Archive of SID

تعیین ژن‌های خانه‌دار مناسب برای مطالعه تغییر بیان ژن‌ها به روش Real- Time PCR در گیاه حرا (*Avicennia marina*) تحت تیمار نفتی

بابک مرادی[۱]، حسن زارع مایوان*[۱]، منا صراحی نوبر[۲]، مهری سیدهشترودی[۲]

۱. گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. گروه علوم زیستی دریا، پژوهشکده علوم دریایی، پژوهشگاه ملی اقیانوس‌شناسی و علوم جوی، تهران، ایران

شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22113/jmst.2017.50082

چکیده

مطالعه بیان ژن‌ها می‌تواند اطلاعات مهمی از سازوکارها و راهبردهای فیزیولوژیکی که توسط گیاهان در شرایط تنشی رخ می‌دهد را روشن نماید. انتخاب ژن‌های کنترل داخلی مناسب برای تعیین سطوح بیان ژن‌ها بسیار مهم و ضروری است. تاکنون برای گیاه مانگرو *Avicennia marina* مطالعه ای در ارتباط با معرفی ژن‌های مرجع مناسب برای نرمال سازی داده‌های RT-qPCR گزارش نشده است. در این مطالعه پایداری بیان چهار ژن مرجع اکتین ۲ (ACT2)، زیرواحد A3 سرین/ترئونین فسفاتاز 2A(PP2AA3)، TIP-Like، پلی یوبی کوئیتین ۱۰ (UBQ)، در برگ و ریشه گیاه حرا در غلظت های مختف نفت مورد بررسی قرار گرفت. سه نرم افزار (Best Keeper، NormFinder و gNorm) برای آنالیز رتبه بندی ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که ژن ACT یک ژن مرجع مناسب برای گیاه حرا تحت تیمار نفتی است اما استفاده از دو یا سه ژن برای دست یافتن به دقت بالاتر پیشنهاد شد. شناسایی ژن‌های مرجع در نمونه‌های بیشتر و تحت شرایط تنشی متنوع تر در آزمایش‌های آتی به ویژه در تنش‌های مشابه پیشنهاد شده است.

کلید واژه‌ها: مانگروها؛ *Avicennia marina*؛ Real-Time Quantitative PCR؛ ژن های مرجع، نرمال سازی، آلودگی نفتی

www.SID.ir

Archive of SID

۱. مقدمه

جنگل‌های مانگرو درسواحل خلیج فارس و دریای عمان در سه استان هرمزگان، بوشهر و سیستان و بلوچستان قرار دارد. در ایران این جنگل ها به دو گونه حرا (*Avicennia marina*) و چندل (*Rhizophora mucroanata*) محدود می‌شوند که در آن‌ها حرا به عنوان گونه غالب در همه زیست‌گاه‌های جنوبی ایران مستقر شده است (Rashvand and Sadeghi 2014). بوم‌سازگان‌های مانگرویی به عنوان منبع حفظ تنوع زیستی و پناهگاه و محل تغذیه و پایگاه بسیاری ازگیاهان و جانوران عمل می‌کنند(van Bochove, Sullivan et al. 2014). به‌دلیل وجود آلودگی های متعدد از جمله وجود آلاینده های نفتی (Ebrahimi-Sirizi and Riyahi-Bakhtiyari 2013). توجه به اثرات این نوع آلودگی‌ها برگیاهان حرا و نیز پتانسیل ژنتیکی این گیاهان در پاسخ به آلودگی‌های نفتی و سایر آلاینده های با منشا انسانی ضرورتی است که می‌تواند چشم‌انداز مدیریت آلودگی‌ها و روش‌های ارتقای مقاومت گیاهان این بوم‌سامانه‌ها را بهبود بخشد. استفاده از تکنیک های ژنتیک مولکولی در شناخت پاسخ های ژنتیکی این گیاهان روند رو به رشدی به خود گرفته است.در این میان آنالیز بیان ژن در زمینه های مختلف تحقیقات زیست شناسی به صورت روز افزون به کار گرفته می‌شود. شناسایی الگوی بیان ژن‌ها می تواند اطلاعاتی در زمینه شبکه تنظیمی و ژن‌های مرتبط با فرایندهای مختلف زیستی را فراهم آورد. دو روش اصلی اندازه گیری فراوانی رونوشت (ترانسکریپت) های ژن‌ها که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل آنالیز میکروواری و Real Time RT-PCR می‌باشد. میکروواری امکان آنالیز همزمان هزاران ژن را در تعداد کم نمونه فراهم می آورد(Schena, Shalon et al. 1995)، در حالیکه با استفاده از تکنیک Real Time RT-PCR می توان به طور همزمان مقادیر بیان تعداد محدودتری ژن را در چندین نمونه مورد ارزیابی قرار داد (Heid, Stevens et Higuchi, Fockler et al. 1993 , al. 1996). تکنیکRT-qPCR روشی مناسب برای تعیین کمّیت و میزان بیان ژن‌ها بوده که نتایج آن از صحت و دقت بالاتری نسبت به روش‌های پیشین برخوردار است. از مزیت‌های این تکنیک می‌توان به حساسیت و کـمّیت‌سنجی دقیق آن نسبت به سایر روش ها اشاره کرد.

