن‌های مورد بررسی را به عنوان ژن مرجع مناسب برای تیمارهای چندگانه معرفی کردند. آن‌ها همچنین اعلام کردند که ژن *GAPDH* می‌تواند به عنوان ژن مرجع مناسب در شرایط تنش مطرح باشد. Kim *et al.* (2003) در یک بررسی، ژن‌های *18S* و *25S rRNA* را به عنوان ژن‌های مرجع، در آنالیز بیان تعداد زیادی ژن در گونه‌های مختلف استفاده کردند. در تحقیق حاضر، ژن‌های *18S* و *25S rRNA* در ریشه و برگ، دارای پایداری بیان پایینی بودند. Bevitori *et al.* (2014) و Fang *et al.* (2015) نیز در تحقیق خود نشان دادند که ژن *18S rRNA*، دارای کمترین مقدار پایداری در شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی است. در حقیقت، دلیل اصلی استفاده از rRNA کل برای نرمال‌سازی، محتوی میزان بالای ژن‌های *18S rRNA*، در مقایسه با مولکول‌های رونوشت‌های mRNA هدف است (Narsai *et al.*, 2010). از آنجایی که الگوریتم‌های مختلفی برای تجزیه و تحلیل متوسط پایداری بیان در این تحقیق بکار رفته است، بدیهی است که رتبه‌بندی ژن‌های مرجع در برخی موارد، دارای تفاوت‌هایی باشد. Cao *et al.* (2016) نیز در مطالعات خود نتیجه گرفتند که دلیل اختلاف در رتبه‌بندی ژن‌های مرجع، استفاده از الگوریتم‌های مختلف آماری می‌باشد. در مطالعه Omar *et al,* (2016) که به منظور انتخاب پایدارترین ژن‌های مرجع در گیاه برنج در شرایط آلودگی بلاست (*Magnaporthe oryzae*) انجام شد، ژن *Actin* به عنوان بهترین و پایدارترین ژن مرجع معرفی شد. نتایج آزمایش Omar *et al,* (2016)، با تحقیق حاضر مطابقت دارد، چراکه در تحقیق حاضر نیز ژن‌های مرجع *ACT11* و *ACT7* در ریشه و ژن *ACT11* در برگ، دارای پایداری قابل قبولی بودند.

جدول ۴- همبستگی بین ژن‌های مرجع براساس شاخص BestKeeper در برنج

Table 4- Correlation analysis of housekeeping genes based on BrstKeeper Index in Rice

		b-TUB	*25S rRNA*	*ACT7*	*eEF-1a*	*18S rRNA*	*ACT11*	*GAPDH*	*eIF-4a*	*UBQ5*	*UBQ10*
25S rRNA	Root	0.017	-								
	Shoot	-0.116	-								
ACT7	Root	0. 100	0.103	-							
	Shoot	-0.328	0.118	-							
eEF-1a	Root	0.003	-0.183	-0.008	-						
	Shoot	-0.208	-0.024	-0.016	-						
18S rRNA	Root	-0.012	0.075	0..0290	0.052	-					
	Shoot	-0.501	0.304	0.396	0.134	-					
ACT11	Root	-0.065	0.010	0.211	-0.061	0.408	-				
	Shoot	-0.251	0.216	0.107	-0.028	0.725	-				
GAPDH	Root	0.035	0.173	0.224	-0.096	0.271	0.755	-			
	Shoot	-0.186	-0.031	0.103	-0.052	0.405	0.748	-			
eIF-4a	Root	-0.149	0.326	0.432	0.045	0.495	0.624	0.648	-		
	Shoot	-0.454	0.115	0.303	0.176	0.694	0.583	0.720	-		
UBQ5	Root	-0.178	0.082	-0.006	0.403	-0.073	0.122	0.350	0.369	-	
	Shoot	-0.414	0.035	0.352	0.476	0.409	0.289	0.381	0.410	-	
UBQ10	Root	-0.116	0.147	0.373	0.055	0.498	0.789	0.544	0.869	0.179	-
	Shoot	-0.502	0.272	0.381	0.131	0.975	0.728	0.521	0.823	0.391	-
Bestkeeper	Root	0.031	0.438	0.458	0.230	0.596	0.694	0.696	0.885	0.383	0.818
	Shoot	-0.422	0.473	0.402	0.347	0.087	0.074	0.583	0.886	0.578	0.891
p-value	Root	0.882	0.032	0.024	0.279	0.002	0.001	0.001	0.001	0.064	0.001
	Shoot	0.081	0.047	0.098	0.158	0.001	0.001	0.011	0.001	0.012	0.001

