دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۵، شماره ۲، صفحه ۲۰۰-۱۸۷ (۱۳۹۶)

بررسی پایداری بیان ژن‌های مرجع *ovEF1alpha* و *18S rRNA* تحت تأثیر تیمارهای جیبرلین و تنش‌های دما و نور در جنس آویشن

سمیه بهادر[1*] و بابک ربیعی[2]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، پست الکترونیک: S.bahador63@gmail.com

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۲

چکیده

کمی‌سازی رونوشت‌های مربوط به ژن‌های اختصاصی با استفاده از روش Real-Time PCR معمول است. برای نرمال‌سازی داده‌های حاصل از این روش و دستیابی به نتایج قابل اطمینان، به ژن‌های مرجع داخلی با بیان پایدار و بدون تأثیرپذیری از شرایط آزمایش نیاز است. در این پژوهش، پایداری و عدم تأثیرپذیری دو ژن مرجع، فاکتور طویل‌سازی آلفا *OvEF1alpha* و RNA ریبوزومی *18S rRNA*، بین هفت جمعیت گیاهی، تحت تأثیر سن (بوته‌های جوان و دو ساله)، هورمون جیبرلین (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ پی‌پی ام) و تنش‌های دمایی و نوری بررسی شد. نتایج نشان داد که بیان هر دو ژن بین جمعیت‌های مختلف به‌طور معنی‌داری تغییر کرد ولی هر دو ژن در هر دو رده سنی بیان ثابتی داشتند. همچنین ژن *ovEF1alpha* برخلاف ژن *18S rRNA* در غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین و گیاهان شاهد به‌طور پایدار بیان شد. تحت تأثیر دما و شدت نور بیان ژن *18S rRNA* در جمعیت‌های آویشن باغی و باب‌زنگی مشابه با نمونه شاهد بود، ولی در جمعیت باب‌گرگی بیان آن به‌شدت کاهش یافت. برخلاف آن بیان ژن *ovEF1alpha* در دو جمعیت باب‌گرگی و باب‌زنگی متفاوت از نمونه شاهد بود. بنابراین برای مقایسه بیان ژن و نرمال‌سازی داده‌های حاصل از Real-Time PCR در جمعیت‌های آویشن باغی، سیرچ، هنزا و زرند ژن مرجع *ovEF1alpha* و مقایسه سه جمعیت باب‌زنگی، سیرچ و هنزا و دو جمعیت زرند و آویشن باغی ژن *18S rRNA* مناسب‌تر است. همچنین تحت تیمار هورمون جیبرلین ژن *ovEF1alpha* و تحت تنش‌های دمایی و نوری در گونه آویشن باغی هر دو ژن ولی در گونه آویشن کرمانی ژن *18S rRNA* پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آویشن، جمعیت، ژن‌های مرجع، Real-Time PCR

مقدمه

گیاهان جنس آویشن از مهمترین گیاهان دارویی خانواده نعناعیان به‌شمار می‌آیند که در منابع معتبر از پیکر رویشی آنها به‌عنوان دارو یاد شده است و خواص دارویی آنها مورد تأکید قرارگرفته است (Zargari, 1990). آویشن در ابعاد وسیع داروسازی، غذایی و مبارزه بیولوژیکی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و در بین داروهای تولید شده در جهان، آویشن بعد از نعناع حائز رتبه دوم است (Bikdelu,

Archive of SID

www.SID.ir

2012). با وجود تلاش‌های زیادی که در مورد شناسایی مسیرهای بیوسنتز ترکیبات ترپنی دارویی و آنزیم‌های کلیدی آن شده است، متأسفانه مطالعه زیادی در مورد عوامل ژنتیکی تعیین‌کننده در مسیر اصلاح و بهبود این گیاه انجام نشده است. بنابراین، مطالعات مولکولی مانند بررسی الگو و میزان بیان ژن‌ها در جمعیت‌های مختلف گیاهی با محتوای متابولیتی متنوع، بیان ژن‌های دخیل در مسیر متابولیکی و مسیرهای مقاومت به انواع تنش‌ها، تغییرات بیان ژن در پاسخ به استرس‌های زیستی و غیرزیستی، تجزیه بیان ژن طی مراحل مختلف رشد و نمو، بررسی الگوی بیان در اندام-های مختلف، شناسایی و توالی‌یابی ژن‌های مهم دخیل در مسیرهای متابولیکی در سطح mRNA برای درک بیشتر فاکتورهای ژنتیکی تعیین‌کننده اصلاح گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف آویشن اهمیت زیادی دارد.

تفاوت در بیان ژن‌ها معمولاً به‌وسیله کمی‌سازی رونوشت‌های mRNA هر ژن و با استفاده از انواع روش‌ها ازجمله نوردن بلات، Microarray، SAGE، RT-PCR، Real-Time PCR و غیره انجام می‌شود. روش Real-Time PCR به‌دلیل حساسیت و دقت به یک ابزار عمومی برای ارزیابی ژن‌ها تبدیل شده است که مورد علاقه محققان است و تعداد اندک mRNA را نیز شناسایی و کمی‌سازی می‌کند. این روش امکان شناسایی تجمع رونوشت‌ها را با استفاده از کاوشگرهای فلورسانس یا رنگ‌هایی مانند سایبرگرین I که خود را بین دو رشته DNA درج می‌کنند، ایجاد کرده است (Giulietti *et al*., 2001; Zainuddin *et al*., 2010). تفاوت‌هایی در نتایج تجزیه بیان ژن در نتیجه تفاوت‌های بیولوژیکی و یا تکنیکی ممکن است مشاهده شود. بنابراین ضروری به‌نظر می‌رسد که خطاهای بین نمونه‌ها در زمان اندازه‌گیری میزان بیان RNA کنترل شود. به‌منظور کنترل خطاهای آزمایشگاهی در هر کمی‌سازی RT-PCR شامل تخریب، کارایی استخراج و کمیت و کیفیت RNA وارد شده در واکنش، تفاوت‌های مرحله به مرحله در مواد PCR، کارایی واکنش PCR و رونویسی معکوس، دقت در پایپت کردن، تفاوت در نوع نمونه‌ها، عوامل بازدارنده موجود در بافت‌ها و خطاهای مربوط به بارگذاری نمونه‌ها، محققان چندین روش ازجمله نرمال‌سازی با DNA ژنومی، RNA کل، استاندارد خارجی و یک ژن مرجع داخلی را پیشنهاد کردند. معمول‌ترین روش، اندازه‌گیری همزمان بیان ژن‌های مرجع برای نرمال‌سازی داده‌های ژن اصلی است (Giulietti *et al*., 2001; Robert *et al*., 2005; Kowalewska *et al*., 2012). ژن‌های مرجع ژن‌های تنظیمی داخلی هستند که در فرایندهای مختلفی در سلول‌ها ازجمله سوخت و ساز، ساختار سلولی، اسکلت سلولی، گلیگولیز، رونویسی ژن، ترجمه و خود پایداری سلولی درگیر هستند. بنابراین، ژن-های مرجع به‌طور دائم بیان می‌شوند و انتخاب یک ژن مناسب برای کمی‌سازی دقیق بیان RNA یک ژن خاص در روش Real-Time PCR خیلی مهم است (Zainuddin *et al*., 2010).

