

مقایسه بیان دو ژن مرجع GAPDH و EF1 $\alpha$  در کدو (*Cucurbita pepo* L.) تحت پیش

## تیمار اسپرمین و تنش شوری

فاطمه نژادعلی‌مرادی<sup>۱\*</sup>، خسرو منوچهری کلانتری<sup>۱</sup>، فاطمه نصیبی<sup>۱</sup>، مسعود ترکزاده ماهانی<sup>۲</sup> و فرخنده رضانژاد<sup>۱</sup><sup>۱</sup> کرمان، دانشگاه شهیدباهنر، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی<sup>۲</sup> تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی<sup>۳</sup> کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۳



## چکیده

یکی از اولین اثرات تنش‌های مختلف، تغییر در بیان ژن‌های مربوط می‌باشد. بنابراین مطالعه بیان ژن برای بررسی اثر تنش دارای اهمیت ویژه است. بررسی بیان یک ژن نیاز به اندازه‌گیری دقیق و تجدید پذیر میزان mRNA به صورت کمی یا نیمه کمی دارد. برای بهینه‌سازی (نرمال کردن) داده‌ها، انتخاب ژن‌های کنترل درونی (مرجع یا خانه‌دار) مناسب، که بیان آن‌ها در طول تیمار نوسان نداشته باشند، اهمیت دارد. ژن‌های GAPDH و EF1 $\alpha$  در بسیاری مطالعات به عنوان ژن‌های مرجع استفاده می‌شوند. در این پژوهش بیان این دو ژن تحت پیش تیمار اسپرمین (صفر و ۰/۱ میلی مولار) و شوری (صفر و ۸۰ میلی مولار سدیم کلرید) و پایداری بیان آن‌ها در بافت برگ و ریشه گیاه کدو مورد بررسی قرار گرفت. بررسی بیان ژن‌های مرجع نشان داد که بیان ژن GAPDH در دو اندام متفاوت است و تحت تنش شوری و کاربرد اسپرمین نیز تغییر می‌نماید اما بیان EF1 $\alpha$  نسبت به GAPDH در برگ و ریشه از پایداری بیشتری برخوردار است. بنابراین، نتایج پیشنهاد می‌کنند که ژن GAPDH نقش مهمی در مقاومت به تنش شوری در کدو ایفاء می‌کند. همچنین استفاده از ژن مرجع EF1 $\alpha$  در بهینه‌سازی بیان ژن را در کدو تحت تنش شوری پیشنهاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: بیان نیمه کمی، شوری، فاکتور نرمال‌سازی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۲۴۹۸۸۹۰، پست الکترونیکی: alimoradih60@sci.uk.ac.ir

## مقدمه

مانند تقسیم و رشد طولی سلول، همانندسازی، رونویسی، ترجمه، ثبات غشاء و دیواره سلولی، سازمان‌دهی کروماتین، تشکیل ریبوزوم و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی مورد بررسی قرار گرفته است (۱۴ و ۱۹). بسیاری از مطالعات مربوط به مکانیسم‌های دفاعی و تنش در گیاهان بر بیان ژن استوار بوده است. مطالعات رونوشت (ترانسکریپتوم) به ارائه درک بهتری از پاسخ‌های تنش گیاه کمک کرده اند (۲۷). بیان ژن نیاز به سنجش همزمان ژن یا ژن‌های مرجع (کنترل درونی یا خانه‌دار) دارد تا اطمینان حاصل شود که

تنش شوری، بسته به شدت و مدت تنش، تغییراتی در فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیکی مختلف ایجاد و در نهایت منجر به مهار تولید محصول می‌شود (۲۶). پلی آمینها از جمله اسپرمین، ترکیبات نیتروژنی آلیفاتیک با وزن مولکولی پایین و بار مثبت در pH فیزیولوژیکی هستند که در طیف وسیعی از موجودات از باکتریها تا گیاهان و جانوران یافت می‌شوند و به عنوان یکی از مؤثرترین املاح سازگار در برابر تنش زیست محیطی محسوب می‌شوند (۱۴). نقش پلی آمینها در انواع فرآیندهای تنظیمی و سلولی

آفتابگردان طی ۶ مرحله متفاوت نمو برگ (۱۵) اشاره کرد. به طور معمول، ژنهای GAPDH، ژنهای ریبوزومی، سیکلوفیلین، اکتین و EF1 $\alpha$  به عنوان مرجع در گیاهان گزارش شده‌اند اما آدنین فسفوریبوزیل ترانسفراز (Apt) و توبولین نیز در برخی موارد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۷) و (۳۰) بیان این ژنها تا حد کمتری نسبت به سایر ژنهای مرجع یا ژنهای هدف نوسان دارد. به هر حال، گزارشهای اخیر نشان داده‌اند که حتی برخی از شناخته‌شده‌ترین این ژنها که به میزان زیاد نیز استفاده می‌شوند به دلیل بیان متغیر، جهت نرمال‌سازی بررسی بیان، مناسب نمی‌باشند (۶، ۳۹ و ۴۱). کدو (*C. pepo*) یک محصول زراعی اقتصادی مهم و حساس به شوری، به خصوص در مرحله گیاهچه است (۴۳). مطالعات مروری انجام شده نشان داد که هیچ مطالعه منتشر شده‌ای در مورد بهترین و پایدارترین ژن مرجع در کدو و حتی خانواده آن، تحت تنش شوری وجود ندارد. بنابراین، با توجه به گسترش خاکهای شور در کشور و مطالعات بیان ژن به عنوان عوامل تأثیر پذیر اولیه تحت تنشهای مختلف، مطالعات بیان ژن و مکانیزمهای درگیر در شوری مهم می‌باشد. در این راستا، اولین قدم انتخاب ژن مرجع مناسب به عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌سازی داده‌های مربوط به ژنهای هدف، می‌باشد. در این تحقیق پایداری دو ژن مرجع GAPDH و EF1 $\alpha$  در گیاهان قرار گرفته در معرض اسپرین و تنش شوری، به منظور ارزیابی میزان آنها به عنوان کنترل داخلی در مطالعات بیان مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روشها