در مطالعات مربوط به اندازه‌گیری بیان ژن‌ها، چندین متغیر مانند مقدار ماده اولیه، کارایی آنزیم ها، تفاوت فعالیت رونویسیایی بین بافت‌ها یا سلول‌ها باید تحت کنترل قرار گیرد. در این مطالعات، نرمال‌سازی نمونه‌های آزمایشی جهت کاهش خطای نمونه‌برداری بسیار با اهمیت می‌باشد (Kozera and Rapacz, 2013). هدف از نرمال سازی تصحیح خطاهای ناشی از مراحل مختلف آزمایش می باشد.

امروزه از ژن‌های کنترل داخلی– که غالبا به آنها ژن خانه‌دار اطلاق می شود- برای نرمال کردن فراکشن mRNA استفاده می‌شود. در واقع در روش RT-qPCR میزان بیان ژن هدف با استفاده از یک ژن رفرنس داخلی نرمال می‌شود؛ بر این اساس فرض می‌شود که بطور کلی سطح بیان ژن رفرنس در بین سلول‌های بافت های مختلف و تحت شرایط مختلف آزمایشی ثابت است (Thellin, Zorzi et al. 1999). اما در صورتی که این فرض درست نباشد یعنی بیان ژن رفرنس داخلی در بافت‌های مختلف متغیر و یا تحت تاثیر تیمار قرار گیرد، نرمال‌سازی نمونه‌های آزمایشی تحت شعاع قرار گرفته و ممکن است از داده ها نتایج و نتیجه گیری اشتباه گرفته شود (Kozera and Rapacz, 2013). تاکنون ژن‌های زیادی به عنوان ژن کنترل داخلی گزارش شده‌اند. اما آزمایش‌ها نشان داده‌اند که بیان ژن‌های خانه‌دار هر چند ممکن است در شرایطی ثابت به نظر برسند؛ اما در شرایط دیگری می‌توانند به شدت

www.SID.ir

Archive of SID

تغییر بیان نشان دهند (Thellin, Zorzi et al. 1999, Suzuki, Higgins et al. 2000). به علاوه یک ژن مرجع با بیان ثابت در یک ارگانیسم، ممکن است برای نرمال سازی بیان ژن در جاندار دیگری مناسب نباشد. بنابراین انتخاب ژن رفرنس مناسب جهت انجام آزمون‌های qRT-PCR از اهمیت به‌سزایی برخوردار است.

با توجه به اینکه در سال های اخیر بررسی بیان ژن‌ها در پاسخ به آلاینده های مختلف مورد توجه ویژه ای قرار گرفته است و اکوسیستم های حرا به عنوان یکی از اکوسیستم های حساس در نوار ساحلی کشور در معرض آلاینده های مختلف بویژه آلاینده‌های نفتی قرار دارند؛ مطالعه حاضر در صدد بررسی تغییرات بیان چهار ژن رفرنس داخلی به منظور انتخاب ژن های مرجع مناسب برای نرمال کردن داده های بیان ژن در گیاه حرا در طی دوره رشد و تحت تنش نفتی در دو اندام برگ و ریشه می باشد.

۲. مواد و روش ها

نفت خام از پالایشگاه نفت تهران با ویژگی های (محتوای سولفور w/w% ۱/۲۱، نیتروژن کل w/w% ۰/۲، آسفالت w/w% ۰/۵۵، محتوای واکس w/w% ۷/۳، کربن باقیمانده w/w% ۳/۶۴، سولفید هیدروژن ۱mg/l>، نیکل µg/g ۸/۳، وانادیوم ۲۸µg/g، آهن µg/g ۵/۴، سرب ۱µg/g>، سدیم ۲۷µg/g و محتوای آب ۰/۰۰۵>) تهیه شد. نفت خام به میزان ۲,۵، ۵ ، ۷,۵ و ۱۰ درصد با خاک مخلوط گردید. نفت خام با ۵۰۰ گرم خاک در تیمارهای نفتی ترکیب شد و به مدت دو هفته قبل از کاشت گیاه جهت تبادل کاتیونی در محیط گلخانه نگهداری شد.

بذرهای گیاه حرا از اکوسیستم حرای منطقه خور تاسبر واقع در استان هرمزگان تهیه شد. بذرها توسط هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه و الکل ۵۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه استریل شدند. سپس جداره خارجی بذرها جدا شد و به گلدان‌های ۵۰۰ میلی لیتری پلاسنیکی حاوی خاک آلوده/شاهد منتقل شدند به طوری که تعداد ۲ بذر در هرگلدان به فواصل مساوی قرار گرفت. این پژوهش در طرح کاملاً تصادفی با درصدهای نفتی ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰٪ (w/w) انجام گرفت و رشد گیاهان در گلخانه تحت رژیم دمایی ۲۵ و ۱۸ (روز و شب)، رطوبت ٪۲۱-۱۵ انجام پذیرفت. آبیاری گیاهان به صورت دو روز یک بار و با آب شهری انجام شد.

