

Study of Some Reference Genes Expression Stability in Rice Using Real-Time PCR Method Under Biotic Stress

Hamidreza Ghorbani

*Assistant Professor, Crop and Horticultural Science Research Department, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sari, Iran. Tel: +989112554246. Email: h.ghorbani@areeo.ac.ir

Seyyed Hamidreza Hashemi-petroudi

Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran. Email: shr.hashemi@sanru.ac.ir

Mehdi Rostami

Rice Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Amol, Iran. Email: mroostamid@gmail.com

Abstract

Objective

Gene expression studies by Real-Time PCR constitute a powerful tool to analyze the mechanisms underlying plant biotic-stress tolerance. One of the crucial steps of this technique is the selection and validation of reference genes to normalize target gene expression under different stress conditions. In this study, the expression of candidate gene in *oryza sativa* was investigated under biotic stress at different developmental stages.

Materials and methods

Eight internal control genes consists of *eIF-4A*, *UBQ5*, *UBC*, *Actin1*, *Actin11*, *GAPDH*, *Cyclophilin* and *18SrRNA* which are commonly used as housekeeping genes in plants, were selected and their expression stability were examined in present of *Rhizoctonia solani* RBL1 strain, potassium silicat as tolerance inducer and different growth stages in three time periods (6 h, 24 h and 72 h) using BestKeeper and NormFinder softwares.

Results and Conclusions

Based on the results gained through Best Keeper, the *UBC* has the higher expression than the other genes under biotic stress in rice leaf and also the *UBC* and *Actin11* genes poses the highest correlations with the BestKeeper index (0.97). Additionally, it was shown that the *UBC* and *Actin* has the lowest coefficient variation. Also, the evaluation of the reference genes expression using geometric mean of the *UBC* and *Actin11* compared to the *Actin1* gene indicated the necessity of appropriate selection of the reference gene. Taken together, it was evidently demonstrated that the *UBC* and *Actin11* genes are the proper reference gene to be employed for the normalization of expression data in the *Oryza sativa* L. using by Real-Time PCR.

Keywords: Gene expression, Inducer, Reference gene, Rice, *R. solani*.

Citation: Ghorbani HGh, Hashemi-petroudi SH, Rostami M (2019) Study of Some Reference Genes Expression Stability in Rice Using Real-Time PCR Method Under Biotic Stress. *Agricultural Biotechnology Journal* 11(3), 19-36.

Agricultural Biotechnology Journal 11(3), 19-36.

DOI: 10.22103/jab.2019.13158.1095

Received: April 8, 2019; Accepted: September 14, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بررسی پایداری بیان برخی ژن‌های مرجع به روش Real-Time PCR تحت تنش زیستی در

گیاه برنج

حمیدرضا قربانی

*نویسنده مسئول. استادیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران. تلفن: ۰۹۱۱۲۵۵۴۲۴۶، ایمیل: h.ghorbani@areeo.ac.ir

سید حمیدرضا هاشمی پطودی

استادیار گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. ایمیل: hashemi@sanru.ac.ir

مهرداد رستمی

مریی پژوهش معاونت مازندران، موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، آمل، ایران. ایمیل: mroostamid@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۱۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۳

چکیده

هدف: در پژوهش‌های بیان ژن با استفاده از Real-time PCR که ابزار قدرتمندی برای تجزیه و تحلیل سازوکارهای مقاومت به تنش‌های زیستی در گیاهان است، انتخاب و اعتبارسنجی ژن‌های مرجع به منظور بهینه کردن بیان ژن‌ها بسیار مهم می‌باشد. این تحقیق با هدف بررسی کارایی و انتخاب ژن‌های مرجع مناسب برای بهینه‌سازی اطلاعات حاصل از PCR زمان واقعی در گیاه برنج تحت تنش زیستی انجام شد.

مواد و روش‌ها: بدین منظور، هشت ژن کنترل داخلی شامل Cylophilin, UBC, Actin1, Actin11, eIF4A, UBQ5، GAPDH و 18SrRNA بررسی شد. تنش زیستی در بافت برگ گیاهچه‌های ۲۸ روزه رقم فجر و در حضور عامل بیماری قارچی *Rhizoctonia solani* RBL1، سیلیکات پتاسیم به‌عنوان القاء‌کننده مقاومت، جدایه‌های *Pseudomonas* با خاصیت آنتاگونیستی و القاء‌کنندگی و در سه دوره زمانی (۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت) اعمال شد.

نتایج: بررسی پایداری بیان ژن‌های مرجع با استفاده از نرم‌افزار BestKeeper نشان داد؛ که ژن UBC از پایداری بیان بیشتری نسبت به سایر ژن‌های مورد بررسی در شرایط تنش زیستی در نمونه بافت برگ گیاه برنج برخوردار بوده و بر اساس آماره توصیفی ژن‌های UBC و Actin11 دارای بیشترین همبستگی (۰/۹۷) با شاخص BestKeeper بودند. همچنین، ژن‌های UBC و

Actin11 دارای بیشترین پایداری (کمترین ضریب تغییرات) بودند. بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NormFinder نیز ژن‌های Actin11 و eIF4a (به ترتیب ۰/۳۵۶ و ۰/۵۶۷) بیشترین میزان پایداری را نشان دادند.

نتیجه گیری کلی: بررسی بیان ژن‌های مرجع با استفاده از میانگین هندسی ژن‌های UBC و Actin11 در مقایسه با ژن Actin1 نشان‌دهنده ضرورت انتخاب مناسب ژن مرجع می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ژن‌های UBC و Actin11 ژن‌های مرجع مناسبی برای بهینه‌سازی داده‌های بیان ژن به‌وسیله تجزیه و تحلیل Real-Time PCR در گیاه برنج می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: القاء‌کننده، برنج، بیان ژن، ژن مرجع، R. solani.