سطح بیان ژن‌های مرجع باید بین بافت‌ها و سلول‌های مختلف یک بافت مستقل از شرایط آزمایشگاهی و مرحله رشد پایدار باقی بماند (Thellin *et al*., 1999). نتایج چندین مطالعه نشان داده است پروفایل بیان ژن‌های مرجع در گیاهان *Arabidopis taliana*، *Solanum tuberosum*، *Lolium temulentum* L. و *Pinus pinaster* L. در بافت‌ها و در شرایط مختلف آزمایش تغییر کرده است (Gopesh & George, 2012). میزان بیان سه ژن کدکننده RNA ریبوزومی (*RDN5.8*، *RDN18*، *RDN25*) تحت تنش فلوکونازول در قارچ *Candida glabrata* پایدار باقی ماند، ولی ژن‌های *ACT1*، *EF1a*، *GAPDH* و *PPIA* افزایش یافتند (Li *et al*., 2012). نتایج تحقیق دیگری نشان داد که میزان بیان ژن‌های مرجع در فیبروبلاست‌های موش تحت تأثیر سرم خون قرار گرفت، ولی افزایش بیان ژن *18SrRNA* بر خلاف β- اکتین و *GAPDH* معنی‌دار نبود (Schmittgen & Zakrajsek., 2000). نتایج تحقیقات یادشده نشان می‌دهد که تغییر در بیان ژن‌های مرجع منجر به نتیجه‌گیری غلط می‌شود. از این‌رو، تائید مناسب بودن ژن-های مرجع داخلی برای جلوگیری از تفسیرهای اشتباه یافته‌های یک مطالعه، ضروری به‌نظر می‌رسد.

Archive of SID

www.SID.ir

از ژن‌های مختلفی ازجمله β- اکتین، β_2- اکتین، سیکلواکسیژناز ۱، گلیسرآدئید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH)، هیپوگزانتین فسفوریبوزیل ترانسفراز، پورفوبیلی‌نوژن دآمیناز (Lee *et al.*, 2001)، RNA ریبوزومی (rRNA)، توبولین (TUB)، یوبی‌کوئینون (UBQ) و فاکتور طویل‌سازی ۱ آلفا (*EF1α*) (Hu *et al.*, 2009) به‌عنوان ژن‌های مرجع استفاده می‌شود. نتایج برخی مطالعات نشان داده است که سطح بیان این ژن‌ها در پاسخ به تغییرات شرایط محیطی یا در بافت‌های مختلف به‌طور قابل ملاحظه‌ای تغییر می‌کند. بنابراین نمی‌توان هیچ‌یک از ژن‌های فوق را با اطمینان کامل به‌عنوان ژن مرجع عمومی مدنظر قرار داد، بهتر است یک آزمایش برای انتخاب ژن‌های مرجع مناسب شرایط آزمایشی و نوع بافت طراحی شود (Hu *et al.*, 2009). به این ترتیب که هر گروه از محققان باید چندین ژن مرجع برای آزمایش خود بررسی و تنظیم‌کنند. در این رابطه Crocoll (۲۰۱۱) برای اولین بار از ژن *ovEFalpha* جداسازی شده از گیاه مرزنگوش به‌عنوان ژن مرجع برای بررسی بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز در گیاه آویشن استفاده کرد. اما تاکنون درباره تغییرات بیان ژن‌های مرجع معمول در گیاهان خانواده نعناعیان، مطالعه زیادی انجام نشده است، به‌طوری که مقایسه بیان ژن‌های مختلف مرجع در گیاهان این خانواده ازجمله آویشن، قبل از مطالعه بیان ژن‌های اصلی تحت تأثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، مراحل مختلف رشد و غیره برای اطمینان از دقت و قابل تکرار بودن آزمایش، ضروری به‌نظر می‌رسد. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی میزان پایداری بیان دو ژن مرجع مهم فاکتور طویل‌سازی آلفا (*ovEFalpha*) و RNA ریبوزومی (*18S rRNA*) در هفت جمعیت گیاهی و تحت تأثیر سن، غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین و تحت تنش دما و شدت نور انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

به‌منظور بررسی پایداری ژن‌های مرجع در این پژوهش، سه آزمایش انجام شد که در آزمایش اول بیان ژن‌های مرجع فاکتور طویل‌سازی آلفا (*ovEFalpha*) و RNA ریبوزومی (*18S rRNA*) در هفت جمعیت مختلف از سه گونه آویشن ارزیابی شد، در آزمایش دوم تأثیر هورمون جیبرلین و سن و در آزمایش سوم تأثیر تنش دما و نور بررسی شدند.

الف) آزمایش اول

بر اساس اطلاعات مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان و اطلاعات محلی، رویشگاه‌های مختلف آویشن در استان کرمان شناسایی و در زمان‌های مختلف بذر چهار جمعیت مختلف از رویشگاه‌های مربوطه جمع‌آوری شد. علاوه بر این، دو جمعیت آویشن کرمانی جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های زرند و بافت و یک رقم خارجی آویشن باغی از بانک ژن منابع طبیعی واقع در مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شد. نمونه‌های گیاهی در بخش علوم گیاهی دانشکده علوم دانشگاه تهران، توسط خانم دکتر سلمکی شناسایی شدند (جدول ۱). ابتدا بذرهای این هفت جمعیت گیاهی در داخل پتری‌دیش کشت و پس از ۱۰ روز گیاهچه‌های جوان به گلدان‌های حاوی خاک پیت‌ماس و بعد به گلدان‌های اصلی با خاک لومی- رسی (۳۹ درصد رس، ۲۰ درصد سیلت، ۲۱ درصد شن و با pH= ۷/۴-۷/۹) منتقل شدند. با گذشت ۷ ماه از رشد گیاهان در شرایط کنترل شده گلخانه، گیاهان جوان برای نمونه‌گیری به اتاقک رشد با شرایط ثابت ۱۶ ساعت روشنایی در دمای ۲۲-۲۰ درجه سلسیوس و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۰-۱۸ درجه سلسیوس، شدت نور ۴۹-۶۵µmol/m^2/s و رطوبت نسبی ۵۵-۵۰ درصد (Bahador, 2014) منتقل شدند.