برگ‌ها و ریشه‌های گیاهان در دوره های زمانی ۲ و ۴ ماه بعد از کشت نمونه برداری شدند و بلافاصله پس از نمونه‌برداری ضمن شستشوی سریع با آب دیونیزه در دمای ۸۰- سانتی‌گراد فریز شدند. استخراج RNA از نمونه های برگ و ریشه با استفاده از کیت سیگما انجام گرفت. برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه 2100 Bioanalyzer (ساخت شرکت Agilent) استفاده شد.

روش ساخت cDNA بر اساس دستورالعمل کیت سیگما انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده استفاده از تکنولوژی رنگ Sybr Green 1 انجام شد. جهت انجام Real-Time PCR از چرخه حرارتی ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس ، ۴۰ سیکل شامل ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد ، ۱ دقیقه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید (Roche).

جهت انتخاب ژن‌های مرجع مناسب و همچنین طراحی پرایمر از داده‌های منتشر شده در سایت NCBI استفاده شد. ژن‌های مورد مطالعه شامل ژن های *ACT*، *UBQ*، *PP2AA3* و *TIP* بودند (جدول ۱). به‌منظور طراحی پرایمر برای تکثیر چهار ژن مورد نظر ابتدا توالی های این ژن‌ها از سایت NCBI استخراج گردید و سپس طراحی پرایمر صورت پذیرفت. برای تعیین کارایی پرایمر از نرم افزار LinRegPCR (Ramakers, Ruijter

www.SID.ir

Archive of SID

et al. 2003, Ruijter, Ramakers et al. 2009) استفاده شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش

ژن‌های کنترل داخلی	محصول	Forward primers(5'- 3')	Reverse primers (5'- 3')
ACT2	Actin 2	GTGTGATGTGGATATCAGGAAGG	CCTTAATCTTCATGCTGCTT
PP2AA3	Serine/threonine-protein phosphatase 2A subunit A3	GCAAATTCTACCCTGTGTAAAGG	CTCAATTGTTGCATCCTTCC
TIP41-like		AGATGAGTTGGCTGACAATGG	ACTCCATCAACTCTGAGCCAG
UBQ10	polyubiquitin 10	GCAAGACCATCACTCTCGA	GCTTTCCAGCGAAGATCAGC

بیان پایدار ژن های رفرنس به وسیله qRT-PCR با استفاده از اندازه گیری بیان ژن پایدار (M) در نرم افزار geNORM محاسبه می شود.

تعیین ثبات ژن مرجع با متوسط تغییرات Pair-wise (v) در نظر گرفته می شود که ژن در مقایسه با همه ژن های مرجع تست می شود. ژن ها باید حداقل مقدار M را داشته باشند که در نتیجه بیان پایدارتری دارند.

۳. نتایج

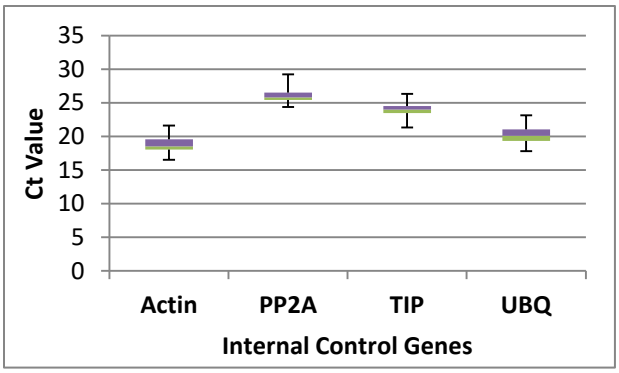
نتایج حاصل از بررسی با دستگاه بیوآنالایزر نشان داد که RNA های استخراج شده از نمونه های برگ و ریشه از کیفیت و کمیت مناسب جهت ساخت cDNA برخوردار بودند (شکل ۱). به طوری که عدد یکپارچگی RNA نمونه‌ها (RIN) بالای ۸ بود. آنالیز مرحله ذوب نشان دهنده وجود تنها یک پیک با دمای ذوب مشخص می باشد که در واقع تائیدی بر تک محصول بودن پرایمرهای مورد استفاده می باشد.