**کشت گیاه و تیماردهی:** دانه‌های کدو سبز یا کدو تخم پوست کاغذی (*Cucurbita pepo*) در پتری دیشهای حاوی دو لایه کاغذ صافی که با آب مقطر استریل مرطوب شده بودند، در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت جوانه زدند. بعد از ظهور گیاهچه‌ها، دسته‌های ۵ تایی از گیاهچه‌ها به ظروف پلاستیکی که هر کدام

هر نوع تغییر در سیگنال هدف به دلیل تغییر در میزان الگوی استفاده شده جهت تنظیم PCR نیست. در حالت مطلوب، شرایط آزمایش نباید بیان ژن کنترل داخلی را تحت تأثیر قرار دهد (۲۷). با این حال، برخی مطالعات هم نشان داده است که ژن خانه‌دار مورد استفاده برای کمی‌سازی بیان mRNA می‌تواند تحت شرایط تجربی تغییر پیدا کند (۶، ۲۷، ۳۰، ۳۹ و ۴۱). به این دلیل، پیشنهاد شده است که حداقل دو یا سه ژن مرجع باید به عنوان کنترل داخلی استفاده شود تا مانع خطاهای احتمالی حاصل از تغییرات بیان این ژنها شود (۳۴ و ۳۶). به هر حال، غالب محققین در مطالعات مولکولی از یک ژن کنترل داخلی استفاده می‌کنند و در بیشتر موارد، ژن اکتین جهت نرمال‌سازی بیان استفاده می‌شود در حالی که گزارشاتی هم وجود دارد که ژن اکتین بهترین کنترل داخلی مورد استفاده نیست زیرا در طول تیمارهای مختلف تغییرات بیان را نشان می‌دهد (۲۷). همچنین به دلیل اینکه رونویسی زیرواحدهای ریبوزومی توسط داروها و عوامل بیولوژیکی تحت تأثیر قرار می‌گیرد بحثهای متعددی در خصوص استفاده rRNA (18S و 28S) به عنوان کنترل درونی وجود دارد (۳۶). در سالهای اخیر، پایداری بیان ژنهای مرجع در برخی گونه‌ها، بافتها و شرایط مختلف بررسی و نشان داده شده است 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 (۹، ۱۲، ۱۷، ۲۴ و ۳۷).

مطالعات روی بیان ژنهای مرجع بیشتر روی بافتهای انسانی، باکتریها و ویروسها انجام شده‌اند (۳۰). مطالعات محدودی در این زمینه روی برخی گیاهان انجام شده است که از جمله می‌توان به جو (۱۱)، برنج (۲۱)، سپیدار (۴۰)، آراییدوپسیس و توتون (۲۸ و ۳۸)، قهوه و گل اطلسی (۹)، سیب زمینی تحت تیمارهای خشکی، سرما و شوری (۲۴)، گوجه فرنگی تحت تیمار نیتروژن، سرما و نور (۲۳)،

میکرولیتر آنزیم DNase اضافه گردید و سپس حجم آن با آب DEPC به ۱۰ میکرولیتر رسید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند. به منظور مهار عمل آنزیم DNase مقدار ۱ میکرولیتر (50 mM) EDTA به مواد قبل اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه قرار گرفت. از این RNA تیمار شده با آنزیم DNase برای ساخت cDNA در مراحل بعد استفاده گردید.

**طراحی آغازگر:** اولین مرحله در شناسایی ژن، طراحی آغازگرهای مناسب و استفاده از آنها در واکنش PCR است. از آنجاکه توالی ژنهای مورد نظر نامشخص بود، آغازگرها بر اساس توالیهای ژن موجود از سایر گیاهان طراحی گردیدند. اگرچه اولویت با گیاهان همجنس یا هم خانواده است اما از آنجا که تاکنون ژن GAPDH در هیچ گیاه همجنس یا هم خانواده گیاه مورد مطالعه شناسایی نشده بود از توالی ژن GAPDH در گیاهان سایر خانواده‌ها و توالی ژن EF1 $\alpha$  از گیاه هم خانواده، استفاده شد. به این منظور توالی ژن GAPDH در *Betula luminifera* (Accession no: KM586058.1)، *Medicago truncatula* (Accession no: XM\_003595990.2) و *Prunus cerasifera* (Accession no: KP765685.1)، توالی ژن EF1 $\alpha$  از گیاه هم خانواده، در *Cucumis melo* (Accession no: XM\_008459007, XM\_008465698) از بانک ژن NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) گرفته شد. هم‌ردیفی توالیها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW2 صورت گرفت. براساس نقاط حفاظت شده موجود، آغازگرهایی با استفاده از نرم‌افزار Geneious طراحی گردیدند و سپس مناسب بودن آنها به وسیله نرم‌افزار BLAST مورد بررسی قرار گرفت. سنتز آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت پیشگام صورت گرفت و تخلیص آنها با روش MOPC انجام شد. طبق روش شرکت، محلول ذخیره و محلول کاری با استفاده از آغازگرهای لیوفیلیزه تهیه شدند.