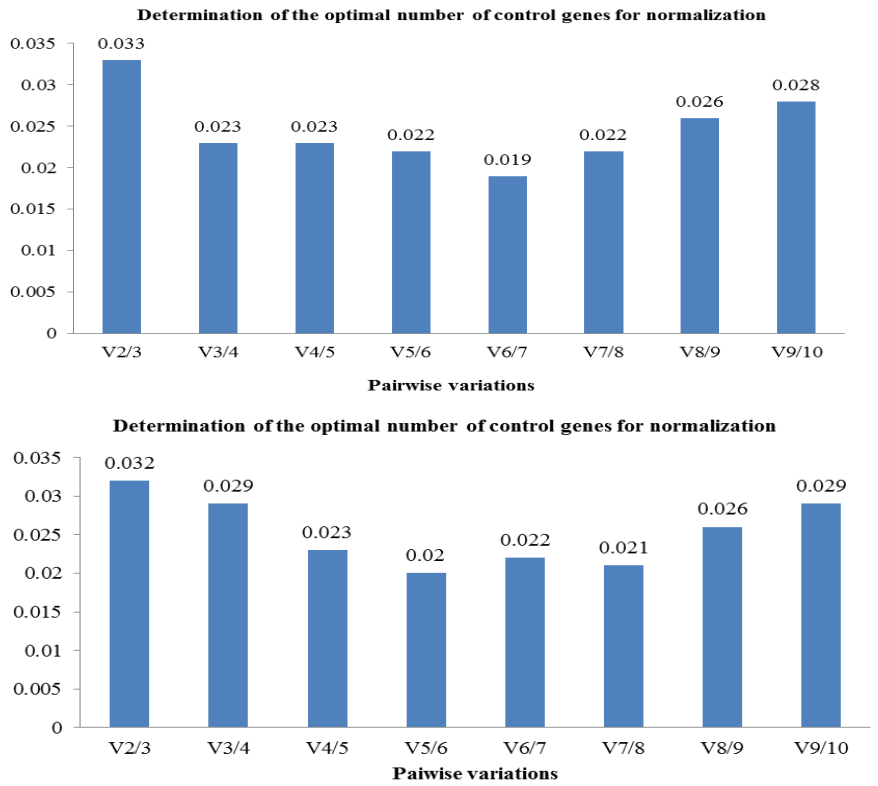


شکل ۲- مقادیر متوسط پایداری بیان (M) و رتبه‌بندی ژن‌های مرجع محاسبه شده توسط الگوریتم geNorm در بافت ریشه (نمودار بالا) و در برگ (نمودار پایین)

Figure 2- Average values (M) of expression stability and ranking of housekeeping genes analyzed by geNorm in root (above figure) and leaf (bottom figure)