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود؛ هیچ نوع پیک اضافی حاکی از تکثیر غیر اختصاصی ژن دیده نمی شود. هیچ گونه سیگنالی در کنترل‌های منفی واکنش شامل نمونه‌های فاقد cDNA و نمونه های cDNA فاقد آنزیم Reverse Transcriptase مشاهده نشد. عدم مشاهده سیگنال برای نمونه‌های cDNA فاقد آنزیم Reverse Transcriptase نشان‌دهنده عدم وجود آلودگی DNA در نمونه‌ها بود. همچنین عدم مشاهده سیگنال برای نمونه‌های فاقد cDNA این اطمینان را حاصل کرد که هیچ گونه آلودگی خارجی در نمونه ها در حین انجام آزمایش ها وجود نداشت(شکل ۲). میزان بازده واکنش PCR برای ژن‌های رفرنس *ACT*، *PP2A*، *TIP* و *UBQ* به ترتیب ۱,۹۶، ۱,۸۶، ۱,۹۱و ۱,۸۷ بود. شکل ۳ میانگین شدت بیان ژن‌های کاندید رفرنس در تمام تیمارهای مختلف در دو دوره زمانی را بر اساس میانه و انحراف معیار مقادیر CT نشان می دهد. همانطور که مشاهده می‌شود؛ بیان ژن *TIP* از کمترین میزان تغییرات برخوردار بود. در حالی که میزان تغییرات در بیان ژن *UBQ* بسیار محرز و قابل ملاحظه بود. میانگین مقادیر CT برای ژن‌های *ACT*، *PP2A*، *TIP* و *UBQ* به ترتیب ۱۸,۷۳، ۲۶,۰۳، ۲۳,۹۹ و ۲۰,۱۴ بود. شکل ۴ مقایسه میزان بیان ژن های کاندید و رفرنس در تیمارهای مختلف، الگوی تقریبا مشابهی را برای تمام ۴ ژن رفرنس مورد مطالعه نشان می دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

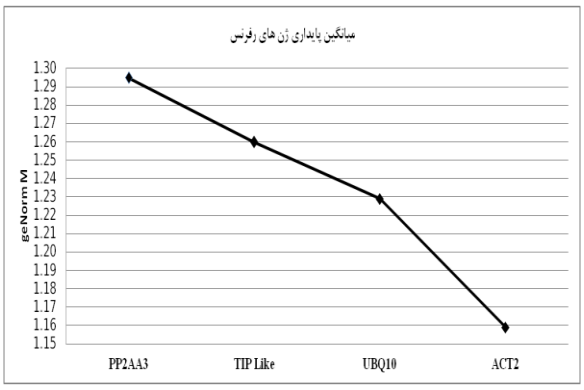
بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین همبستگی با شاخص Best keeper در ژن‌های *ACT* (r=0.84, P= 0.001) و UBQ (r= 0.75, P= 0.001) مشاهده شد. بنابراین نرم افزار Best keeper این دو ژن را به عنوان قابل اعتمادترین ژن‌های رفرنس برای نرمال‌سازی داده های بیان ژن هدف در تیمارهای مختلف شناسایی کرد (جدول ۲).



شکل ۳- Box Plot الگوی کلی میزان بیان ژن های کاندید رفرنس در گیاه حرا تحت تیمار نفتی. برای هر ژن رفرنس مبانه، چارک (۲۵ درصد) اول و چهارم، بیشینه و کمینه بیان در محور عمودی مشخص شده است.

بر اساس محاسبات انجام شده توسط نرم افزار Norm finder ژن *ACT* با عدد ثبات بیان ژن ۰/۶۴ به عنوان با ثبات‌ترین ژن رفرنس شناخته شده و به دنبال آن ژن *PP2A* با عدد ثبات بیان ژن 0.76 در جایگاه دوم قرار داشت. (جدول ۳). براساس نتایج Norm finder بهترین حالت استفاده از ترکیب دو ژن *ACT* و *PP2A* با عدد ثبات ۰/۳۹ می باشد.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل های نرم افزار geNorm نشان داد که ژن *ACT* از بیشترین ثبات بیان ژن برخوردار بود و پس از آن *UBQ*، *TIP* و *PP2A* از بیشترین ثبات برخوردار بودند. پیشنهاد نرم‌افزار geNorm استفاده از ترکیب سه ژن *ACT2, PP2A* و *UBQ* برای بررسی بیان ژن‌ها بود (شکل ۵).



شکل ۵- مقادیر میانگین پایداری بیان (expression stability) ژن های کنترل داخلی با استفاده از نرم افزار gNorm در ریشه و برگ گیاه حرا تحت تیمار نفتی