مقدمه

تنش‌های زیستی و غیرزیستی همیشه به‌عنوان تهدیدی اساسی و اصلی برای امنیت غذایی جهان محسوب می‌شوند (Fedoroff et al. 2010). فعالیت‌های مختلف سلول‌های موجودات با فعال شدن و غیرفعال شدن بیان ژن‌ها تنظیم می‌شود. تجزیه و تحلیل بیان ژن یک اصل جدایی‌ناپذیر از مطالعات ژنومیکس کاربردی در همه موجودات زنده به‌شمار می‌رود (Jain et al. 2006). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) یکی از روش‌های انتخابی برای تعیین اختصاصی نوع ژن‌های بیان شده در مواد گیاهی است (Martin & Rygielwicz 2005). جداسازی و ارزیابی محصولات تکثیر شده PCR در الکتروفورز، قابلیت تجزیه و تحلیل کمی نمونه‌های DNA را ندارد (McCartney et al. 2003). در میان روش‌های رایج مطالعات بیان ژن، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز زمان واقعی (Real-Time PCR) یکی از دقیق‌ترین روش‌ها برای ارزیابی تغییرات رونوشت ژن‌ها محسوب می‌گردد (Gutierrez et al. 2008). حساسیت، اختصاصی بودن و سادگی این روش در مقایسه با دیگر روش‌های بررسی بیان از قبیل نوردربلات و دورگ‌سازی در محل، ارزیابی حفاظتی RNase و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رونویسی معکوس نیمه کمی (RT-PCR) قابل مقایسه نیست (Bustin 2000). در مطالعات مربوط به تجزیه و تحلیل بیان ژن در سطح مطالعات رونوشتی، بهینه‌سازی نمونه‌های آزمایشی جهت حداقل‌سازی خطای نمونه‌برداری بسیار حایز اهمیت می‌باشد. چنین خطاهایی اصولاً طی مراحل مختلف آزمایش شامل مراحل نمونه‌برداری، استخراج RNA، ساخت cDNA و غیره ایجاد می‌شوند (Dheda et al. 2004). روش‌های مختلفی برای برآورد و رفع این خطاها پیشنهاد شده است. یکی از ساده‌ترین روش‌ها، بهینه‌سازی در سطح RNA بوده که خود نیاز به روش‌های کمی‌سنجی دقیق داشته و مراحل بعدی تجزیه و تحلیل؛ یعنی ساخت cDNA، کارایی PCR و غیره را در بر نمی‌گیرد. روش دیگر بهینه‌سازی استفاده از ژن‌های مرجع می‌باشد که امروزه بطور گسترده استفاده می‌شود. بطور کلی سطوح بیان ژن‌های مرجع در بین سلول‌های بافت‌های مختلف و تحت شرایط مختلف آزمایشی ثابت فرض می‌شود (Thellin et al. 1999) که در صورت نقض این فرض، بهینه‌سازی نمونه‌های آزمایشی تحت شعاع قرار می‌گیرد (Bustin 2000). از این گذشته در صورت تأثیرپذیری مستقیم این ژن‌ها نسبت به شرایط آزمایشگاهی و محیطی، فرایند بهینه‌سازی با چالش مواجه می‌گردد (Dheda et al. 2004).

2004). تحقیقات اخیر نشان داده است که هیچ ژن مرجع عمومی (با پایداری بیان بالا) برای همه بررسی‌های زیست‌شناسی وجود ندارد (Vandesompele et al. 2002). به‌طور کلی، انتخاب یک ژن مرجع ایده‌آل در دو مرحله انجام می‌شود؛ ابتدا ژن‌های مرجع مورد نظر شناسایی می‌شوند و سپس میزان پایداری بیان این ژن‌ها در نمونه‌های مورد نظر تعیین می‌گردد (Hashemi et al. 2016).

در سال‌های اخیر، پایداری بیان ژن‌های مرجع در برخی از گونه‌ها، بافت‌ها و شرایط مختلف بررسی و نشان داده شده که ژن مرجع در بافت‌های مختلف در یک ژنوتیپ و همچنین بافت یکسان در ژنوتیپ‌های مختلف، متفاوت است. این تغییر بیان ژن مرجع، ضرورت بررسی پایداری ژن مرجع در همه نمونه‌های مورد آزمایش را تأیید می‌کند (Mallona et al. 2010; Vashisth et al. 2011). مطالعات محدودی در این زمینه روی برخی گیاهان انجام شده است که از جمله می‌توان به گیاه جو (Burton et al. 2004)، برنج (Kim et al. 2003) و همچنین آرابیدوپسیس (Vandesompele et al. 2002) اشاره کرد. بررسی‌ها روی گیاه برنج نشان داده است که انتخاب ژن‌های مرجع نیازمند دقت بسیار بالایی می‌باشد؛ بخصوص زمانی که بیان آن ژن مرجع تحت شرایط مختلف محیطی و گونه‌های نزدیک به هم ثابت باشد. همچنین اثبات نمودند که ثابت بیان ژن در بافت ساقه و ریشه در ارقام مختلف برنج قابل تشخیص بوده و در این زمینه، ژن‌های *UBI5*، *GADPH* و *18SrRNA* به‌عنوان ژن مرجع مناسب پیشنهاد شده‌اند (Caldana et al. 2007). با توجه به اینکه تجزیه دقیق بیان ژن به‌منظور شناسایی سازوکارهای سازگاری به تنش زیستی امری ضروری است؛ هدف از این تحقیق، بررسی کارایی تعدادی از ژن‌های مرجع به‌منظور شناسایی و معرفی ژن‌های مرجع مناسب برای بهینه‌سازی اطلاعات حاصل از PCR زمان واقعی در شرایط نرمال و تنش زیستی در گیاه برنج می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از یک جدایه قارچ عامل بیماری *Rhizoctonia solani* RBL1 با گروه آناستوموزی AG1-IA و شماره دسترسی HM211085 از پایگاه مرکز اطلاعات ملی زیست فن‌آوری (NCBI)، با توان بالای بیماری‌زایی (بیماری سوختگی غلاف) در برنج جهت مایه‌زنی گیاهچه‌ها (Naeimi et al. 2010)، سیلیکات پتاسیم (غلظت ۲ میلی‌مولار) به‌عنوان القاء‌کننده شیمیایی مقاومت، یک جدایه از باکتری *Pseudomonas* دارای خاصیت آنتاگونیستی (۲۷۵) و یک جدایه دیگر از همین جنس با خاصیت القاء‌کنندگی (۲۴۳) استفاده شد. برای انجام این کار، ابتدا بذور رقم پرمحصول فجر (رقم حساس به قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف) ضدعفونی گردید و پس از شستشوی سطحی با آب مقطر استریل، به مدت ۲۴ ساعت در سوسپانسیون باکتری جدایه‌های *Pseudomona* قرار گرفتند. غلظت باکتری در سوسپانسیون 2×10^8 CFU/ml بود که در یک واحد چگالی نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و تعیین جمعیت شد. سپس بذور جوانه زده در گلدان‌های حاوی خاک استریل کاشته شده و گیاهچه‌های ۲۸ روزه برای مایه‌زنی با قارچ و سایر تیمارها مورد استفاده قرار گرفتند.