به صورت کلی، استفاده از یک ژن مرجع به تنهایی قابل اعتماد نخواهد بود، چرا که بیان ژن‌های مرجع در بافت‌ها و شرایط رشدی مختلف یکسان نمی‌باشد. استفاده از دو یا تعداد بیشتری ژن مرجع پایدار ممکن است برای افزایش صحت نتایج، مورد نیاز باشد (Bevitori *et al.*, 2014). برای دستیابی به این هدف (یعنی تعیین تعداد بهینه ژن‌های مرجع مطلوب)، از شاخص NF (Normalization Factor) که توسط برنامه geNorm محاسبه می‌شود، استفاده شد. در این روش، از تنوعات جفتی ($V_{n/n+1}$) بین دو فاکتور نرمال‌ساز متوالی (NF_n /NF_{n+1}) که با پایدارترین ژن‌ها آغاز می‌شود، برای تعیین این‌که آیا اضافه کردن ژن‌های نرمال بعدی که دارای پایداری مناسبی هستند، نیاز است یا خیر، استفاده می‌شود. در حقیقت، این برنامه ابتدا پایدارترین ژن‌های مرجع بعد از ژن اول (یعنی ژن دوم و سوم) و سپس ژن‌های بعدی (ژن‌های سوم و چهارم) و الی آخر را آنالیز می‌کند و برای هر یک از جفت ژن‌های مذکور، شاخص مورد نظر را محاسبه می‌کند. Vandesompele *et al.* (2002) نشان دادند که میزان عددی ۰/۱۵، به عنوان نقطه برش تنوع جفتی مطلوب می‌باشد و استفاده از ژن‌های مرجع اضافی، درصورتی‌که میزان $V_{n/n+1}$ (V میزان عددی مربوط به تنوعات جفتی، n اولین ژن وارد شده به مدل و n+1 ژن جدیدی است که به منظور بررسی پایداری وارد مدل می‌شود) آن‌ها کمتر از این مقدار باشد، نیازی نیست. با توجه به این‌که استفاده از تنها یک ژن مرجع نمی‌تواند قابل اعتماد باشد، بنابراین در صورتی‌که V2/3<0.15 باشد، از یک جفت ژن و در صورتی‌که مقدار V2/3>0.15 باشد، به منظور دستیابی به نتیجه مطلوب، از ژن سوم نیز استفاده می‌شود. با توجه به شکل ۲، از آن جا که V2/3 (۰/۰۳۳) کمتر از ۰/۱۵ است، بنابراین استفاده از دو ژن مرجع، کافی و قابل اعتماد می‌باشد (شکل ۳). نکته قابل توجه این‌که انتخاب جفت‌های پایدار در این مورد، با توجه به نتایج مقادیر متوسط پایداری بیان

(M) صورت می‌گیرد. در نتیجه، برای ریشه می‌توان از ژن‌های مرجع *eIF-4a* و *ACT7* و برای برگ، از ژن‌های *GAPDH* و *ACT11* استفاده کرد.



شکل ۳- تعیین تعداد بهینه ژن‌های مرجع برای نرمال سازی در برنج. بالا: ریشه و پائین: برگ. حد آستانه ۰/۱۵ به عنوان معنی‌داری در نظر گرفته شد.

Figure 3- Determination the optimal number housekeeping genes for normalization in Rice. Using the cut-off value V=0.15 (above and below figure is related to root and leaf respectively).

نتیجه گیری کلی

تکنیک واکنش‌زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی، ابزاری سریع، ساده و قابل اعتماد برای تجزیه بیان ژن است. با این وجود، گزینش ژن‌های مرجع مناسب، یکی از عوامل اصلی مؤثر بر قابل اعتماد بودن نتایج qRT-PCR می‌باشد. تعیین یک ژن مرجع مناسب برای مطالعات بیان ژن، امکان‌پذیر نیست و در نتیجه، پایداری ژن‌های مرجع باید بر اساس نوع بافت و شرایط آزمایش تعیین شود. در مطالعه حاضر، ژن‌های *eIF-4a* و *ACT7* در ریشه و ژن‌های *GAPDH* و *ACT11* در برگ، به عنوان ژن‌های مرجع پایدار شناسایی شدند، چراکه ژن‌های مذکور در شرایط تنش شوری و نرمال، دارای پایداری بیان بودند. بدین معنی که ضریب تغییرات و دیگر شاخص‌های تعیین کننده پایداری در این ژن‌ها، در تمامی تیمارهای آزمایشی (زمان‌های صفر، شش، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار شوری)، دارای کمترین میزان بود. درحقیقت می‌توان از این ژن‌ها برای نرمال سازی داده‌های بیانی، در آزمایشات بررسی بیان ژن استفاده کرد. Xu *et al.* (2015)، Fang *et al.* (2015)، Gholamnezhad *et al.* (2016)، Esmaili *et al.* (2010)، Akbarzadeh *et al.* (2013) و Shakeri *et al.* (2015) نیز در تحقیقات خود نتیجه گرفتند که ژن *Actin* می‌تواند به‌عنوان ژن‌مرجع مناسب، در نرمال‌سازی داده بیان ژن، در مراحل تکاملی و محیط‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد. نتایج این تحقیق نیز نشان داد که ژن‌های *Actin* در بافت‌ها و شرایط مختلف (شوری و