۴. بحث و نتیجه گیری

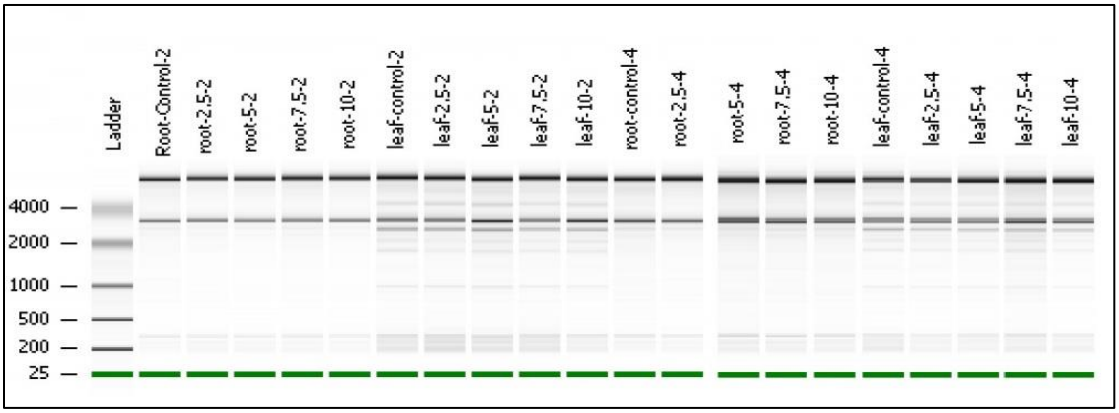
RT-qPCR یک فناوری قدرتمند برای مطالعات بیان ژن‌ها است و استفاده از ژن‌های رفرنس مناسب پیش نیاز اطمینان از دقت داده های آن می‌باشد. مطالعات زیادی در خصوص انتخاب ژن‌های مرجع در گیاهان مختلفی مانند آرابیدوپسیس (Czechowski, Stitt et al. 2005, Remans, Smeets et al. 2008, Hong, al. 2005, Bahn et al. 2010, Lilly, Drummond et al. 2011)، گیاهان زراعی(Kulcheski, Hu, Fan et al. 2009, Marcelino-Guimaraes et al. 2010) و برخی مانگروها(Peng, Wang et al. 2015) گزارش شده است. مطالعات اخیر ثابت کرده است که بیان برخی از ژن‌های مرجع کلاسیک مانند ACT (Løvdal and Lillo 2009,)، GAPDH (Lilly, Drummond et al. 2011, Li, Yang et al. 2012, Wang, Liu et al. 2012)و 18S (Die, Román et al. 2010, Yang, Hou et al. 2010) به ویژه در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی می‌تواند به شدت تغییر یابد. در مطالعه حاضر بیان چهار ژن کنترل داخلی شناخته شده *ACT*، *PP2A* (Wang, Wang et al. 2014)، *TIP* و *UBQ* (Czechowski, Stitt et al. 2005) مورد بررسی قرار گرفت که در واقع ترکیبی از ژن‌های رفرنس کلاسیک و جدید است.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج بدست آمده آنالیزهای انجام شده در هر سه نرم افزار موید استفاده از ژن *ACT* به عنوان یک کنترل داخلی مناسب بود. با این وجود همه نرم افزارها استفاده ترکیبی از چند ژن کنترل داخلی را پیشنهاد نمودند که در تحقیقات بعدی که توسط نگارندگان انجام شد، نیز مورد استفاده قرار گرفت. استفاده از چند ژن رفرنس داخلی برای گرفتن بهترین نتیجه در ارتباط با آنالیز داده‌های مولکولی پیش تر نیز پیشنهاد شده است. به عنوان نمونه در گیاه ارزن در پاسخ به تنش‌ها ۳ ژن کنترل داخلی(Shivhare and Lata 2016)، در هندوانه در پاسخ به تنش زیستی ۲ ژن کنترل داخلی(Kong, Yuan et al. 2014)، در گیاه هویج در پاسخ به تنش گرمایی و جیبرلین ۳ ژن کنترل داخلی(Tian, Jiang et al. 2015) و در ریشه و برگ گیاه خربزه چهار ژن کنترل داخلی پیشنهاد شده است(Kong, Yuan et al. 2014). Peng و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه ای بیان ژن‌های گلیسرآلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*)، 18s rRNA، b-*Actin*، *60S ribosomal protein L2* و *elongation factor-1-A* را در گیاه مانگرو *Aegiceras corniculatum* تحت شرایط تنش غیرزیستی مورد بررسی قرار دادند. آنها نیز استفاده همزمان از چند ژن رفرنس داخلی را به منظور اطمینان از دقت و صحت یافته‌ها پیشنهاد نمودند. طبق دانش ما، این نخستین پژوهش در خصوص تعیین ژن کنترل داخلی مناسب در گیاه حرا است؛ هرچند بررسی تعداد بیشتری ژن در این گونه آنالیزها، می توانست بر ارزش و اعتبار یافته‌های این تحقیق بیافزاید اما محدودیت‌های موجود در ارتباط با توالی ژنتیکی گیاه حرا به عنوان یک مانع مطالعه طیف گسترده‌تری از ژن‌های رفرنس داخلی پیش رو بود. همچنین بررسی این ژن ها در تنش های دیگری مانند اثر هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs)، یا تنش‌هایی مانند شوری، خشکی و تنش گرمایی می‌تواند، به عنوان پژوهش مکمل این تحقیق موثر باشد. با این وجود یکی از ویژگی‌های این تحقیق که در بسیاری از تحقیقات مشابه موجود نیست، آنالیز بیان ژن‌ها در ریشه و برگ گیاه که دو اندام مختلف با سطوح بیان ژنی متفاوت هستند، می باشد. علاوه بر این موضوع تفاوت سن فیزیولوزیک و نموی گیاه (۲ماهه و ۴ ماهه) و نیز سطوح متفاوت تنش نفتی از ۲/۵ تا ۱۰ درصد بر اعتبار نتایج افزوده است.