قارچ عامل بیماری به مدت ۳ روز در محیط کشت محتوی آنتی بیوتیک استرپتومایسین ۰/۱٪ سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA) و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد رشد نمود. سپس دیسک پنج میلی‌متری از قارچ به مرکز محیط کشت مذکور که در اطراف آن خلال‌هایی به اندازه یک سانتی‌متر به صورت مورب قرار داشت، کشت و پس از ۷۲ ساعت نگهداری در درجه حرارت ۲۷ درجه سانتی‌گراد، جهت تلقیح استفاده شد. مایه تلقیح، روی پنجه اصلی گیاهچه به تعداد ۳ عدد بین غلاف‌های اول، دوم و سوم گیاهچه، قرار گرفتند. تیمارهای آزمایش در شرایط گلخانه به شرح ذیل اعمال شدند (جدول ۱).

نمونه‌برداری از غلاف برگی گیاهچه‌ها در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری انجام شد. نمونه‌ها در هاون چینی محتوی ازت مایع خرد و بلافاصله به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. جهت انتخاب ژن کاندید و طراحی آغازگر از ژن‌های مرجع براساس داده‌های منتشر شده در پایگاه داده‌های NCBI برای گیاه برنج استفاده گردید. ژن‌های مورد نظر شامل *UBQ5*، *eIF4A*، *Actin11*، *Actin1*، *UBC*، *Cylophilin*، *18SrRNA* و *GAPDH* می‌باشند (جدول ۲). طراحی آغازگر با استفاده از سایت پرایمر ۳ و نرم افزار OLIGO (ورژن 1.1.2.19) برای تکثیر قسمتی از ژن واقع در منطقه حفاظت شده^۱ (CDS) آن انجام شد.

استخراج RNA از بافت برگ بر اساس روش ترایزول که حاوی گوانیدین ایزوسیانات^۲ است، انجام گردید (Chomczynski & Sacchi 1987). کیفیت و کمیت RNA استخراجی با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های RNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد و مقایسه آن با نشانگر وزنی استاندارد (۱ kb) نشان داد که RNAهای استخراج شده از نمونه‌های بافت برگ از کمیت و کیفیت مناسب جهت ساخت cDNA برخوردار هستند. برای حذف آلودگی DNA از RNase-free DNase I (Thermo Scientific) استفاده شد و ساخت رشته cDNA با استفاده از کیت شرکت Thermo scientific و طبق دستورالعمل آن انجام گرفت. نمونه cDNA ساخته شده برای انجام تمام واکنش‌ها به میزان ۹ برابر توسط آب دوبار تقطیر رقیق شد. مطالعه بیان ژن با استفاده از دستگاه C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) و کیت SYBR Green I PCR Master Mix (Termo Scientific, USA) در سه تکرار مستقل انجام گرفت. شرایط بهینه برای اجرای واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل SYBR Green به مقدار ۵ میکرولیتر، آغازگر رفت و برگشت ۰/۳ میکرولیتر، نمونه cDNA ۲ میکرولیتر و آب عاری از نوکلئاز ۲/۷ میکرولیتر فراهم گردید. چرخه دمایی برای تکثیر نمونه‌ها شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه بود که در ۴۰ چرخه تکرار شد.

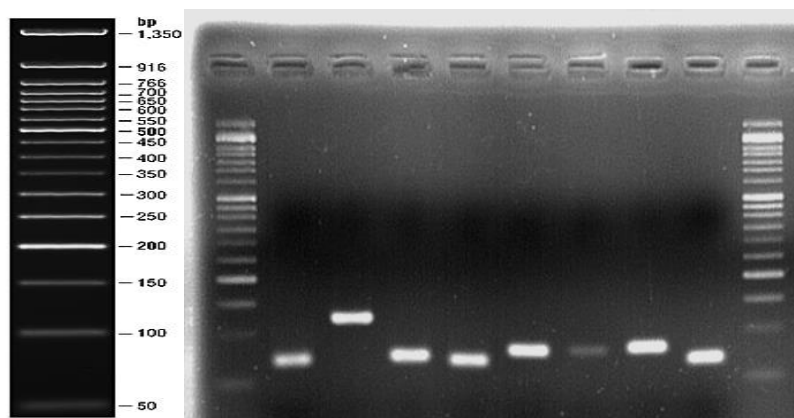
۱. Conserved domain sequence

۲. Guanidinium isothiocyanate

جدول ۱. تیمارهای اعمال شده در شرایط گلخانه روی گیاهچه‌های برنج.

Table 1. Applied treatments on Rice seedlings in greenhouse condition.