حاوی ۶ لیتر محلول غذایی هوگلند با رقت ۱/۲ (pH= 6.2±0.1) بودند تحت کشت هیدروپونیک منتقل شدند. گیاهچه‌های ۱۰ روزه با اندازه یکنواخت جهت تیمار دهی با محلولهای غذایی مختلف پیش‌تیمار شدند: (۱) کنترل: محلول غذایی هوگلند، (۲) اسپرمین (سیگما) (صفر و ۰/۱ میلی مولار) که به محلول غذایی اضافه شد. پس از ۵ روز پیش‌تیمار اسپرمین، هر دو گروه با کلرید سدیم (صفر و ۸۰ میلی مولار) به مدت ۷ روز تیمار شدند. در این تیمارها نیز نمک کلرید سدیم به محلول غذایی تازه اضافه شد. محلول غذایی هر ۲ روز یکبار عوض و با پمپ هوا هوادهی می‌شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. هر تکرار حاوی ظرف پلاستیکی با ۵ گیاه بود. نمونه‌برداری برگ و ریشه برای بررسی شاخصهای مولکولی ۷ روز پس از تیماردهی انجام شد.

**استخراج RNA:** کل RNA از برگ و ریشه تازه گیاه (۱۰۰ میلی‌گرم) با استفاده از کیت استخراج RNA (Qiagen, RNeasy Plant Mini Kit, Germany) به روش ذکر شده در کیت استخراج شد. برای بررسی حضور و ارزیابی خلوص و تعیین غلظت RNA از روشهای اسپکتوفوتومتری با دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000C Spectrophometer, Thermo Scientific, USA) در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز افقی (BioRad, PowerPac Universal, USA) روی ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. پس از الکتروفورز، ژل در دستگاه ژل اسکن مدل MO25889 (UVitec BTS) قرار گرفت و از روی میزان درخشش باندهای مشاهده شده می‌توان مقدار و سالم بودن RNA و همچنین وجود ناخالصی از نوع DNA را تخمین زد (۳۲). به منظور حذف آلودگی احتمالی DNA از آنزیم DNase شرکت تاکارا (TAKARA Bio Inc. DNase I, RNase-free) و به روش ذکر شده در کیت استفاده شد. برای این منظور، ابتدا به یک تیوب عاری از RNase مقدار ۱ میکروگرم (۵  $\mu$ l) RNA، ۱ میکرولیتر بافر (10X Reaction Buffer with MgCl<sub>2</sub>) و ۱

**مطالعات بیان ژن:** از cDNA ساخته شده، به عنوان DNA الگو در واکنش PCR برای بررسی بیان ژن همساخت GAPDH و EF1 $\alpha$  در برگ و ریشه گیاه مورد مطالعه، استفاده شد. بررسی بیان ژن با استفاده از واکنش PCR به صورت نیمه کمی و با استفاده از کیت PCR شرکت تاکارا EmeraldAmp® GT PCR Master Mix, TAKARA Bio (Inc) و طبق روش ذکر شده در کیت صورت پذیرفت. برای این منظور ۵۰ نانوگرم cDNA، ۱ میکرولیتر از آغازگرهای اختصاصی پیشبرنده و برگرداننده با غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار، ۱۰ میکرولیتر مستر میکس (EmeraldAmp® GT PCR Master Mix) درون لوله لیوفیلیزه PCR ریخته و با آب دو بار تقطیر استریل به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده و با پیپت کردن، به‌طور کامل مخلوط شد. PCR توسط ترموسایکلر مدل PTC 1148 (MJ Mini Personal Thermal Cycler BioRad, USA) و طبق مراحل ذکر شده در جدول ۱ انجام شد. پس از بهینه‌سازی واکنش PCR و استفاده از سیکلهای مختلف و انجام آن در شرایط بهینه، کیفیت محصول روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. کمی‌سازی داده‌ها و شدت نسبی باندها با نرم افزار ImageJ اندازه‌گیری شد.

**آنالیز آماری داده‌ها:** آزمایشها بر اساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه توسط نرم افزار SAS انجام شد و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون دانکن در سطح خطای ۰/۰۵ استفاده شد.

### نتایج

مطالعات بهینه‌سازی سنتز پرایمرها، طول قطعه تکثیر شده برای بیان ژن و شرایط بهینه‌سازی برنامه PCR برای دو ژن مرجع همساخت GAPDH و EF1 $\alpha$  در جدول ۱ نشان داده شده است.