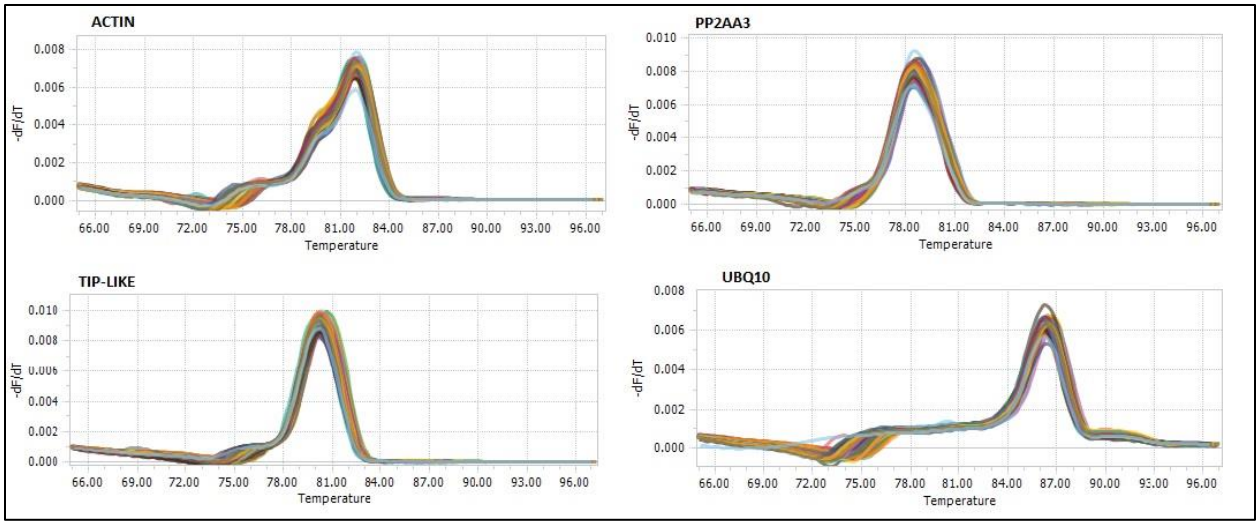
مطالعه حاضر استفاده از چند ژن کنترل داخلی شامل *ACT2* و *UBQ10* و *PP2AA3* را در مطالعات بیان ژن-های گیاه حرا تحت تنش نفتی پیشنهاد نمود. بررسی مطالعات ترانسکریپتومی گیاه حرا تحت تنش نفتی می تواند به مطالعه طیف گسترده تری از ژن‌های کنترل داخلی تحت این تنش کمک نموده و احتمالا معرفی ژن‌های کنترل داخلی بیشتری را در پی خواهد داشت.



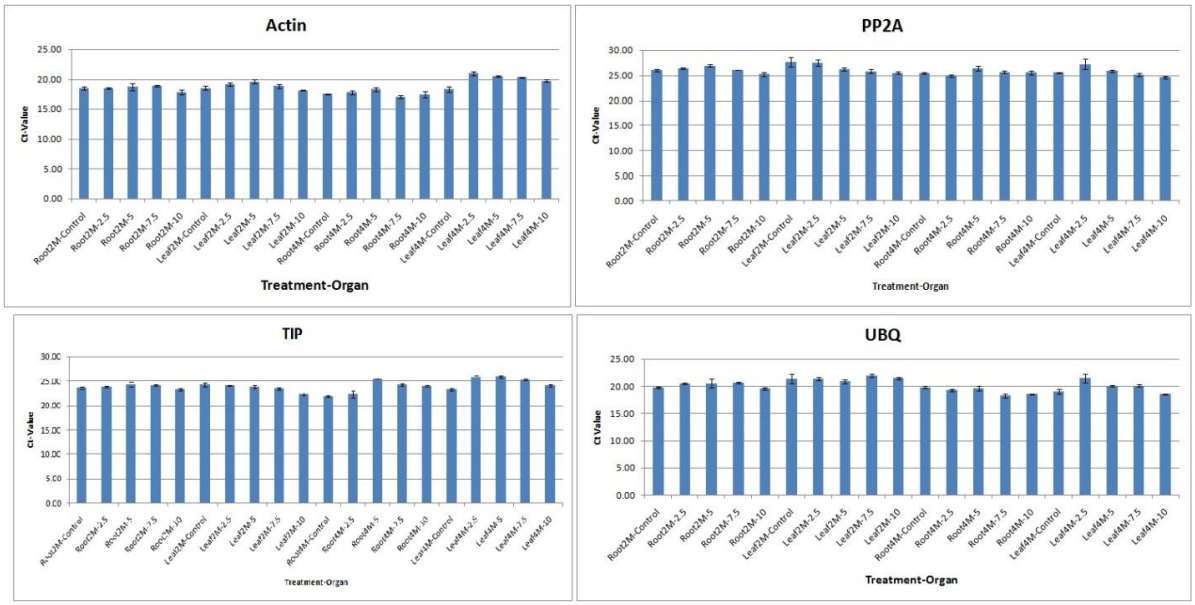
شکل ۱- بررسی کیفیت RNA استخراج شده از ریشه (root) و برگ (leaf) دانه رست های ۲ و ۴ ماهه گیاه حرا تحت غلظت های ۲/۵، ۵/۰، ۷/۵ و ۱۰ نفت با دستگاه بیوآنالایزر

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- منحنی ذوب ژن های خانه دار کاندید *ACT*، *PP2A*، *TIP* و *UBQ* در ریشه و برگ گیاه حرا شاهد و تحت غلظت های مختلف نفت پس از ۴۰ سیکل Real-time quantitative PCR.