ب) آزمایش دوم

برای بررسی بیان ژن‌های مرجع تحت تأثیر سن گیاه و هورمون جیبرلین، همزمان با کاشت بذرهای گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) یک بوته دو ساله

Archive of SID

www.SID.ir

از همین گونه اصلاح شده برای تهیه قلمه‌های نیمه‌خشبی از دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه و در شرایط کنترل شده با دمای حداقل ۱۸ درجه در زمستان و ۳۰ درجه سلسیوس در بهار و شدت نور ۹۵۰µmol/m^2/s– ۸۵۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه نگه‌داری شد. پس از گذشت چهار ماه، به‌دلیل تغییر الگو و میزان بیان ژن‌ها در شرایط متغیر دمایی و نوری گلخانه، گیاهان در دو رده سنی (بوته‌های جوان تکثیر شده از بذر و بوته‌های دو ساله تکثیر شده از طریق قلمه) در اتاقک رشد با شرایط دمایی و نوری آزمایش اول (Bahador, 2014) قرار گرفتند. پس از گذشت یک دوره عادت‌دهی ۳۵ روزه در اتاقک رشد، در همان شرایط، غلظت‌های صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ پی پی ام هورمون جیبرلین در سه تکرار روی قلمه-های ریشه‌دار دوساله و دو تکرار روی بوته‌های جوان زیر یکساله (۷ ماهه) در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی نامتعادل، محلول‌پاشی شد. محلول ذخیره اصلی هورمون برای تهیه غلظت‌های مختلف، هر هفته به‌صورت تازه تهیه شد. برای تهیه محلول ذخیره هورمون، ابتدا مقدار مشخصی از جیبرلیک اسید (خریداری شده از شرکت سیگما) در ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد حل شد و در نهایت با آب مقطر استریل به حجم نهایی رسید. برای حل شدن بهتر هورمون، محلول ذخیره حاصل به‌مدت ۶ ساعت روی شیکر با دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و پس از آن به یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس منتقل شد. غلظت‌های هر تیمار از محلول ذخیره اصلی و با استفاده از توییین– ۲۰ (۰/۰۵ درصد) برای افزایش سطح تماس تیمارها با سطح برگ و ساقه، در حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر تهیه شد. در تیمار شاهد، فقط اتانول و توییین– ۲۰ در آب مقطر حل و مانند سایر تیمارها محلول‌پاشی شد. محلول‌پاشی با فاصله هر هفته یکبار، به‌مدت ۴ هفته تکرار شد و در هر بار محلول‌پاشی مقدار ۵۰–۴۵ میلی‌متر از محلول مربوط به‌هر غلظت هنگام صبح روی دو سطح فوقانی و تحتانی برگ‌ها اسپری شد. اسپری تا حدی انجام شد که قطرات مربوط به محلول هر تیمار از دو سطح گیاه جاری شد. برای جلوگیری از تماس گیاهان با یکدیگر، اسپری گیاهان هر تیمار به‌طور جداگانه انجام شد. سپس یک پلاستیک سلفون ۷۰×۶۰ سانتی‌متر دارای چند منفذ کوچک (شفاف و دارای قابلیت عبور نور)، روی هر گلدان کشیده و پس از گذشت ۲۴ ساعت پلاستیک از روی گیاه و گلدان برداشته شد (Bahador, 2014).

پ) آزمایش سوم

به‌منظور بررسی بیان ژن‌های مرجع تحت تأثیر دما و شدت نور، از سه گونه آویشن باغی (رقم اصلاح شده)، آویشن کرمانی (جمعیت باب‌زنگی) و آویشن دنایی (جمعیت باب‌گرگی) استفاده و سطح بیان هریک از ژن‌ها در شرایط دمایی ۳۴–۳۲ درجه سلسیوس و شدت نور ۹۰۰–۹۸۰µmol/m^2/s نسبت به نمونه‌های شاهد که در شرایط ثابت اتاقک رشد با دمای ۲۲–۲۰ درجه سلسیوس و شدت نور ۴۴–۵۳µmol/m^2/s قرار گرفته بودند، ارزیابی شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی جمعیت‌های مختلف آویشن مطالعه شده در این پژوهش

نشانی رویشگاه	نام علمی	شماره دسترسی	فاصله از کرمان (km)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع (m)
سربیژن- باب گرگی	*T. daenensis* subsp *lancifolius* (Celak) Jalas	–	۱۶۷	۲۹° و ۵`	۵۷° و ۳۲`	۲۹۲۹
راین- باب زنگی	*T. caramanicus* Jalas	–	۱۴۲	۲۹° و ۲۹`	۵۷°و ۱۶`	۳۵۰۰
کرمان- سیرچ	*T. caramanicus* Jalas	–	۳۸	۳۰° و ۸`	۵۷° و ۲۳`	۲۸۷۰
رابر- هنزا	*T. daenensis* subsp *lancifolius* (Celak) Jalas	–	۱۷۱	۲۹°و۲۲`	۵۷° و ۱۲`	۳۴۶۷
زرند	*T. caramanicus* Jalas	۱۸۳۱۶	–	–	–	–
بافت	*T. caramanicus* Jalas	۳۶۸۰۰	–	–	–	–
آویشن باغی	*T. vulgaris L.*	رقم ۳۷	–	–	–	–

جدول ۲- فهرست آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

نام ژن	توالی بازها در آغازگرهای رو به جلو و رو به‌عقب (۳` → ۵`)	طول قطعه (جفت باز)	منبع
OvEF1alpha	fwd: 5'-CTCCAGTTCTTGATTGCCACAC-3' rev: 5'-GCTCCTTTCCAGACCTCCTATC-3'	۸۷	(Crocoll *et al*., 2011)
18SrRNA	fwd:5'- ATGATAACTCGACGGATC-3' rev:5'-CTTGGATGTGGTAGC-3'	۱۸۰	طراحی شده با نرم‌افزار

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه‌برداری، استخراج RNA و ساخت cDNA

برای استخراج RNA، برگ‌های جوان پنج میان‌گره انتهایی با هم مخلوط و ۱۰۰ میلی‌گرم از آن داخل میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شد و بلافاصله در نیتروژن مایع، منجمد و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد.

به‌دلیل تنوع ترکیبات ترپنی، پلی‌ساکاریدی و پلی‌فنلی جمعیت‌های گیاهی، استفاده از یک روش استخراج، منجر به تهیه RNA از همه نمونه‌ها نشد. بنابراین از دو روش فنل/ SDS (Bahador *et al.*, 2014) و کیت GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (شرکت Thermo SCIENTIFIC) استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر و الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز بررسی شد. ساخت cDNA مطابق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (شرکت Thermo SCIENTIFIC)، همراه با یک واحد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس و با استفاده از آغازگرهای الیگوتیمیدین (Oligo- dT18) انجام شد. برای ساخت cDNA در حجم ۲۰ میکرولیتر، از RNA تیمار شده با DNAseI که حاوی ۱ میکروگرم RNA بود، استفاده شد. آلودگی DNA در روش‌های سریع غیرقابل اجتناب است، ولی از طریق تیمار RNA با آنزیم DNase قابل حل است. این مرحله یکی از مراحل معمول در روش‌های تجزیه و استخراج RNA است که قبل از ساخت cDNA و مطابق دستورالعمل بروشور همراه آنزیم، انجام شد.