Code	تیمارها	Treatments
کد ۱۵	مایه‌زنی گیاهچه با قارچ عامل بیماری	باکتری آنتاگونیست به‌صورت تلقیح بذر و اسپری‌پاشی ۲۴ و ۴۸ ساعت قبل از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری و مایه‌زنی گیاهچه با قارچ عامل بیماری
Code 15	Seed inoculation with antagonist bacteria and spraying 24 and 48 hours before inoculation with pathogenic fungus and seedling inoculation with pathogenic fungus	
کد ۱۷	اسپری‌پاشی با ماده القاء‌کننده (سیلیکات پتاسیم) و مایه‌زنی گیاهچه با قارچ عامل بیماری	باکتری آنتاگونیست به‌صورت تلقیح بذر و اسپری‌پاشی ۲۴ و ۴۸ ساعت قبل از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری و اسپری‌پاشی با ماده القاء‌کننده (سیلیکات پتاسیم) و مایه‌زنی گیاهچه با قارچ عامل بیماری
Code 17	Seed inoculation with antagonist bacteria and spraying 24 and 48 hours before inoculation with pathogenic fungus and spraying with inducer (potassium silicate) and seedling inoculation with pathogenic fungus	
کد ۱۹	باکتری با قارچ عامل بیماری، دو و پنج روز قبل از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری	باکتری القاء‌کننده به‌صورت تلقیح بذر و اضافه نمودن سوسپانسیون باکتری پای بوته گیاه (بدون تماس مستقیم باکتری با قارچ عامل بیماری)، دو و پنج روز قبل از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری
Code 19	Seed inoculation with Inducer bacteria and soil drench with bacterial suspension (without direct contact with the pathogenic fungus), two and five days before inoculation with the pathogenic fungus	
کد ۲۱	(سیلیکات پتاسیم) و مایه‌زنی گیاهچه با قارچ عامل بیماری	باکتری القاء‌کننده به‌صورت تلقیح بذر و ریختن سوسپانسیون باکتری پای بوته گیاه (بدون تماس مستقیم باکتری با قارچ عامل بیماری)، دو و پنج روز قبل از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری و اسپری‌پاشی با ماده القاء‌کننده (سیلیکات پتاسیم) و مایه‌زنی گیاهچه با قارچ عامل بیماری
Code 21	Seed inoculation with inducer bacteria and soil drench with bacterial suspension (without direct contact with the pathogenic fungus), two and five days before inoculation with the pathogenic fungus and spraying with inducer (potassium silicate) and seedling inoculation with pathogenic fungus	
کد ۲۲	گیاهچه مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری	گیاهچه مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری
Code 22	Seedling inoculated with the pathogenic fungus	
کد ۲۴	عامل بیماری	اسپری‌پاشی با ماده القاء‌گر (سیلیکات پتاسیم) و مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری سه روز قبل از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری
Code 24	Spraying with inducer (potassium silicate) and inoculating with the pathogenic fungus	
کد ۲۶	گیاهچه بدون مایه‌زنی با باکتری/قارچ عامل بیماری/ماده القاء‌گر	Seedling non-inoculated with bacteria / pathogenic fungus / inducer
Code 26	Seedling non-inoculated with bacteria / pathogenic fungus / inducer	



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR با آغازگرهای دقیق Real-Time PCR روی ژل آگارز سه درصد با نشانگر مولکولی ۵۰ bp، از چپ به راست: lad-Actin11-Actin1-UBQ5-18SrRNA-UBC-eIF4a-GAPDH-Cyclophilin-lad.

Figure 1. Electrophoresis of PCR products with Real-Time PCR primers on a 3% agarose gel with 50 bp marker, left to right: ladder-Actin11-Actin1-UBQ5-18SrRNA-UBC-eIF4a-GAPDH-Cyclophilin-ladder.

پس از ساخت cDNA و تکثیر آن توسط Real-Time (با استفاده از آغازگرهای اختصاصی) الکتروفورز ژل آگارز سه درصد انجام پذیرفت تا از اختصاصی بودن تکثیر محصولات بدست آمده و عدم وجود آغازگر دوتایی^۱ اطمینان حاصل شود. به عبارت دیگر نتایج حاصله پس از طراحی صحیح آغازگرها و تکثیر اختصاصی ژن مورد نظر بود و هیچ باند اضافی دیده نشد (شکل ۱). تجزیه و تحلیل مرحله ذوب نشان دهنده وجود تنها یک پیک با دمای ذوب مشخص می باشد که در واقع تأییدی بر تک محصوله بودن آغازگرهای مورد استفاده می باشد.

تجزیه و تحلیل منحنی ذوب نمونه ها بررسی و از نرم افزارهای NormFinder (Andersen et al. 2004) و BestKeeper (Pfaffl et al. 2004) به منظور رتبه بندی پایداری و اندازه گیری بیان ژن پایدار در تمامی نمونه ها استفاده شد. در نرم افزار NormFinder مقادیر Ct حاصل از آزمایش، با استفاده از رابطه ΔCt و فرمول $2^{-\Delta Ct}$ به کمیت های نسبی تبدیل می شوند (Vandesompele et al. 2002) در حالی که در نرم افزار BestKeeper مقادیر Ct بدون تبدیل شدن به مقادیر بیان نسبی، مورد استفاده قرار می گیرند. در نهایت، میانگین هندسی میزان بیان ژن های مرجع انتخاب شده؛ به عنوان ژن کنترل داخلی در آزمایش در نظر گرفته شد و بیان ژن های مرجع نسبت به آن با استفاده از فرمول لیواک (Livak & Schmittgen 2001) در نرم افزار Microsoft Excel 2010 محاسبه شد.

۲. Primer dimer

جدول ۲. ژن‌های مرجع برای برنج و اطلاعات مربوط به آغازگرها.