شکل ۴- مقادیر Ct ژن های کنترل داخلی در ریشه و برگ گیاه ۲ (2M) و ۴ (4M)ماهه حرا تحت تیمارهای مختلف نفت (شاهد، ۲/۵، ۵/۰، ۷/۵ و ۱۰)

جدول ۲- همبستگی بین ژن های رفرنس و شاخص Bestkeeper در ریشه و برگ حرا تحت تیمار نفتی

	ACT2	PP2AA3	TIP	UBQ
PP2A	۰/۲۹	-	-	-
TIP	۰/۶۵	۰/۳۴	-	-
UBQ	۰/۴۶	۰/۶۲	۰/۰۹	-
Best Keeper coeff. of corr. [r]	۰/۸۴	۰/۷۱	۰/۶۸	۰/۷۵
p-value	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل بیان ژن با استفاده از نرم افزار NormFinder در ریشه و برگ حرا تحت تیمار نفتی

نام ژن	عدد پایداری[1]	بهترین ژن	Actin
Actin	۰/۶۴	عدد پایداری	۰/۶۳۸
PP2A	۰/۷۶		
TIP	۰/۸۳	بهترین ترکیب ژن	Actin و PP2A
UBQ	۰/۸۵	عدد پایداری در بهترین ترکیب دو ژن	۰/۳۸۶

منابع

Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. and Scheible, W.-R. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. Plant Physiology. 139(1): 5-17.

Die, J.V., Román, B., Nadal, S. and González-Verdejo, C.I. 2010. Evaluation of candidate reference genes for expression studies in Pisum sativum under different experimental conditions. Planta. 232(1): 145-153.

Ebrahimi-Sirizi, Z. and Riyahi-Bakhtiyari, A. 2013. Petroleum pollution in mangrove forests sediments from Qeshm Island and Khamir Port—Persian Gulf, Iran. Environmental Monitoring and Assessment. 185(5): 4019-4032.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Research. 6(10): 986-994.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology. 11: 1026-1030.

Hong, S.M., Bahn, S.C., Lyu, A., Jung, H.S. and Ahn, J.H. 2010. Identification and testing of superior reference genes for a starting pool of transcript normalization in Arabidopsis. Plant and Cell Physiology. 51(10): 1694-1706.

Hu, R., Fan, C., Li, H., Zhang, Q. and Fu, Y.-F. 2009. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. BMC Molecular Biology. 10(1): 1.

Kong, Q., Yuan, J., Gao, L., Zhao, S., Jiang, W., Huang, Y. and Bie, Z. 2014a. Identification of suitable reference genes for gene expression normalization in qRT-PCR analysis in watermelon. PloS one. 9(2): e90612.

Kong, Q., Yuan, J., Niu, P., Xie, J., Jiang, W., Huang, Y. and Bie, Z. 2014b. Screening suitable reference genes for normalization in reverse transcription quantitative real-time PCR analysis in melon. PloS one. 9(1): e87197.

Kozera, B. and Rapacz, M. 2013. Reference genes in real-time PCR. Journal of Applied Genetics. 54(4): 391-406.

[1] - Stability value

www.SID.ir

Archive of SID

Kulcheski, F.R., Marcelino-Guimaraes, F.C., Nepomuceno, A.L., Abdelnoor, R.V. and Margis, R. 2010. The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean. Analytical Biochemistry. 406(2): 185-192.

Li, X.-S., Yang, H.-L., Zhang, D.-Y., Zhang, Y.-M. and Wood, A.J. 2012. Reference gene selection in the desert plant Eremosparton songoricum. International journal of molecular sciences. 13(6): 6944-6963.

Lilly, S., Drummond, R., Pearson, M. and MacDiarmid, R. 2011. Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virus-infected Arabidopsis thaliana. Molecular Plant-Microbe Interactions. 24(3): 294-304.

Løvdal, T. and Lillo, C. 2009. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. Analytical Biochemistry. 387(2): 238-242.

Peng, Y.-L., Wang, Y.-S. and Gu, J.-D. 2015. Identification of suitable reference genes in mangrove Aegiceras corniculatum under abiotic stresses. Ecotoxicology. 24(7-8): 1714-1721.

Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H.L. and Moorman, A.F. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neuroscience Letters. 339(1): 62-66.