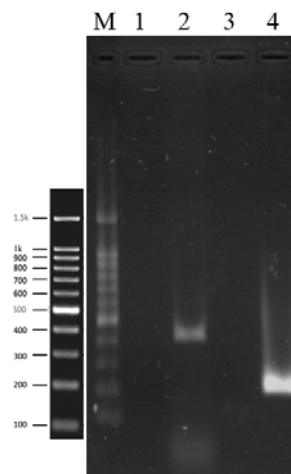
**ساخت cDNA و انجام RT-PCR:** برای انجام RT-PCR، از RNA کل استخراج شده از ریشه و برگ که با آنزیم DNase تیمار شده بود استفاده گردید. بدین منظور با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت فرمنتاز (RevertAid First Strand CDNA Synthesis Kit) و طبق روش ذکر شده در آن از روی RNA تیمار شده، رشته اول cDNA تهیه گردید. در نهایت از این cDNA در PCR به عنوان DNA الگو استفاده شد. مراحل ساخت cDNA به صورت زیر است: مقدار ۶ میکرولیتر از RNA تیمار شده با DNase به همراه ۱ میکرولیتر آغازگر oligo(dT)18 و ۵ میکرولیتر آب دیونیزه در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری ریخته شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه قرار گرفت. این دما موجب از بین رفتن ساختارهای ثانویه RNA می‌شود. بلافاصله میکروتیوب حاوی مواد به مدت ۲ تا ۳ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. این مرحله موجب اتصال آغازگرهای oligo(dT)18 به RNA می‌شود. آغازگر oligo(dT)18 با اتصال به دم پلی A موجود در سمت ۳' mRNA های یوکاریوتی، موجب ساخت cDNA از روی این mRNA می‌شود. در این مرحله ۴ میکرولیتر بافر آنزیم (5X Reaction Buffer)، ۱ میکرولیتر RiboLock RNase Inhibitor (20 u/ul)، ۲ میکرولیتر dNTP (10 mM) و ۱ میکرولیتر RevertAid M-MuLV dNTP Mix (200 u/ul) به میکروتیوب اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه قرار گرفت. در این دما آنزیم RT (Reverse transcriptase) به دنبال آغازگر oligo(dT)18 و با استفاده از dNTPها از روی mRNAهای موجود، cDNA را می‌سازد. واکنش پایانی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه انجام گرفت. واکنشهای تیمار RNA برای حذف آلودگی DNA و ساخت cDNA در دستگاه ترموسایکلر مدل PTC 1148 (MJ Mini Personal Thermal Cycler BioRad, USA) انجام شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده، طول قطعه انتخابی و برنامه PCR برای بیان ژنهای EF1 $\alpha$  و GAPDH در کدو (*C. pepo*)

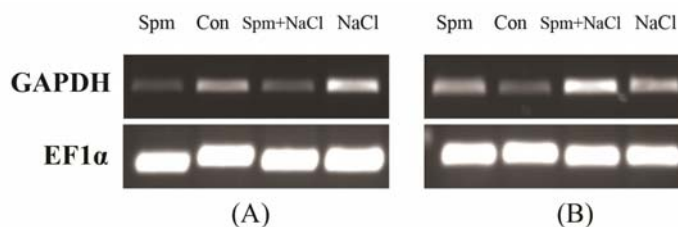
ژن	توالی آغازگر	طول قطعه (جفت باز)	شرایط PCR
EF1 $\alpha$	F: 5'- GAGATGAACAAGAGGTCATTCAA GTATGC-3' R: 5'- GAAATACCAGCCTCAAAACCACCA GT-3'	۲۴۲	یک سیکل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۲۷ سیکل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه در ۵۷ درجه، ۷۲ درجه و یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه
GAPDH	F: 5'- ACCTTGAAATAAATGGGAAG-3' R: 5'- CTTCTGTGTGCTGTAGTTGC- 3'	۳۶۳	یک سیکل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۳۲ سیکل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه در ۶۰ درجه، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه و یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه

برای ارزیابی ثبات بیان ژنهای کنترل داخلی، میزان بیان RNA برای همه نمونه ها (برگ و ریشه در شرایط کنترل و تیمار) تحت شرایط پیش تیمار با اسپرمین و تنش شوری اندازه گیری شد. شدت بیان دو ژن مرجع GAPDH و EF1 $\alpha$  در برگ و ریشه گیاه در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است. همان گونه که در این شکلها نشان داده شده است سطح بیان ژن GAPDH در دو اندام مورد مطالعه و نیز تحت تیمارهای مختلف واکنشهای متفاوتی نشان داد. بیان این ژن در هر دو اندام ریشه و برگ، تحت تنش شوری افزایش یافت اما پیش تیمار اسپرمین به ترتیب منجر به افزایش و کاهش سطح بیان در ریشه و برگ شد. برخلاف این ژن، میزان بیان ژن EF1 $\alpha$  در هر دو اندام ریشه و برگ گیاه در شرایط تیماری مختلف، تغییر معنی داری نشان نداد و در همه اندامها و تیمارهای استفاده شده به نسبت یکسان بود (شکلهای ۲ و ۳).