انتخاب ژن‌های مرجع و طراحی آغازگر

مطالعات انجام شده در مورد بیان انواع ژن‌ها در گیاه آویشن تاکنون بسیار اندک است ولی ژن *ovEFalpha* به‌عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی داده‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Crocoll, 2011). ژن *18S rRNA* برای اولین بار در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت و اطلاعات مربوط به توالی‌های این ژن نیز از وبگاه http://www.ncbi/nlm.nih.cov به‌دست آمد. سپس همردیف سازی با استفاده از امکانات همین وبگاه انجام شد و با تأکید بر نواحی حفاظت‌شده در هر ژن و نواحی نزدیک به انتهای cDNA، آغازگرهایی در نرم‌افزار Primer Blast طراحی شد. به‌منظور طراحی آغازگر با کارایی بالاتر، محدودیت‌های دمای اتصال آغازگر، دایمر- پرایمر، درصد GC، طول آغازگر، طول محصول تکثیر شده و دمای ذوب محصول تکثیر شده توسط آغازگر، برای نرم‌افزار مشخص شد و در نهایت آغازگرها در نرم‌افزار Oligo Analyzer موجود در وبگاه http: //www.eu.idtdna.com/ بررسی و بهترین آغازگر انتخاب شد.

Real- Time PCR

واکنش Real- Time PCR برمبنای سایبرگرینI بود و ترکیبات واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (Real-Time Mastermix 2X) ساخت شرکت Thermo SCIENTIFIC، ۰/۳پیکومول در میکرولیتر از هر دو آغازگر، ۱ میکرولیتر cDNA الگو و در نهایت حجم محلول با آب استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. Real-Time PCR با استفاده از یک دستگاهCFX 96 Real Time PCR (Bio-Rad, Hemel Hempstead, U.K.) با چرخه دمایی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۷ دقیقه، ۴۰ چرخه واشرست‌سازی در ۹۵ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در ۶۰ درجه به‌مدت ۱ دقیقه و بسط آغازگر در ۷۲ درجه به‌مدت ۱ دقیقه بود. داده‌های حاصل جمع‌آوری و ثبت شد. Real- Time PCR با ۲ یا ۳ تکرار بیولوژیک و ۳ تکرار تکنیکی انجام شد. ز آنجایی که سایبرگرین هر DNA دو رشته‌ای شامل دایمر پرایمرها، آلودگی DNA و محصول PCR حاصل از اتصال نابه‌جای آغازگر را آشکار خواهد کرد، از این‌رو در این پژوهش، برای اطمینان از صحت تکثیر اختصاصی هر قطعه ژنی، منحنی تکثیر و پیک ذوب قطعه‌های ژنی تکثیر شده از تمام واکنش‌های Real- Time PCR بررسی شد.

به‌منظور تعیین دقیق کمیت و فراوانی mRNA نمونه هدف، کارایی تکثیر PCR با استفاده از یک منحنی استاندارد از ژن-

Archive of SID

www.SID.ir

های هدف و از طریق رقیق‌سازی مداوم، cDNAهای ساخته شده محاسبه شد. البته شیب منحنی استاندارد بهتر است ۳/۳- یا نزدیک به آن باشد (Pfaffl, 2004). فراوانی نسبی mRNA هر ژن در هر نمونه بر پایه منحنی استاندارد متناظرش تعیین شد. برای تهیه منحنی استاندارد از فراورده‌های Real-Time PCR مربوط به‌هر ژن جمعیت باب‌زنگی که به‌وسیله کیت DNA Extraction Kit (شرکت Fermentase شماره K0513≠) تخلیص شده بود، استفاده شد. ابتدا ۱ میکرولیتر محصول Real- Time PCR تخلیص شده با ۹۹ میکرولیتر آب عاری از نوکلئازها به‌خوبی مخلوط شد. دوباره ۱۰ میکرولیتر از مخلوط فوق برداشته شد و با ۹۰ میکرولیتر آب به‌خوبی مخلوط شد. این مرحله، ۵ بار دیگر ادامه یافت تا در نهایت تعداد ۷ غلظت تهیه و از هر غلظت ۳ تکرار مانند سایر واکنش‌های Real-Time PCR استفاده شد.

ارزیابی میزان بیان ژن

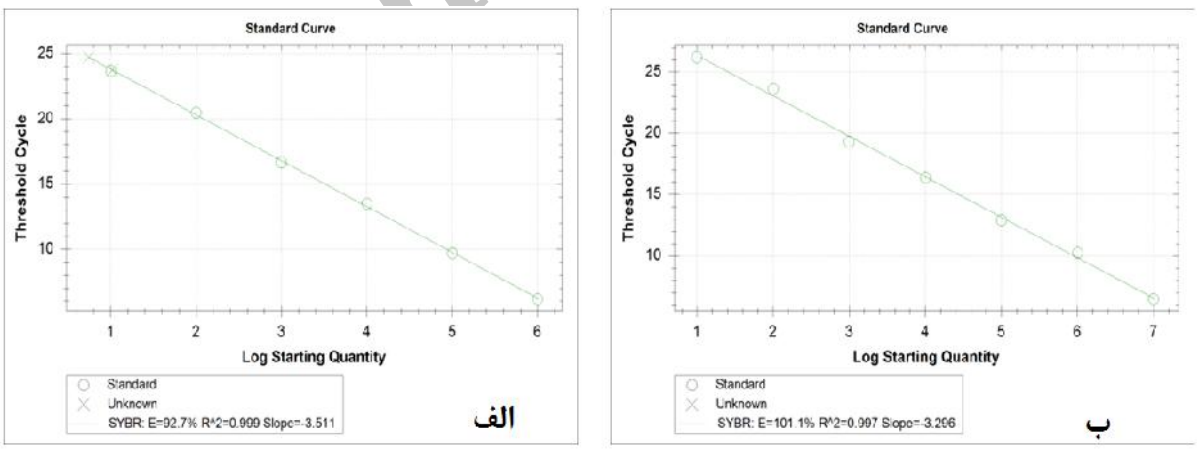
برای ارزیابی میزان بیان ژن‌های مرجع، ابتدا از مقادیر خام آستانه دوره C_t سه تکرار تکنیکی حاصل از واکنش Real-Time PCR میانگین گرفته شد. سپس از این اعداد برای تجزیه و محاسبه میزان بیان نسبی ژن با استفاده از روش تغییر یافته $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen&Zakrajsek., 2000; Peng *et al*., 2012) استفاده شد.