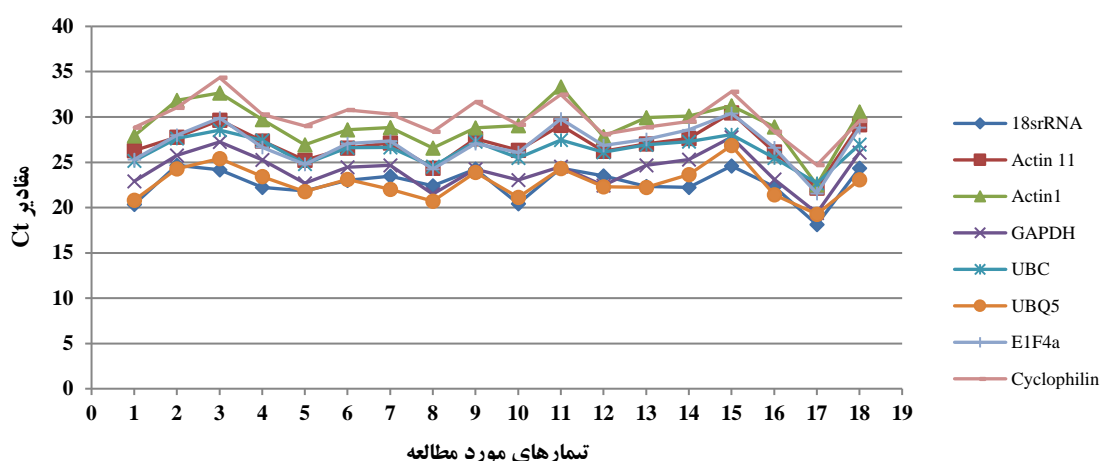
Table 2. Rice reference genes and the primer information.

طول قطعه (bp) Ampliqon	شماره دسترسی Accession number	توالی آغازگر 5'-Primer sequence-3'	ژن Gene	نام آغازگر Primer
110	Os03g50890	CTCCCCATGCTATCCTTCG TGAATGAGTAACCACGCTCCG	Actin1	Actin1
67	AK100267	CAGCCACACTGTCCCCATCTA AGCAAGGTCGAGACGAAGGA	Actin 11	Actin11
69	AK061988	ACCACTTCGACCGCCACTACT ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	Ubiquitin 5	UBQ5
79	AK064960	AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT	Glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
65	Os08g19610	CCACCATCACAGATCGGATCTT GCGGTCAGAGCGAAAGTAGCTA TTGTGCTGGATGAAGCTGATG	Cyclophilin Eukaryotic	Cyclophilin
76	AK073620	GGAAGGAGCTGGAAGATATCATAG A	initiation factor 4a	eIF-4a
65	AK059783	CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA ACACTTCACCGGACCATTCAA	18S ribosomal RNA	18S rRNA
76	AK059694	CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGTG	Ubiquitin- conjugating enzyme E2	UBC

نتایج و بحث

برای اینکه مطالعات بیان ژن درست و دقیق باشد، تهیه آغازگر اختصاصی، طول قطعه مناسب، شرایط بهینه واکنش PCR و انتخاب کنترل داخلی مناسب لازم می‌باشد. بسیاری از مطالعات مربوط به سازوکارهای دفاعی و تنش در گیاهان بر بیان ژن استوار می‌باشد. در این زمینه مطالعات رونوشت (ترانسکریپتوم) به ارائه درک بهتری از پاسخ‌های تنش گیاه کمک کرده‌اند (Nicot et al. 2005). بیان ژن، نیاز به سنجش هم‌زمان ژن یا ژن‌های مرجع دارد تا اطمینان حاصل شود که هر نوع تغییر در سیستم انتقال پیام ژن هدف بیانگر تغییر در میزان الگوی بیان می‌باشد و به تغییرات غلظت RNA نمونه‌ها مربوط نمی‌شود. بررسی نمونه‌های آزمایشی RNA و کنترل خطا بین نمونه‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد، چرا که تنوع بین نمونه‌ها ممکن است در مقدار و کیفیت مواد آغازین،

آماده‌سازی RNA، سنتز cDNA و رقیق‌سازی آن‌ها تفاوت ایجاد کند. در این تحقیق مقدار میانگین Ct مشاهده شده در ۱۷ تیمار مختلف مورد بررسی از ۱۸/۱۲ برای ژن 18SrRNA تا ۳۴/۳۴ برای ژن Cyclophilin متغیر بود. دو ژن UBQ5 و 18SrRNA به ترتیب با مقدار میانگین Ct برابر با ۱۸/۱۲ و ۱۹/۲۷ از میزان رونوشت بیشتری برخوردار بوده در حالی که دو ژن Actin1 و Cyclophilin به ترتیب با مقدار میانگین Ct برابر با ۳۳/۳۱ و ۳۴/۳۴ از میزان رونوشت کمتری نسبت به دیگر ژن‌های مرجع برخوردار بودند. روند تغییرات مقادیر Ct در محیط‌های مختلف و برای ژن‌های مورد مطالعه مشابه بود. کمترین میزان مقادیر Ct ژن‌های مرجع، در محیط شماره ۱۷ (ترکیب تیماری کد ۲۴ و زمان ۲۴ ساعت) و بالاترین مقادیر Ct در محیط شماره ۳ (ترکیب تیماری کد ۱۵ و زمان ۲۴ ساعت) مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲. مقادیر میانگین Ct مربوط به هشت ژن مرجع مورد مطالعه در ۱۸ تیمار مورد آزمایش.

Figure 2. Ct mean values for the eight candidate reference genes in the 18 treatments.

در نرم افزار BestKeeper مقادیر انحراف استاندارد و ضریب تغییرات برای هر ژن مرجع بر مبنای ارزش‌های Ct آن‌ها محاسبه شده (Pfaffl et al. 2004) و ژن‌های مرجعی که کمترین انحراف استاندارد و ضریب تغییرات را داشته باشند، بیان پایدارتری خواهند داشت (Chang et al. 2012). در این نرم‌افزار، شاخص BestKeeper بر اساس میانگین هندسی ژن‌های مرجع محاسبه شده و پایداری بیان ژن‌ها بر مبنای ضریب همبستگی با شاخص BestKeeper تعیین می‌شود (Pfaffl et al. 2004). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که ژن‌های UBC و 18SrRNA (به ترتیب با انحراف استاندارد ۱/۱۷ و ۱/۲۴) دارای بیشترین پایداری در میان ژن‌های مرجع هستند (جدول ۳).

جدول ۳. انحراف معیار و ضریب تغییرات بیان ژن‌های مرجع در گیاه برنج.

Table 3. Standard deviation and coefficient of variation of housekeeping genes in rice.