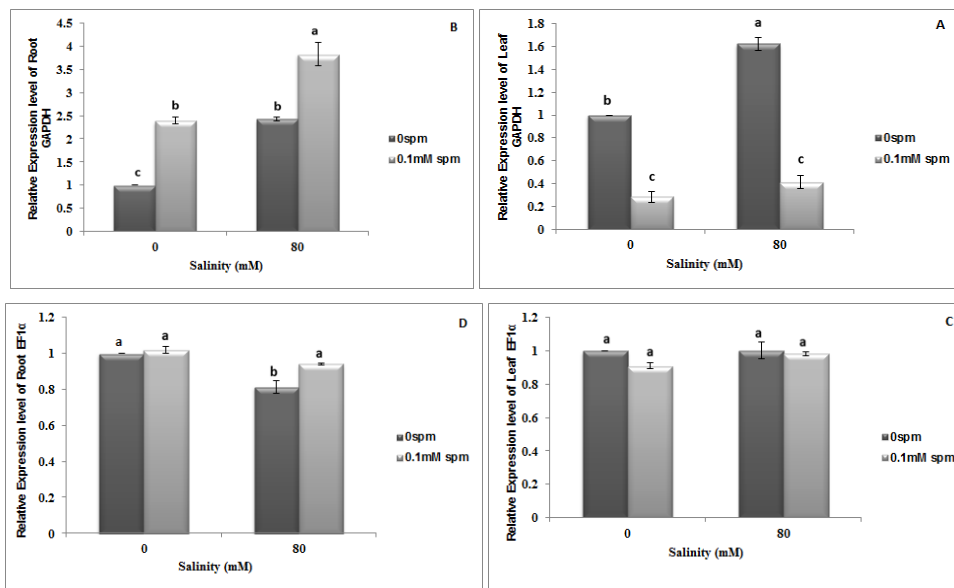
الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد نشان داد که قطعه اختصاصی برای ژن GAPDH و EF1 $\alpha$  به ترتیب به طول تقریبی ۳۶۳ و ۲۴۲ جفت باز به خوبی تکثیر شده است (شکل ۱).



شکل ۱- تکثیر قطعات ۳۶۳ و ۲۴۲ جفت بازی مربوط به ژنهای مرجع GAPDH و EF1 $\alpha$  در گیاه کدو (*C. pepo*) به ترتیب از چپ به راست: M- مارکر، ۱- کنترل منفی مربوط به GAPDH، ۲- قطعه تکثیر شده ۳۶۳ جفت بازی GAPDH، ۳- کنترل منفی مربوط به EF1 $\alpha$  و ۴- قطعه تکثیر شده ۲۴۲ جفت بازی EF1 $\alpha$



شکل ۲- الگوی بیان ژنهای GAPDH و EF1 $\alpha$  در برگ (A) و ریشه (B) گیاه کدو (*C. pepo*) تحت شرایط شاهد (Con)، پیش تیمار اسپرمین (Spm=0.1 mM)، تنش شوری (NaCl= 80 mM) و برهمکنش این دو (Spm+NaCl= 0.1+80mM).



شکل ۳- اثرات اسپرمین برون‌زاد بر سطح بیان نسبی ژنهای مرجع *EF1α* و *GAPDH* در برگ (A) و ریشه (B) کدو (*C. pepo*) تحت تنش شوری. شدت هر باند ژن با نرم افزار *ImageJ* اندازه‌گیری شد و اندازه‌گیری‌ها میانگین  $\pm$  خطای استاندارد می‌باشند. حروف مشابه هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی داری بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

باید طوری انتخاب شود که کمترین میزان تغییرات را در اندامهای مختلف و نیز در شرایط تیماری متفاوت نشان دهد، در حالی که ژن هدف به طور معمول وابسته به شرایط آزمایش، به میزان زیادی تغییر می‌نماید (۲۷ و ۳۰). مطالعه ژنهای مرجع نشان می‌دهد که در اغلب گیاهان از جمله گیاه مورد مطالعه، این ژنها و به ویژه ژنهایی که در اندامهای مختلف و در تنشهای مختلف پایداری نشان می‌دهند شناسایی نشده‌اند. غالب محققین در مطالعات مولکولی از یک ژن کنترل داخلی استفاده می‌کنند و ژن اکتین اغلب جهت نرمال‌سازی بیان استفاده می‌شود در حالی که گزارشاتی هم وجود دارد که ژن اکتین بهترین کنترل داخلی مورد استفاده نیست زیرا در طول تیمارهای مختلف تغییرات بیان را نشان می‌دهد (۲۷). استفاده از چندین ژن کنترل داخلی ( حداقل دو ژن) جهت مقایسه سطوح بیان ژن توسط *Thellin* و همکاران (۱۹۹۹) توصیه شده است (۳۴). *Vandesompele* و همکاران (۲۰۰۲) دلایل و شواهدی ارائه کردند که روند نرمال‌سازی معمول بر اساس یک ژن کنترل داخلی منجر به نرمال‌سازی اشتباه

به‌طور قابل توجه بیان این ژن در شرایط PCR مشابه ژن *GAPDH* (۳۲ سیکل)، بسیار بالا بود و حتی با کاهش سیکلها به ۲۷ و ۲۰ نیز بیان بالاتر و به نسبت پایدار این ژن دیده شد. چون در شرایط ۳۲ سیکل میزان اشباع خیلی بالا بود، در نتیجه تعداد سیکل ۲۷ برای آنالیز بیان استفاده شد که خیلی از شرایط ژن مرجع دیگر دور نباشد.