تجزیه‌های آماری

داده‌های حاصل از آزمایش‌های اول و سوم در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و در مورد آزمایش دوم در قالب آزمایش فاکتوریل (با دو فاکتور هورمون در ۴ سطح و سن گیاه در ۲ سطح) با طرح پایه کاملاً تصادفی نامتعادل تجزیه شدند. داده‌های حاصل در نرم‌افزار SAS نسخه ۹ تجزیه و مقایسه میانگین‌ها با دو آزمون LSD و دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. از نرم‌افزار Excel نیز برای ترسیم نمودارها استفاده شد.

نتایج

نتایج نشان داد که الگوی بیان دو ژن مرجع *ovEF1alpha* و *18SrRNA* در هفت جمعیت گیاهی در پاسخ به تنش‌های دما و نور و غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین تفاوت معنی‌داری داشت.



شکل ۱- منحنی استاندارد تهیه شده از سری رقت‌سازی فراورده **Real- Time PCR** جمعیت باب‌زنگی برای ارزیابی کارایی تکثیر آغازگرهای مربوط به ژن‌های: الف) ***ovEF1alpha***، ب) ***18S rRNA***. محور افقی لگاریتم مقدار **DNA** الگو برای شروع واکنش و محور عمودی مقدار **Ct** مربوط به‌هر غلظت را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

کارایی و اختصاصی بودن تکثیر

برای ارزیابی کارایی تکثیر آغازگرهای دو ژن مرجع *ovEF1alpha* و *18SrRNA* از روش منحنی استاندارد و از محصول Real- Time PCR جمعیت گیاهی باب‌زنگی که حاوی ۶۵-۵۷ پیکومول DNA الگو بود، استفاده شد. نتایج منحنی استاندارد بیانگر تکثیر آغازگرها با حداقل کارایی ۹۲ درصد و حداکثر کارایی ۱۰۱ درصد بود. به طور کلی، ضریب همبستگی بین فلورسنس و کمیت DNA برای هر دو آغازگر بیش از ۰/۹۹ بود که این مقدار قابل قبولی بود (شکل ۱).

تجزیه منحنی ذوب مربوط به‌هر ژن در واقع بیانگر حضور یا عدم حضور دایمر- پرایمر یا فراورده‌های غیراختصاصی حاصل از اتصال آغازگر به نقاط غیر از ژن هدف است. تجزیه پروفایل منحنی ذوب برای هر دو ژن بیانگر عدم وجود دایمر- پرایمر و محصولات غیراختصاصی است.

بیان ژن‌های مرجع در جمعیت‌های آویشن

بر اساس نتایج شناسایی گیاهان و اطلاعات مربوط به بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، جمعیت‌های باب-زنگی، سیرچ، بافت و زرند متعلق به گونه آویشن کرمانی (*Thymus caramanicus* Jalas)، جمعیت هنزا و باب‌گرگی متعلق به زیرگونه برگ نیزه‌ای آویشن دنایی (*Thymus daenensis* subsp *lancifolius* (Celak) Jalas) و رقم خارجی متعلق به گونه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) بود.

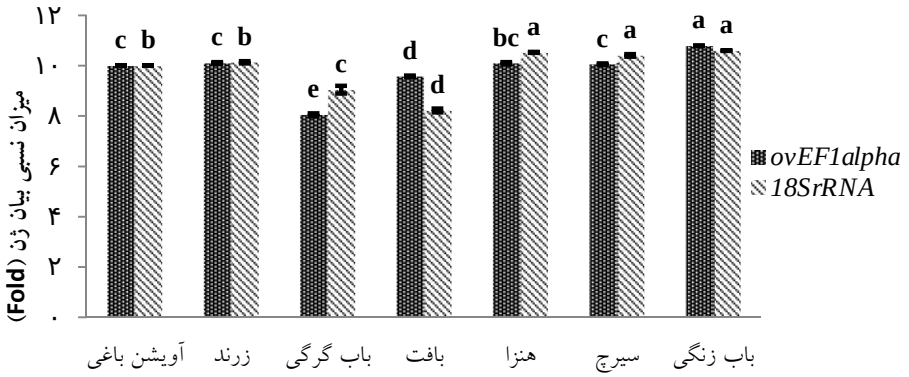
نتایج تجزیه واریانس داده‌های بیان دو ژن مرجع بین هفت جمعیت گیاهی نشان داد که بین جمعیت‌ها اختلاف معنی‌داری ($p<0.01$) وجود داشت (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس هفت جمعیت آویشن از نظر میزان بیان نسبی ژن‌های مرجع

منابع تغییرات	درجه آزادی	*ovEF1alpha*	*18S rRNA*
تیمار	۶	۱/۴۸**	۱/۵۸**
خطا	۷	۰/۰۰۲	۰/۰۰۹

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

بیشترین و کمترین میزان بیان ژن *ovEF1alpha* به‌ترتیب در جمعیت باب‌زنگی و باب‌گرگی مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین‌ها (شکل ۲) نشان داد که تغییرات بیان ژن در جمعیت‌های آویشن باغی، سیرچ، زرند و هنزا از نظر آماری معنی‌دار نبود و در یک گروه آماری قرار گرفتند و به‌عبارت دیگر، این ژن در این جمعیت‌ها به‌طور پایدار و با کمترین تغییرات بیان شد. از طرفی سه جمعیت باب‌زنگی، باب‌گرگی و بافت در سه گروه مجزا قرار گرفتند که این بیانگر تغییرات معنی‌دار بیان این ژن در این سه جمعیت و عدم پایداری بیان این ژن بین سه جمعیت یادشده است.



شکل ۲- مقایسه میانگین میزان بیان نسبی ژن‌های مرجع *ovEF1alpha* و *18S rRNA* حاصل از Real-Time PCR در هفت جمعیت آویشن، داده‌ها میانگین ۳ تکرار هستند و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p\leq0.05$) بر اساس آزمون LSD است. مقدار خطای استاندارد برآورد شده هر تیمار با خطوط عمودی روی هر ستون نمایش داده شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

در مورد ژن مرجع *18SrRNA* سه جمعیت باب‌زنگی، سیرچ و هنزا با بیشترین میزان بیان در یک گروه آماری و جمعیت‌های زرند و آویشن باغی در گروه دیگری قرار گرفتند. دو جمعیت بافت و باب‌گرگی به‌ترتیب در رده‌های بعدی و در دو گروه مجزا باقی ماندند (شکل ۲).