ژن								ژن
Cyclophilin	eIF4a	UBQ5	UBC	GAPDH	Actin1	Actin11	18SrRNA	Gene
24.69	21.57	19.27	22.68	19.41	22.49	22.16	18.12	حداقل Min.
34.34	30.40	26.84	28.54	27.77	33.31	30.46	24.66	حداکثر Max.
1.61	1.58	1.47	1.17	1.56	1.76	1.47	1.24	انحراف معیار ^۱ S.E.
5.39	5.84	6.44	4.42	6.47	6.04	5.24	5.90	ضریب تغییرات (درصد) ^۲ C.V.

۱. مقادیر عددی بیشتر نشان‌دهنده پایداری کمتر در بیان ژن است. ۲. مقادیر کمتر ضریب تغییرات دلالت بر تنوع کمتر دارد.

پایین بودن ضریب تغییرات دلالت بر پایداری بیشتر ژن‌های مرجع دارد. در مطالعه حاضر، ژن‌های UBC و Actin11 به ترتیب با ۴/۴۲ و ۵/۲۴ دارای کمترین ضریب تغییرات بودند. آماره توصیفی ارائه شده توسط نرم‌افزار BestKeeper ثبات ژن‌های مرجع را بر اساس مقادیر خام Ct رتبه‌بندی می‌کند. بر این اساس ژن‌های UBC، eIF4a و Actin11 دارای بیشترین همبستگی با شاخص BestKeeper (به میزان ۰/۹۷) می‌باشند (جدول ۴). در حالت مطلوب، شرایط انجام آزمایش نباید بیان ژن مرجع را تحت تأثیر قرار دهد. ژن مرجع باید به گونه‌ای انتخاب شود که کمترین میزان تغییرات بیان را در اندام‌های مختلف و شرایط تیماری متفاوت نشان دهد، در حالی که میزان بیان ژن‌های هدف با تغییر شرایط آزمایش، به میزان زیادی تغییر می‌کنند (Nicot et al. 2005; Qi et al. 2010). محققین دلایل و شواهدی ارائه کردند که روند بهینه‌سازی معمول بر اساس یک ژن مرجع منجر به بهینه‌سازی اشتباه شده (Vandesompele et al. 2002) و همچنین استفاده از چندین ژن مرجع (حداقل دو ژن) جهت مقایسه سطوح بیان ژن در مطالعات توصیه شده است (Theillin et al. 1999). از این‌رو، بر اساس نتایج حاصل از برنامه BestKeeper، ژن‌های UBC و Actin11 را می‌توان به‌عنوان ژن‌های مرجع قابل اعتماد برای بهینه‌سازی بیان ژن‌های هدف در گیاه برنج تحت تنش زیستی (بیماری سوختگی غلاف برگ) معرفی کرد.

جدول ۴. روابط همبستگی بین ژن‌های مرجع و شاخص BestKeeper در گیاه برنج.

Table 4. Correlation of reference genes and BestKeeper index in rice.

Reference genes	ژن‌های مرجع							
Cyclophilin	eIF4a	UBQ5	UBC	GAPDH	Actin1	Actin11	18SrRNA	
0.92	0.97	0.94	0.97	0.95	0.94	0.97	0.87	BestKeeper
0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	p-value

از آنجایی که الگوریتم‌های مختلفی برای تجزیه و تحلیل متوسط پایداری بیان در این تحقیق به کار گرفته شده است، بدیهی است که رتبه‌بندی ژن‌های مرجع در برخی موارد دارای تفاوت‌هایی باشد. دلیل اختلاف در رتبه‌بندی ژن‌های مرجع، استفاده از الگوریتم‌های مختلف آماری می‌باشد (Cao et al. 2016). در تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزار NormFinder، پایداری بیان ژن‌ها، با ارزشی به نام M بیان می‌شود. مقادیر عددی M کوچکتر، نشان‌دهنده پایداری بیشتر ژن‌های مرجع مورد مطالعه می‌باشند. در این تجزیه و تحلیل از روش مبتنی بر مدل‌های ریاضی برای یافتن ژن‌های با پایداری بیشتر استفاده می‌شود (Xu et al. 2015). در این مطالعه، ژن‌های Actin11 و eIF4a به ترتیب با ۰/۳۵۶ و ۰/۵۶۷ بیشترین میزان پایداری و ژن Cyclophilin با ۰/۹۲۶ کمترین میزان پایداری را نشان دادند (جدول ۵).