### 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. الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد نشان داد که قطعه اختصاصی برای ژن *GAPDH* و *EF1α* به ترتیب به طول تقریبی ۳۶۳ و ۲۴۲ جفت باز به خوبی تکثیر شده است. این مطلب نشان دهنده طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها می‌باشد.

انتخاب ژن کنترل داخلی مناسب، جهت تعیین بیان ژن حتی در مطالعات اولیه مولکولی خیلی مهم است و این ژن

کاتالاز، حساسیت گیاهان به شوری افزایش یافت. این محققین گزارش کردند که بیش‌بیان GAPDH، بیان ژن کاتالاز را تحت تأثیر قرار می‌دهد و از این طریق در پاک‌سازی رادیکالهای آزاد درگیر می‌شود و به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند (۴۲). بنابراین ممکن است افزایش بیان این ژن در گیاه کدو تحت اثر شوری، نشان دهنده نقش دفاعی آن در برابر شوری و نیز تنظیم فعالیت کاتالاز می‌باشد. از طرفی مطالعات در آرابیدوپسیس نشان داده است که آنزیم GAPDH به طور مستقیم با  $H_2O_2$  برهمکنش دارد که نشان دهنده نقش آن در تنظیم سیگنالینگ وابسته به گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن در گیاهان می‌باشد. همچنین گزارش شده است که این ژن نقش چند عملکردی دارد و در حفظ ATP سلولی، متابولیسم کربوهیدرات، مقاومت در برابر تنش‌های غیر زیستی و باروری عادی در آرابیدوپسیس دخالت دارد (۳۱). گزارشات نشان می‌دهد فعالیت آنزیمی GAPDH گلیکولیتیک در طول عفونت افزایش می‌یابد. افزایش فعالیت گلیکولیتیک منجر به ترویج بقای سلول می‌شود. علاوه بر این، محصول اصلی گلیکولیز پیرووات می‌باشد، که یک ربایشگر مستقیم ROS است. بنابراین، در گیاهان وحشی تحت پاسخهای ایمنی، افزایش گلیکولیز ممکن است از طریق افزایش سطوح پیرووات رباینده ROS حائز اهمیت باشد. علاوه بر این، سیگنالینگ دفاعی گیاه یک فرآیند پر انرژی است. گلیکولیز ATP تولید می‌کند. بنابراین، افزایش در فعالیت GAPDH گلیکولیتیک طی تنش می‌تواند انرژی اضافی مورد نیاز برای برنامه ریزی مجدد سلولی در ارتباط با دفاع را فراهم کند. به هر جهت، اینکه آیا GAPDH به طور مستقیم در پاک‌سازی ROS نقش دارد هنوز ناشناخته است (۱۸). به هر حال، نتایج مخالفی نیز وجود دارد به طوری که Gu و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کرده‌اند از بین هشت ژن مرجعی که تحت تنش‌های مختلف در گیاه داودی بررسی شده است، GAPDH پایدارترین ژن مرجع در تنش گرما، پنجمین ژن

می‌شود (۳۶). اخیراً پایداری بیان ژنهای مرجع در برخی گونه‌ها، بافتها و شرایط مختلف بررسی شده است (۶، ۱۳، ۳۹ و ۴۱). مطالعات در قهوه و گل اطلسی نشان داد 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 (۹ و ۲۴). در این تحقیق، نتایج بیان دو ژن مرجع GAPDH و EF1 $\alpha$  در کدو واکنش متفاوت نشان داد به این صورت که بیان GAPDH هم در اندامهای متفاوت و هم تحت تیمارهای مختلف استفاده شده نوسان داشت اما میزان بیان ژن EF1 $\alpha$  در همه آزمایشات به نسبت یکسان بود. در نتیجه ژن EF1 $\alpha$  به عنوان اولین ژن پایدار کنترل درونی برای گونه مورد مطالعه معرفی شد که به عنوان اولین گزارش به عنوان ژن مرجع پایدار برای این گونه شناسایی و معرفی شد. مشابه این نتایج، تغییر ژنهای مرجع در برخی گیاهان دیگر، در اندامها، مراحل نموی و نیز تحت تیمارهای مختلف گزارش شده است. برای مثال، تغییر ژنهای مرجع در سیب زمینی تحت تیمارهای خشکی، سرما و شوری (۲۷)، گوجه فرنگی تحت تیمار نیتروژن، سرما و نور (۲۳)، آفتابگردان طی ۶ مرحله متفاوت نمو برگ (۱۵)، گندم در برهمکنش با بیمارگر *Mycosphaerella graminicola* (۶) و سپیدار طی مراحل متفاوت نموی گیاه (۴۰) گزارش شده است. همچنین، مشابه نتایج این تحقیق، گزارشاتی در مورد تغییرپذیری بیان ژن GAPDH که به وفور به عنوان ژن مرجع استفاده می‌شود وجود دارد (۶، ۲۷، ۳۰، ۳۹، ۴۱ و ۴۲). Zhang و همکاران در ۲۰۱۱ گزارش کردند که بیان ژن GAPDH تحت شوری در برنج افزایش می‌یابد به طوری که با تراریختی گیاه و بیش‌بیان آن، مقاومت گیاه به شوری افزایش یافت. آنها گزارش کردند که تحت تنش، گروههای واکنش‌پذیر اکسیژن افزایش می‌یابند و کاتالاز به عنوان آنزیم اصلی در پاک‌سازی این گونه‌ها فعالیت می‌کند. ضمن تراریختی گیاه مورد مطالعه و کاهش فعالیت