بیان ژن‌های مرجع تحت تأثیر هورمون جیبرلین و سن گیاه در آویشن باغی

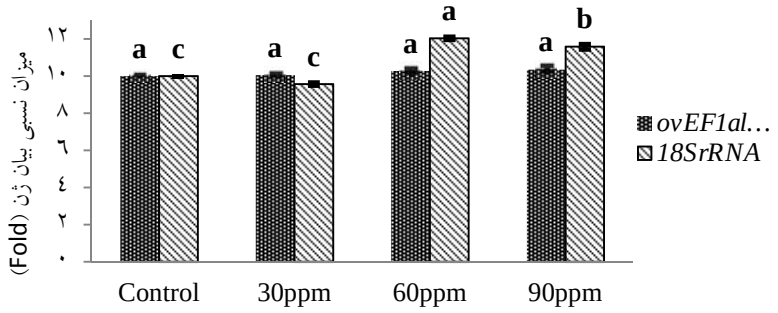
به‌منظور بررسی تأثیر هورمون جیبرلین و مرحله رشد گیاه بر بیان ژن‌های مرجع تنها از گونه اصلاح شده آویشن باغی استفاده شد. نتایج تجزیه داده‌ها نشان داد که فاکتور سن و اثر متقابل سن × غلظت هورمون بر هیچ‌یک از ژن‌ها تأثیر معنی‌داری نداشت، ولی در مورد فاکتور هورمون، تغییرات بیان ژن *18S rRNA* برخلاف ژن *ovEF1alpha* معنی‌دار ($p<0.01$) بود (جدول ۴). این نتایج نشان می‌دهند که بیان دو ژن مرجع مورد مطالعه در دو مرحله مختلف نموی آویشن باغی و بیان ژن *ovEF1alpha* تحت غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین از نظر آماری تغییر معنی‌داری نداشته و تقریباً پایدار باقی مانده است.

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *18S rRNA* نشان داد که غلظت ^{ppm} ۶۰ و ^{ppm}۹۰ در دو گروه آماری مجزا قرار گرفتند و بیشترین میزان بیان ژن را به‌خود اختصاص دادند. غلظت‌های ^{ppm}۳۰ و شاهد که در یک گروه آماری قرار گرفتند، کمترین میزان بیان را داشتند (شکل ۳).

جدول ۴- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس داده‌های تأثیر دو فاکتور سن گیاه و غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین بر میزان بیان نسبی ژن‌های مرجع

منابع تغییرات	درجه آزادی	*ovEF1alpha*	*18S rRNA*
سن	۱	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۶ ^{ns}
جیبرلین	۳	۰/۱۱ ^{ns}	۵/۷۴ **
سن×جیبرلین	۳	۰/۰۹ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}
خطای آزمایش	۸	۰/۰۲	۰/۰۴

**و^{ns}: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و غیرمعنی‌دار



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف هورمون جیبرلین بر میزان نسبی بیان ژن‌های مرجع *ovEF1alpha* و *18S rRNA*
داده‌ها میانگین ۳ تکرار هستند و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p\leq0.05$) بر اساس آزمون LSD می‌باشد. مقدار خطای استاندارد برآورد شده هر تیمار با خطوط عمودی روی هر ستون نمایش داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

بیان ژن‌های مرجع تحت تأثیر تنش دمایی و نوری در سه جمعیت آویشن

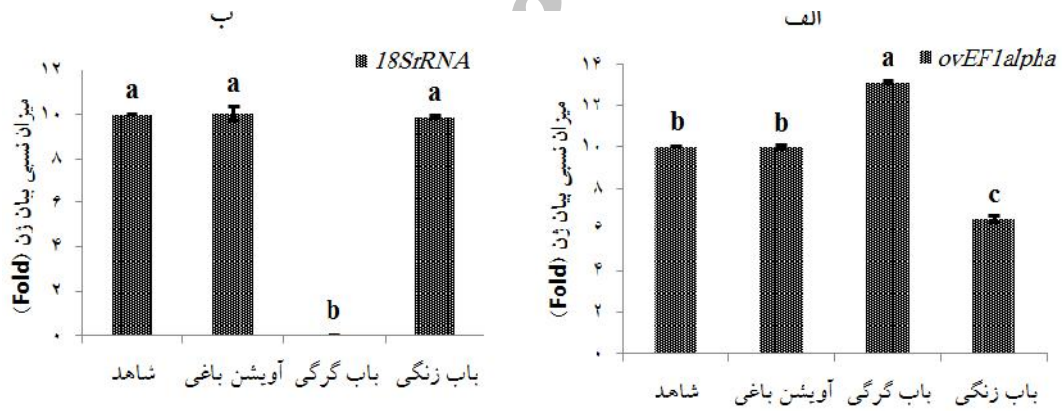
به‌منظور بررسی بیان ژن‌های مرجع تحت تأثیر دما و شدت نور از سه گونه آویشن باغی (رقم اصلاح شده)، آویشن کرمانی (جمعیت باب‌زنگی) و زیرگونه برگ نیزه‌ای آویشن دنایی (جمعیت باب‌گرگی) استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌های مربوط به این آزمایش نشان داد که اختلاف میزان بیان دو ژن مرجع بین سه گونه معنی‌دار ($p<0.01$) بود (جدول ۵).

جدول ۵- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن‌های مرجع تحت تأثیر دما و شدت نور در سه جمعیت آویشن

منابع تغییرات	درجه آزادی	*ovEF1alpha*	*18S rRNA*
تیمار	۳	۱۴/۵۷ **	۵۰/۱۴ **
خطای آزمایش	۴	۰/۰۱	۰/۰۵

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

نتایج مقایسه میانگین با آزمون LSD نیز نشان داد که در دما و شدت نور زیاد، میزان بیان ژن *ovEF1alpha* در گونه آویشن باغی نسبت به شاهد تغییر نکرد، ولی در دو گونه دیگر به‌طور معنی‌داری تغییر کرد، به‌طوری که جمعیت باب-گرگی بیشترین و جمعیت باب‌زنگی کمترین بیان را داشتند (شکل ۴). این نتایج نشان داد که بیان ژن *ovEF1alpha* تحت تأثیر دما و شدت نور زیاد در گونه آویشن باغی پایدارتر از دو گونه دیگر آویشن است.



شکل ۴- مقایسه میانگین بیان ژن‌های مرجع تحت تأثیر دما و شدت نور زیاد در سه جمعیت گیاهی آویشن. الف) *ovEF1alpha*، ب) *18sRNA*

.داده‌ها میانگین ۳ تکرار هستند و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p\leq0.05$) بر اساس آزمون LSD هستند. مقدار خطای استاندارد برآورد شده هر تیمار با خطوط عمودی روی هر ستون نمایش داده شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج مقایسه میانگین در مورد ژن *18S rRNA* کاملاً متفاوت از ژن *ovEF1alpha* بود. دو جمعیت آویشن باغی و باب‌زنگی با گروه شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند، ولی نتایج تجزیه منحنی ذوب در جمعیت باب‌گرگی بیانگر عدم بیان این ژن در این جمعیت بود و از نظر آماری در گروه دیگری قرار گرفت (شکل ۴).