Rashvand, S. and Sadeghi, S.M. 2014. Distribution, Characteristics and Economic Importance of Mangrove Forests in Iran. Mangrove Ecosystems of Asia. Springer. pp. 95-126.

Remans, T., Smeets, K., Opdenakker, K., Mathijsen, D., Vangronsveld, J. and Cuypers, A. 2008. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in Arabidopsis thaliana exposed to increased metal concentrations. Planta. 227(6): 1343-1349.

Ruijter, J., Ramakers, C., Hoogaars, W., Karlen, Y., Bakker, O., Van den Hoff, M. and Moorman, A. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. Nucleic Acids Research. 37(6): e45-e45.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science. 270(5235): 467.

Shivhare, R., Lata, C. 2016. Selection of suitable reference genes for assessing gene expression in pearl millet under different abiotic stresses and their combinations. Scientific Reports. 7: 40290 DOI: 10.1038/srep40290

Suzuki, T., Higgins, P. and Crawford, D. 2000. Control selection for RNA quantitation. BioTechniques. 29(2): 332-337.

Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. and Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. Journal of Biotechnology. 75(2): 291-295.

Tian, C., Jiang, Q., Wang, F., Wang, G.-L., Xu, Z.-S. and Xiong, A.-S. 2015. Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves. PloS one. 10(2): e0117569.

van Bochove, J., Sullivan, E. and Nakamura, T. 2014. The importance of mangroves to people: A call to action. United Nations Environment Programme.

Wang, H., Wang, J., Jiang, J., Chen, S., Guan, Z., Liao, Y. and Chen, F. 2014. Reference genes for normalizing transcription in diploid and tetraploid Arabidopsis. Scientific reports. 4: 6781.

Wang, X., Liu, Y. and Yang, P. 2012. Proteomic studies of the abiotic stresses response in model moss–Physcomitrella patens. Frontiers in plant science. 3: 258.

Yang, Y., Hou, S., Cui, G., Chen, S., Wei, J. and Huang, L. 2010. Characterization of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in various tissues of Salvia miltiorrhiza. Molecular Biology Reports. 37(1): 507-513
.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

Determination of suitable housekeeping genes for normalization of quantitative real time PCR analysis of *Avicennia marina* under crude oil treatment

Babak Moradi[1], Hassan Zare Maivan*[2], Mona Sorahinobar[2], Mehri Seyed Hashtroudi[3]

1. Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Department of Plant Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms in Iran, 3. School of Biology, College of Science, University of Tehran, Iran
Iranian National Institute for Oceanography and Atmospheric Science, Tehran, Iran

Abstract:
Gene expression studies could provide insight into the physiological mechanisms and strategies used by plants under stress conditions. Selection of suitable internal control gene(s) is essential to accurately assess gene expression levels. For the mangrove plant, *Avicennia marina*, reliable reference genes to normalize real-time quantitative PCR data has not been previously investigated. In this study, the expression stabilities of four candidate reference genes [Actin 2 (*ACT2*), Serine/threonine-protein phosphatase 2A subunit A3 (*PP2AA3*),TIP-Like (*TIP*), polyubiquitin 10 (*UBQ*)] were determined in leaves and roots of *A. marina* treated by different levels of oils contamination . Three software programs (Bestkeeper, NormFinder and geNorm) were employed to analyze and rank the tested genes. Results showed that *ACT2* was the most suitable reference gene in *A. marina* and the combination of two or three genes was recommended for greater accuracy. Identification of *A. marina* reference genes in a wide range of experimental samples will provide a useful reference in future gene expression studies in this species, particularly involving similar stresses.

Keywords: Mangrove plants, *Avicennia marina*, Quantitative real-time PCR , Reference gene, Normalization, Oil contamination

Table 1 Sequences of the primers used in this study
Table 2.Correlation coefficient between BestKeeper index and each reference gene in roots and leaves of A. marina grown under oil treatment
Table 3. The expression stability of the candidate reference genes using NormFinder in the roots and leaves of A. marina grown under oil treatment
Figure1. Quality control of total RNA extracted from roots and leaves of 2 and 4-months old A. marina grown on 0.0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10% oil treated soil. The image shows a total RNA gel like-image produced by the Bioanalyzer.
Figure 2. Melting curve analysis of ACT, PP2A, TIP and UBQ candidate reference gene of roots and leaves of A. marina grown under oil treatment after 40 Real-time quantitative PCR cycles.

*Corresponding author, E-mail: zaremaih@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

Figure 3.Box plot representation of RT-qPCR threshold (Ct) values of 4 reference genes in roots and leaves of A. marina grown on soil containing different level of crude oil. A box plot is shown representing the interquartile range with median, 25th and 75th percentile, minimum and maximum values.
Figure 4. Cycle threshold (Ct) values of the candidate reference genes in roots and leaves of 2 (2M) and 4 (4M) months old A. marina grown under oil treatment (Control, 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0)
Figure 5. Average values (M) of expression stability of reference genes analyzed by the GeNorm program in the roots and leaves of A. marina grown under oil treatment

www.SID.ir