نرمال) در برنج می‌توانند به عنوان ژن‌های مرجع پایدار، در نرمال سازی بیان ژن استفاده شوند. در ضمن، نتیجه حاصل از انتخاب جفت‌های پایدار، با توجه به مقادیر متوسط پایداری بیان (M) نشان داد که استفاده از دو ژن مرجع، کافی و قابل اعتماد می‌باشد و نیازی به کاربرد ژن سوم نمی‌باشد.

سپاسگزاری

از دانشگاه صنعتی شاهرود به خاطر تامین هزینه‌های این تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه در قالب طرح پژوهشی داخلی با شماره ۳۱۰۵۰ تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFRENCES

1. Akbarzadeh, A., Farahmand, H., Mahjoubi, F., Nematollahi, M. A., Haghben, K. & Kolangi Miandareh, H. (2013). Selection of suitable reference genes for real-time PCR studies of early developmental stages of sturgeons. *Journal of Aquatic Ecology*, 2 (3), 1-13. In farsi.
2. Bevitori, R., Oliveira, M. B., Grossi-de-Sá, M. F., Lanna, A. C., Da Silveira, R. D. & Petrofeza, S. (2014). Selection of optimized candidate reference genes for qRT-PCR normalization in rice (*Oryza sativa L.*) during Magnaporthe oryzae infection and drought. *Genetics and Molecular Research*, 13 (4), 9795-9805.
3. Bohnert, H. J., Ayoubi, P., Borchert, C., Bressan, R. A., Burnap, R. L., Cushman, J. C., Cushman, M. A., Deyholos, M., Fischer, R., Galbraith, D. W. & Hasegawa, P. M. (2001). A genomics approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(3-4), 295-311.
4. Cao, J., Wang, L. & Lan, H. (2016). Validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in *Suaeda aralocaspica*, an annual halophyte with heteromorphism and C4 pathway without Kranz anatomy. *The Journal of Life and Environmental Sciences*, 4, 1697.
5. Chinnusamy, V., Jagendorf, A. & Zhu, J. K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45, 437–448.
6. Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. & Scheible, W. R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139, 5–17.
7. Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G. & Zumla, A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 37,112-119.
8. Esmaili, R., Majidzadeh Ardabili, K. & Abdoli, N. (2010). Proper quantification of UPA in breast canser: Housekeeping selection. *Iranian Journal of Breast Disease*, 3, 7-15. In farsi.
9. Fang, P., Lu, R., Sun, F., Lan, Y., Shen, W., Du, L., Zhou, Y. & Zhou, T. (2015). Assessment of reference gene stability in Rice stripe virus and Rice black streaked dwarf virus infection rice by quantitative Real-time PCR. *Virology Journal*, 12 (175), 1-11.
10. Fedoroff, N. V., Battisti, D. S., Beachy, R. N., Cooper, P. J., Fischhoff, D. A., Hodges, C. N., Knauf, V. C., Lobell, D., Mazur, B. J., Molden, D., Reynolds, M. P., Ronald, P. C., Rosegrant, M. W., Sanchez, P. A., Vonshak, A. & Zhu, J. K. (2010). Radically rethinking agriculture for the 21st century. *Science*, pp, 833-834.
11. Garson, J., Grant, P., Ayliffe, U., Ferns, R. B. & Tedder, R. S. (2005). Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control. *Journal of virological methods*, 126 (1–2), 207-213.
12. Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi Goltapeh, E., Safaei, N. & Razavi, K. (2016). Evaluation of housekeeping gene expression of wheat interaction against Mycosphaerella graminicola with Reverse northern dot blot method. *Crop Biotechnology Journal*, 12, 1-10. In farsi.
13. Gutierrez, L., Mauriat, M., Pelloux, J., Bellini, C. & Van Wuytswinkel, O. (2008). Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *Plant Cell*, 20,1734–1735.
14. Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A. K. & Khurana, J. P. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 646–651.
15. Jian, B., Liu, B., Yurong, B., Wensheng, H., Cunxiang, W. & Tianfu, H. (2008). Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 9,59.
16. Jian-Feng, Sh., Jun-Min, L., Li-Ying, U. & Jian-Ping, Ch. (2014). Reference gene selection for real-time fluorescence quantitative PCR analysis in rice plants infected by Rice black-streaked dwarf virus or Rice stripe virus. *Acta Phytopathological Sinica*, 44 (3), 276-286.