بحث

یکی از روش‌های بسیار دقیق و اختصاصی برای بررسی بیان ژن، روش qRT-PCR است. ژن‌های کنترل داخلی در این روش برای کمی‌سازی رونویسی به‌کار می‌روند و باید تحت تأثیر شرایط آزمایش قرار نگرفته و به‌طور پایدار بیان شوند. در بیشتر گیاهان، ژن‌های مرجع فقط برای یک گونه یا واریته خاص بررسی شده‌اند و در بسیاری از گیاهان دارویی ازجمله آویشن هنوز مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. در برخی از تحقیقات نیاز به بررسی بیان ژن در چند گونه، واریته یا جمعیت گیاهی است و از طرفی یک یا چند ژن مرجع ممکن است برای بررسی بیان ژن در یک جمعیت یا گونه مناسب باشند، ولی برای مقایسه آن جمعیت با جمعیت‌ها و گونه‌های دیگر مناسب نباشد. بنابراین، بررسی و دستیابی به ژن‌های مرجع با بیان پایدار در این آزمایش‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد. نتایج بررسی بیان دو ژن مرجع *18S rRNA* و *ovEF1alpha* در این پژوهش نشان داد که در هر سه آزمایش ژن *18S rRNA* نسبت به *ovEF1alpha* تعداد رونوشت‌های بیشتری داشت و به‌عبارت دیگر، مقادیر C_t آن کمتر بود که این نتیجه با نتایج Gopesh و George (۲۰۱۲) مطابقت داشت. بین هفت جمعیت گیاهی آویشن، بیان هر دو ژن به‌طور معنی‌دار تغییر کرد (جدول ۲)، ولی نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیان ژن *ovEF1alpha* بین جمعیت‌های مختلف گیاهی پایدارتر از *18SrRNA* بود، به‌طوری که میزان بیان آن در جمعیت‌های آویشن باغی، سیرچ، هنزا و زرند از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۲). بنابراین، این ژن در این چهار جمعیت پایداری بهتری داشت و از آن می‌توان برای مقایسه بیان ژن بین این چهار جمعیت استفاده کرد. مطابق با نتایج فوق، Podevin و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش کردند که بیان ژن *EF1* در سه واریته موز پایدارتر بود و ژن‌های 25S، TUB، L2 (پروتئین ریبوزومی نوع L2) و ACT11 به‌ترتیب در رده‌های بعدی قرار گرفتند.

پروفایل بیان دو ژن مرجع *ovEF1alpha* و *18S rRNA* تحت تأثیر هورمون جیبرلین و سن گیاه نشان داد که هر دو ژن بیان ثابتی در هر دو رده سنی داشتند. همچنین ژن *ovEF1alpha* برخلاف ژن *18S rRNA* به‌طور پایدار در غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین و گیاهان شاهد بیان شد (شکل ۳). بنابراین، از این ژن می‌توان برای مطالعه تأثیر هورمون جیبرلین استفاده کرد. سطوح مختلف جیبرلین بر بیان ژن *18S rRNA* تأثیر معنی‌داری داشت و باعث تغییر در پایداری بیان ژن در غلظت‌های ^{ppm}۶۰ و ^{ppm}۹۰ شد. در نتیجه این ژن برای نرمال‌سازی داده‌های حاصل از تأثیر هورمون جیبرلین مناسب به‌نظر نمی‌رسد. نتایج پژوهش دیگری نشان داده است که ژن *18S rRNA* در سلول‌های سرطان روده انسان نسبت به دیگر ژن‌های مرجع پایداری کمتری داشت (Sørby *et al*., 2010).

تحت تأثیر دما و شدت نور بیان ژن *18S rRNA* در دو جمعیت آویشن باغی و باب‌زنگی نسبت به شاهد یا همان جمعیت گیاهی در شرایط استاندارد بدون تغییر و پایدار بود، ولی در جمعیت باب‌گرگی بیان این ژن به‌شدت کاهش یافت. بر خلاف آن بیان ژن *ovEF1alpha* در دو جمعیت باب‌گرگی و باب‌زنگی متفاوت از نمونه شاهد بود، ولی در مورد آویشن باغی و شاهد تغییر نکرد (شکل ۴). بنابراین، برای نرمال‌سازی در مطالعات تنش دمایی و نوری می‌توان از ژن *18SrRNA* در گیاهان آویشن باغی و باب‌زنگی و از ژن *ovEF1alpha* در آویشن باغی استفاده کرد. Lee و همکاران (Lee *et al*., 2010) بیان شش ژن مرجع را تحت تنش‌های سرما و آب در گیاه *Lolium perenne* L. بررسی کردند. نتایج آنان نشان داد که ژن فاکتور طویل‌سازی یوکاریوتی *eEF1A* در مقایسه با دیگر ژن‌ها پایدارتر بود. نتایج بررسی پایداری بیان ژن‌های مرجع تحت تنش خشکی

Archive of SID

www.SID.ir

در گیاه سویا نیز نشان داد که ژن‌های مرجع β- اکتین (*Gm*ß-actin) و RNA ریبوزومی (*GmRNAr18S*) پایدارتر از سایر ژن‌ها بودند (Stolf-Moreira *et al*., 2011). پروفایل بیان پنج ژن مرجع در چند کولتیوار نخود فرنگی (*Pisum sativum* L.) تحت تأثیر تنش‌های سرما و قارچ عامل کپک سفید نخود *Sclerotinia sclerotiorum* با استفاده از تجزیه واریانس مقادیر C_t ضمن تفاوت معنی‌دار بین کولتیوارها و تیمارها، از نظر پایداری بیان ژن‌ها نیز نشان داد که ژن‌های TIF، β- توبولین و *18SrRNA* در شرایط تنش و بیماری سفیدک به‌ترتیب در رده اول تا سوم قرار گرفتند (Gopesh & George, 2012). در تحقیق دیگر در همین گونه گیاهی گزارش شد که بیان ژن‌های β- توبولین و فسفاتاز 2A (*PP2A*) در پاسخ به تنش‌های اسمزی، اکسین و توفوردی پایدارتر از *18SrRNA* و *GAPDH* بود (Die *et al*., 2010). همچنین بیان دو ژن *ß-Tub9* و *IDE* در دو ژنوتیپ حساس و مقاوم قهوه تحت تأثیر قارچ *Colletotrichum kahawae* نیز پایدارتر بود (Figueiredo *et al*., 2013).