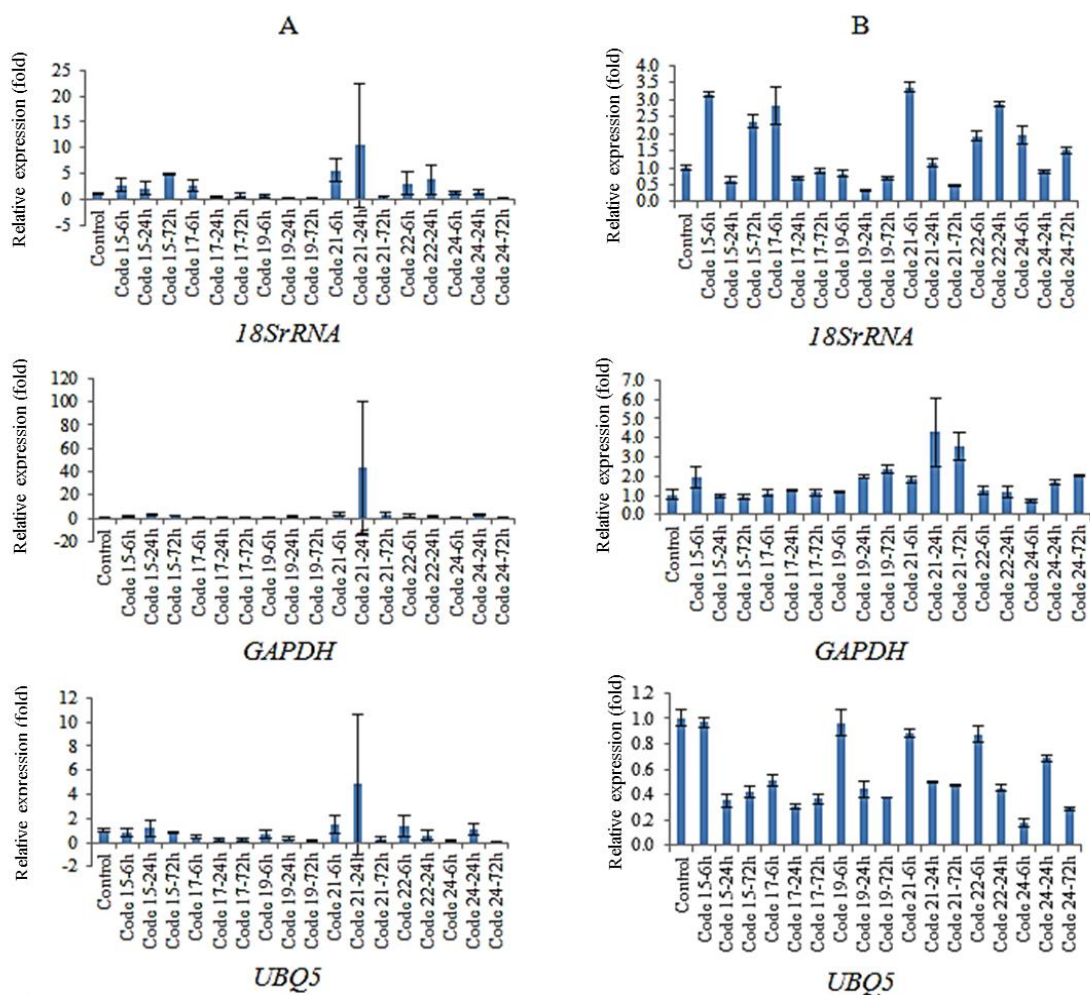
جدول ۵. مقادیر پایداری بیان و رتبه‌بندی ژن‌های مرجع با استفاده از نرم‌افزار NormFinder.

Table 5. Expression stability and ranking of reference genes analyzed by NormFinder software.

Cyclophilin	eIF4a	UBQ5	UBC	GAPDH	Actin1	Actin11	ژن Gene
0.926	0.567	0.713	0.659	0.612	1.019	0.356	مقدار پایداری
							Stability Value
6	2	5	3	4	7	1	رتبه Order

در بعضی موارد که انتخاب یک ژن مرجع به علت تفاوت در نتایج رتبه‌بندی نرم‌افزارها و یا تفاوت کم در شاخص‌های پایداری مشکل است، می‌توان بیش از یک ژن مرجع انتخاب نموده و داده‌های بیان ژن هدف را با استفاده از میانگین هندسی ژن‌های مرجع بهینه نمود (Vandesompele et al. 2002). یک بررسی نشان داده است که در مقالات چاپ شده با کاربرد روش کمیت‌سنجی نسبی توسط Real-time PCR، در بیش از ۹۰ درصد موارد تنها از یک ژن مرجع استفاده شده است و انتخاب ژن‌های مرجع مورد

نظر نیز بدون اعتبارسنجی آنها بوده است (Kozera & Rapacz 2013). این موضوع نشان می‌دهد که با وجود مزیت‌های ذکر شده برای کاربرد روش کمی‌سنجی نسبی در Real-time PCR، استفاده از ژن‌های مرجع ناپایدار ممکن است منجر به بروز اشتباهات زیادی در اندازه‌گیری ژن‌های هدف شود (Nicot et al. 2005; Kozera & Rapacz 2013). این نتایج به خوبی نشان می‌دهد که تنها با بررسی منابع نمی‌توان ژن مرجع مناسب را برای مطالعه مورد نظر انتخاب نمود و میزان پایداری آنها بایستی قبل از استفاده در کمی‌سنجی نسبی مورد ارزیابی قرار گیرد. در این تحقیق، مقایسه بیان ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از ژن Actin1 به‌عنوان ژن مرجع نامناسب و نیز میانگین هندسی ژن‌های UBC و Actin11 به‌عنوان ژن مرجع مناسب با پایداری بالا (شکل ۳) به وضوح نشان‌دهنده اثر انتخاب ژن مرجع مناسب در آزمایش‌های بیان ژن می‌باشد. با انتخاب ژن Actin1 به‌عنوان ژن مرجع، نه تنها شاهد پراکندگی زیاد و انحراف بالای میزان بیان در بین تیمارهای مختلف می‌باشیم، بلکه مقادیر بیان نیز در هر ترکیب تیماری با توجه به میزان انحراف معیار آن ترکیب تیماری از درجه اعتبار پایینی برخوردار می‌باشند. مطالعه بیان ژن با استفاده از Real-time PCR به‌عنوان یک روش استاندارد دارای کاربردهای فراوانی در زمینه تأیید اطلاعات ریزآرایه کل ژنوم یا مجموعه کوچکتی از ژن‌ها و تشخیص‌های مولکولی است. تا کنون ژن‌های مرجع زیادی مثل ACT، GAPDH، 18SrRNA، 25SrRNA، UBC، UBQ، EF1A و TUB معرفی شده‌اند که در بررسی بیان ژن‌ها در شرایط گوناگون از جمله تنش‌های زیستی و غیرزیستی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Sinha et al. 2015). انتخاب ژن مرجع مناسب در افزایش دقت اطلاعات حاصل و کنترل خطا بین نمونه‌ها، دارای نقش بسزایی می‌باشد. اگرچه ژن کنترل داخلی ایده‌آل، باید سطح بیان ثابتی در تمام شرایط آزمایش داشته باشد، با این حال، هیچ ژنی وجود ندارد که در تمام شرایط بیان بسیار ثابت داشته باشد. پژوهش‌ها نشان داده است که سطح رونوشت ژن‌های مرجع نیز ممکن است به‌طور قابل ملاحظه‌ای تحت برخی شرایط مختلف آزمایشی مانند تنش‌ها و یا مراحل مختلف نمو گیاه تغییر می‌کند (Paolacci et al. 2009). اثر تنش‌های مختلف غیرزیستی در عدم پایداری ژن‌های مرجع TUBULIN1 و 18SrRNA در گیاه چای (Ma et al. 2016)، GAPDH در گیاه هویج (Tian et al. 2015)، ELF1a در گیاه نخود (Reddy et al. 2016)، b-tubulin و 18SrRNA در گیاه سیب زمینی (Nicot et al. 2005) نشان داده شد. بررسی منابع نشان می‌دهد که بیان برخی از ژن‌های مرجع در گندم نیز در مرحله پر شدن دانه (Wu et al. 2015)، بیماری‌های زنگ و کوتولگی گندم (Li et al. 2014; Scholtz & Visser 2013) و تنش دمایی در مراحل نمو گندم (Paolacci et al. 2009) تغییر می‌کنند. در این بررسی نیز بر روی نمونه‌های برگ گیاه برنج و تحت شرایط مختلف آزمایشی، بیان متفاوتی از ژن‌های مرجع مشاهده شد. نتایج نشان داد که ژن‌های UBC و Actin11 در برگ برنج دارای بیشترین پایداری بوده و می‌توان از این ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های مرجع در گیاه برنج به‌منظور بهینه‌سازی داده‌های بیانی استفاده کرد. از طرفی دیگر بر اساس الگوریتم‌های مورد مطالعه در این تحقیق، ژن Actin1 دارای کمترین پایداری بوده و جهت مطالعات بیان ژن تحت تنش زیستی در گیاه برنج پیشنهاد نمی‌شود.