EF1 $\alpha$  در گزارشات متعددی به عنوان یک کنترل داخلی ثابت معرفی شده است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در مطالعه ای که روی هفت ژن کنترل داخلی (بتا-توبولین، سیکلوفیلین، اکتین، EF1 $\alpha$ ، 18S rRNA، آدنین فسفوریبوزیل ترانسفراز و پروتئین L2 ریبوزومی سیتوپلاسمی) گیاه سیب زمینی تحت تنشهای مختلف زیستی و غیر زیستی انجام شده گزارش شده است که از بین هفت ژن ذکر شده، EF1 $\alpha$  پایدارترین ژن کنترل داخلی است، در حالی که اکتین و توبولین کمترین میزان پایداری بیان ژن را نشان دادند (۲۷). همچنین این ژن در طیف گسترده ای از شرایط آزمایشی که در سیب زمینی، هلو و برنج انجام شده است از پایداری بیان بیشتری برخوردار بوده است (۱۰، ۲۷ و ۳۵) به طوری که در سیب زمینی و گوجه فرنگی تحت تنش سرما (۲۳ و ۲۷)، برنج تحت تنش گرما و سرما (۱۰)، و گل داودی تحت تنش گرما (۱۶) پایدار بوده است. همچنین در مطالعه‌ای که اخیراً بر روی گیاه رستاخیزی *craterostigma plantagineum* تحت تنش کم‌آبی توسط Juszczak و Bartels (۲۰۱۷) انجام شده است EF1 $\alpha$  به عنوان پایدارترین ژن مرجع در این گیاه انتخاب شده است (۲۰). به هر حال بر خلاف نتایج ذکر شده، Qi و همکاران (۲۰۱۰) نتایج ضد و نقیضی گزارش کردند. آنها بیان کردند که سطح بیان این ژن در گیاه کلم تحت تنش خشکی پایدار نیست و GAPDH بهترین ژن مرجع در این شرایط است اما از طرفی گزارش نمودند EF1 $\alpha$  بهترین انتخاب برای نرمال‌سازی بیان ژن در میان بافتهای مختلف گیاه کلم می باشد (۳۰). ژن کنترل داخلی ایده آل، باید سطح بیان ثابتی در تمام شرایط آزمایش داشته باشد، با این حال، هیچ ژنی وجود ندارد که بیان بسیار ثابت در تمام شرایط داشته باشد. هنگام انتخاب ژنهای مرجع، جانب احتیاط باید رعایت شود حتی هنگامی که بیان آن ژن مرجع تحت چندین شرایط و گونه وابسته به هم ثابت باشد. در این بررسی نیز بر روی نمونه‌های برگ و ریشه گیاه و تحت شرایط مختلف آزمایش بیان

پایدار در تنش آلودگی با شته و سومین ژن پایدار تحت تنش غرقابی بود (۱۶). همچنین Petriccione و همکاران (۲۰۱۵) دو ژن GAPDH و protein phosphatase 2A (PP2A)، را به عنوان پایدارترین ژنهای مرجع در برگ کیوی آلوده با باکتری سودوموناس گزارش کردند (۲۹). Cruz و همکاران در ۲۰۰۹ نیز گزارش کردند که GAPDH به عنوان مناسب‌ترین ژن مرجع در بین هشت ژن مورد مطالعه، جهت نرمال‌سازی در برگهای ارقام مختلف قهوه، انتخاب شد (۱۳). بنابراین این ژن به تنهایی نمی‌تواند ژن مرجع باشد و ممکن است منجر به نتایج اشتباه در شرایط آزمایش خاص شود. مطالعات بیشتری در مورد عملکرد و تغییرات این ژن در سلولهای حیوانی وجود دارد که نشان داده‌اند GAPDH نه فقط به عنوان یک جزء مسیر گلیکولیتیک عمل می‌کند، بلکه ممکن است در فرآیندهای دیگری از جمله تکثیر سلول و ایجاد سرطان دخالت داشته باشد (۲۵). همچنین اسمعیلی و همکاران (۱۳۸۹) در بررسی بیان ژن GAPDH در بیماران مبتلا به سرطان سینه گزارش کردند که این ژن به عنوان ژن مرجع مناسب توصیه نمی‌شود (۱). مطالعات در خصوص اثر پلی‌آمین اسپرمین بر بیان ژن GAPDH نادر است. پیشنهاد شده است پلی‌آمینها نقش اساسی در تنظیم پاسخهای دفاعی گیاهان به تنشهای زیست محیطی متنوع شامل سمیت فلزی، تنش اکسیداتیو، خشکی، شوری و تنش سرما دارند و این نقش آنها در تحمل به تنش به تعدیل سیستمهای آنتی‌اکسیدانی مربوط می‌شود (۱۴ و ۲۲). به نظر می‌رسد اسپرمین از طریق تجمع یونهای سدیم ناشی از تنش شوری در ریشه گیاه و جلوگیری از انتقال این یون به بخش هوایی گیاه مقاومت گیاه به شوری را افزایش می‌دهد. بنابراین ریشه گیاه که مستقیم (کشت هیدروپونیک) در معرض شوری قرار دارد بیان ژن GAPDH بالاتری را نشان داده ولی در برگ احتمالاً از طریق مهار انتقال یون سدیم و اثرات آنتی‌اکسیدانی اسپرمین میزان بیان آن کاهش یافته است.