این اختلاف‌های معنی‌دار نشان‌دهنده ضرورت بررسی پایداری بیان ژن‌های مرجع قبل از انجام آزمایش‌های مربوط به بیان ژن در گونه‌ها و جمعیت‌های گیاهی و تنش‌های زیستی و غیرزیستی و همچنین استفاده از چند ژن مرجع در نرمال‌سازی داده‌های حاصل از روش Real-Time PCR است. نتایج این پژوهش نشان داد که برای مقایسه بیان ژن و نرمال‌سازی داده‌های حاصل در جمعیت‌های آویشن باغی، سیرچ، هنزا و زرند ژن مرجع *ovEF1alpha* و مقایسه جمعیت‌های باب‌زنگی، سیرچ و هنزا و دو جمعیت زرند و آویشن باغی ژن *18S rRNA* مناسب‌تر می‌باشد. همچنین تحت تیمار هورمون جیبرلین ژن *ovEF1alpha* و در تنش‌های دمایی و نوری در گونه آویشن باغی هر دو ژن ولی در گونه آویشن کرمانی ژن *18S rRNA* برای ارزیابی بیان ژن به‌عنوان ژن‌های مرجع پیشنهاد می‌شود.

منابع مورد استفاده:

- Bahador, S., 2014. Study on candidate genes expression related to biosynthesis pathway of phenolic monoterpenes in Thyme populations. University of Guilan, Rasht, Iran.
- Bahador, S., Rabiei, B. and Hassani Kumleh, S.H., 2014. Comparison of different methods for isolating of total RNA from leaf of three Thyme species rich in secondary metabolites .Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 22: 11-24.
- Bikdelu, M., 2012. Evaluation of morphological, genetical and phytochemical diversity of *Thymus caramanicus* Jalas. University of Tehran, Iran.
- Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J. and Degenhardt, J., 2011. Terpene synthases of Oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. Plant Molecular Biology, 73: 587-603.
- Die, J.V., Roman, B., Nadal, S., and Gonzalez-Verdejo, C.I., 2010. Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. Planta, 232: 145-153.
- Figueiredo, A., Loureiro, A., Batista, D., Filipa, M.,Várzea, V., Elijah, K. G. and Céu Silva, M., 2013. Validation of reference genes for normalization of qPCR gene expression data from *Coffea* spp. hypocotyls inoculated with *Colletotrichum kahawae*. BMC Research Notes, 6: 388-410.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. and Mathieu, C., 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods, 25: 386–401.
- Gopesh, C.S. and George, J.V., 2012. Evaluation of expression stability of candidate references genes among green and yellow pea cultivars (*Pisum sativum* L.) subjected to abiotic and biotic stress. American Journal of Plant Sciences, 3: 235-242.
- 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, 10:93.
- Kowalewska, M., Danska-Bidzinska, A., Bakula-Zalewska, E. and Bidzinski, M., 2012. Identification of suitable reference genes for gene expression measurement in uterine sarcoma and carcinosarcoma tumors. Clinical Biochemistry, 45: 368–371.
- Lee, J.M., Roche, J.R., Donaghy, D.J., Thrush, A. and Sathish, P., 2010. Validation of reference genes for quantitative RT PCR studies of gene expression in

Archive of SID

www.SID.ir

analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. Physiological Genomics, 21: 389-395.
- Schmittgen, T.D. and Zakrajsek, B.A., 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 46: 69–81.
- Sørby, L.A., Solveig, N.A., Bukholm, I.RK. and Jacobsen, M.B., 2010. Evaluation of suitable reference genes for normalization of real-time reverse transcription PCR analysis in colon cancer. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 29 (144) 1-9.
- Stolf- Moreira, R., Lemos, E.G.M., Beneventi, M.A., Alves, A., Rolla, P., Abdelnoor, R.V., Pereira S.S., Oliveira, M.C.N., Nepomuceno, A.L. and Marcelino-Guimarães, F.C., 2011. Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 46(1) 58-65.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans Hennen, G., Grisar, T. and Heinen, E., 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. Journal of Biotechnology, 75: 291-295.
- Zainuddin, A., Chua, K.H., Abdul Rahim, N. and Makpol, S., 2010. Effect of experimental treatment on GAPDH mRNA expression as a housekeeping gene in human diploid fibroblasts. BMC Molecular Biology, 11: 59-65.

perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). BMC Molecular Biology, 11:8
- Lee, P.D., Sladek, R., Greenwood, C.M.T. and Hudson, T.J., 2001. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. Genome Research, 12: 292-297.
- Li, Q.Q., Skinner, J. and Bennett, J.E., 2012. Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR studies in *Candida glabrata* following azole treatment. BMC Molecular Biology, 13: 22.
- Peng, X.X., Zhao, L.R., Song, Wei., Chu, H.R., Song, S.Y., Li, M., Li, G.Z. and Liang, D.C., 2012. Selection of suitable reference genes for normalization of quantitative Real-Time PCR in cartilage tissue injury and repair in rabbits. International Journal of Molecular Sciences, 13: 14344-14355.
- Pfaffl, M.W., 2004. Quantification strategies in Real-Time PCR. Physiology-Weihenstephan, Technical University of Munich, Center of Life and Food Science Weihenstephan, Freising, Germany Chaper, 3: 87 -112.
- Podevin, N., Swennen, R., Krauss, A., Remy, S. and Henry, I., 2012. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR expression studies of the non-model crop *Musa*. Molecular Breeding, 30: 1237–1252.
- Robert, D.B., Dan, W.H., Robert, A.C. and Brian, J.C., 2005. GAPDH as a housekeeping gene:

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of expression stability of reference genes *ovEF1alpha* and *18S rRNA* under GA3 treatments and temperature and light stresses in Thyme genus

S. Bahador[1]* and B. Rabiei [2]

1*- Corresponding author, M.Sc., Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. Iran
E-mail: S.bahador63@gmail.com
2- Prof., Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. Iran

Received: 09.06.2016 Accepted: 02.01.2017

Abstract

Real-time PCR technique is available for determining changes of gene expression. However, normalizing gene expression data and obtaining reliable results depends on the selection of appropriate reference genes which are stably expressed under different experimental conditions. In this study, we investigated suitability of two commonly used reference genes [elongation factor 1 alpha (*OvEF1alpha*) and 18S ribosomal RNA (*18S rRNA*)] in seven Thyme populations and under exogenously applied gibberellic acid (GA_3) hormone (control, 30, 60 and 90ppm), plant age (young plants and middle-aged plants and temperature/light stress. Results showed that expression levels of both genes in all populations were affected significantly. Plant age did not significantly effect on expression of the two genes. Also, *ovEF1alpha* unaffected by exogenously applied GA_3. Under temperature/light stress, expression of *OvEF1alpha* increased in Babgorgy population but in Babzangy decreased. In contrast, expression of *18S rRNA* in Babgorgy was significantly decreased but has stable expression in Thyme and Babzangy. Thus, these results showed that *ovEF1alpha* for comparison of gene expression between Thyme, Hanza, Sirch and Zarand and *18S rRNA* for Babzangy, Sirch and Hanza or Zarand and Thyme populations are suitable as internal control gene. Also, for temperature/light stress both genes are suitable in *Thymus vulgaris* L. but only *18SrRNA* is suitable in *Thymus caramanicus* Jalas.

Keywords: Thyme, Population, reference genes, Real-Time PCR

Archive of SID

www.SID.ir