شکل ۳. مقایسه بیان ژن‌های مرجع: ستون (A) با استفاده از ژن *Actin1*. ستون (B) با استفاده از میانگین هندسی ژن‌های *Actin11* و *UBC*.

Figure 3. Comparison of reference genes expression: A column) Using *Actin1*. B column) using geometric mean of *Actin11* and *UBC*.

References

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64, 5245-5250.

- Burton RA, Shirley NJ, King BJ et al. (2004) The Cesa gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. *Plant Physiol* 134, 224-236.
- Bustin SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-93.
- Caldana C, Scheible W, Mueller-Roeber B, Ruzicic S (2007) A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. *Plant Methods* 3, 7.
- 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. *Peer J* 4, 16-97.
- Chang EM, Shi SQ, Liu JF et al. (2012) Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) using real-time PCR. *Plos One* 7(3): e33278.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Signal-Step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA et al. (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 37, 112-114.
- Fedoroff NV, Battisti DS, Beachy RN et al. (2010) Radically rethinking agriculture for the 21st century. *Science* 327, 833-834.
- Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J et al. (2008) Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *Plant Cell* 20, 17-34.
- Hashemi SHR, Nematzadeh GA, Ahmadian GR et al. (2016) Identification and validation of *Aeluropus litoralis* reference genes for quantitative real-time PCR normalization. *J Biol Res-Thessalon* 23, 18.
- Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 646-651.
- Kim BR, Nam HY, Kim SU et al. (2003) Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnol Lett* 25, 1869-1872.
- Kozera B, Rapacz M (2013) Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 54, 391-406.
- Li Y, Chen W, Wang Q et al. (2014) Assessment of reference genes for quantitative realtime PCR gene expression normalization in periwinkle during wheat blue dwarf phytoplasma infection. *Australas Plant Pathol* 43, 477-485.

- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods* 25, 402-408.
- Ma QP, Hao S, Chen X, Li XH (2016) Validation of reliability for reference genes under various abiotic stresses in tea plant. *Russ J Plant Physiol* 63, 423-432.
- Mallona I, Lischewski S, Weiss J et al. (2010) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biol* 10, 4.
- Martin KJ, Rygielwicz PT (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol* 5, 28.
- McCartney HA, Foster SJ, Fraaije BA, Ward E (2003) Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manag Sci* 59, 129-42.
- Naeimi Sh, Okhovvat SM, Javan-nikkhah M, Vagvolgyi C, Khosravi V, Kredics L (2010) Biological control of *Rhizoctonia solani* AG1-1A, the causal agent of rice sheath blight with *Trichoderma* strains. *Phytopathol Mediterr* 49, 287-300.
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot* 56, 2907-2914.
- Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Mol Biol* 10, 11.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26, 509-515.
- Qi J, Yu S, Zhang F et al. (2010) Reference gene selection for real-time quantitative polymerase chain reaction of mRNA transcript levels in chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Mol Biol Rep* 28, 597-604.
- Reddy DS, Bhatnagar-Mathur P, Reddy PS et al. (2016) Identification and validation of reference genes and their impact on normalized gene expression studies across cultivated and wild cicer species. *Plos One* 11: 2. DOI: 10.1371/journal.pone.0148451.
- Scholtz JJ, Visser B (2013) Reference gene selection for qPCR gene expression analysis of rust-infected wheat. *Physiol Mol Plant Pathol* 81, 22-25.
- Sinha P, Saxena RK, Singh VK et al. (2015) Selection and validation of housekeeping genes as reference for gene expression studies in pigeonpea (*Cajanus cajan*) under heat and salt stress conditions. *Front Plant Sci* 6, 1071.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B et al. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75, 291-295.

- Tian C, Jiang Q, Wang F et al. (2015) Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves. *Plos One* 10: 2.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, 7.
- Vashisth T, Johnson LK, Malladi A (2011) An efficient RNA isolation procedure and identification of reference genes for normalization of gene expression in blueberry. *Plant Cell Rep* 30, 2167-2176.
- Wu D, Dong J, Yao YJ et al. (2015) Identification and evaluation of endogenous control genes for use in quantitative RT-PCR during wheat (*Triticum aestivum* L.) grain filling. *Genet Mol Res* 14, 10530-10542.
- Xu H, Bao JD, Dai JS et al. (2015) Genome-wide identification of new reference genes for qRT-PCR normalization under high temperature stress in rice endosperm. *Plos One* 10: 11.