17. Kim, B. R., Nam, H. Y., Kim, S. U., Kim, S. I. & Chang, Y. J. (2003). Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnol Letters*, 25 (21), 1869–1872.
18. Lee, P. D., Sladek, R., Greenwood, C. M. & Hudson, T. J. (2002). Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies, *Genome Research*, 12, 292–297.
19. Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environment*, 16, 15-24.
20. Narsai, R., Ivanova, A., Ng, S. & Whelan, J. (2010). Defining reference genes in *Oryza sativa* using organ, development, biotic and abiotic transcriptome datasets. *BMC Plant Biology*,10 (1), 56.
21. Omar, S. C., Bentley, M. A., Morieri, G., Preston, G. M. & Gurr, S. J. (2016). Validation of reference genes for robust qRT-PCR gene expression analysis in the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. *Plos One*, 11(8), e0160637.
22. Pettengill, A. E., Parmentier-Line, C. & Coleman, G. D. (2012). Evaluation of qPCR reference genes in two genotypes of Populus for use in photoperiod and low-temperature studies. *BMC Research Notes*, 5, 366.
23. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26, 509–515.
24. Ruiz-Carrasco, K., Antognoni, F., Coulibaly, A. K., Lizardi, S., Covarrubias, A., Martínez, E. A., Molina-Montenegro, M. A., Biondi, S. & Zurita-Silva, A. (2011). Variation in salinity tolerance of four lowland genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*.) as assessed by growth, physiological traits, and sodium transporter gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 1333-1341.
25. Shakeri1, S., Kazemitabar, S.K. & Hashemi, S. H. R. (2015). Study of Reference Genes in Sesame Leaves under Salt Stress by Real-Time PCR Method. *Crop Biotechnilogy Journal*, 8, 1-10. In farsi.
26. Suzuki, T., Higgins, P. J. & Crawford, D. R. (2000). Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, 29, 332–337.
27. Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R. & Thomas, G. (2003). Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa L*.) differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. *Plant Science*, 165(6), 1411-1418.
28. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, RESEARCH0034.
29. Xu, H., Bao, J. D., Dai, J. S., Li, Y. & Zhu, Y. (2015). Genome-Wide Identification of New Reference Genes for qRT-PCR Normalization under High Temperature Stress in Rice Endosperm. *Plos ONE*,10 (11), 1-13.
30. Zouari, N., Ben Saad, R., Legavre, T., Azaza, J., Sabau, X., Jaoua, M., Masmoudi, K. & Hassairi, A. (2007). Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. *Gene*, 404, 61–69.