غیر زیستی، شد (۶ و ۲۷). در روند عملکرد این دو ژن در اندام‌های مختلف و نیز تحت تنش تفاوت چشمگیری مشاهده شد. به طوری که برعکس GAPDH، ژن EF1 $\alpha$  از پایداری به نسبت کاملی برخوردار بود و به همین دلیل به مطالعه سایر ژنهای مرجع پرداخته نشد. ممکن است کار محققین دیگر روی تنش نبوده است یا یک اندام را استفاده می‌کردند و یا در گیاه آنها تغییرات این ژن وجود نداشته است و یا خطای کار را نادیده گرفتند. با توجه به نتایج این تحقیق به محققان توصیه می‌شود که بهینه‌سازی ژن مرجع، اولین قدم در مطالعات مولکولی می‌باشد تا گریبان‌گیر مشکلات احتمالی مشابه این تحقیق نشوند.

متفاوتی از ژنهای مرجع مشاهده شد. بنابراین برای نرمال‌سازی سطح بیان، انتخاب ژن کنترل داخلی خیلی مهم است. قابل ذکر است که در مطالعات مروری منتشر شده به ویژه مطالعات داخل کشور دیده شد که اغلب محققین از یک ژن مرجع استفاده می‌کنند (۲، ۳، ۴، ۵، ۷ و ۸). در این تحقیق نیز در ابتدا ژن GAPDH با توجه اینکه در اغلب مطالعات به عنوان کنترل داخلی استفاده شده گزارش شده بود انتخاب شد (۲، ۴، ۵، ۷ و ۳۳). بیان غیر یکنواخت این ژن در اندامها و تیمارهای مختلف این تحقیق باعث انجام مطالعات بیشتر و در نهایت انتخاب ژن EF1 $\alpha$ ، شناخته شده به عنوان پایدارترین ژن مرجع تحت تنشهای زیستی و

## منابع

- ۱- اسمعیلی، ر. مجید زاده اردبیلی، ک. عبدلی، ن. ۱۳۸۹. اندازه‌گیری ژن uPA در سرطان پستان: انتخاب ژن خانه‌دار. فصلنامه بیماری‌های پستان ایران. جلد ۳ (۳ و ۴). صفحه ۷-۱۵.
- ۲- تقی‌زاده، م. احسانپور، ع.ا. بررسی اثر کلرید کبالت بر سطح برگ، کرومیل، کاروتنوئید و بیان ژن ACC اکسیداز گیاه سیب‌زمینی *Solanum tuberosum* در کشت در شیشه. ۱۳۹۲. مجله سلول و بافت. جلد ۴ (۳). صفحه ۲۸۷-۲۹۵.
- ۳- جدیری، س. دهقان نیری، ف. ۱۳۹۴. بررسی بیان ژنهای عوامل رونویسی MADS-box مؤثر در تشکیل گل زعفران (*Crocus sativus* L.). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، شماره ۴. صفحه ۴۸۸-۴۹۹.
- ۴- حسین‌پناهی، ژ. معروفی، ا. بهرام‌نژاد، ب. ۱۳۹۵. جداسازی و الگوی بیان ژن  $\beta$ -آمیرین‌سنتاز در سطح رونوشت در گیاه دارویی کاسنی (*Cichorium intibus* L.). مجله ژنتیک نوین، شماره ۳. صفحه ۳۹۹-۴۰۹.
- ۵- شمسی‌فرد، م.ح. ۱۳۹۲. بررسی بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز در سطح رونوشت در بافتهای مختلف گیاه دارویی سیاه‌دانه quantitative plant gene expression studies. BMC plant biology 4(1):14
- 11- Burton R.A., Shirley N.J., King B.J., Harvey A.J. and Fincher G.B. 2004. The CesA gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. Plant physiology. 134(1):224-236.
- 9- Barsalobres-Cavallari C.F., Severino F.E., Maluf M.P. and Maia I.G. 2009. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. BMC molecular biology 10(1):1.
- 10- Brunner A.M., Yakovlev I.A. and Strauss S.H. 2004. Validating internal controls for
- (*Nigella sativa* L.). پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه کردستان.
- ۶- غلام‌نژاد، ج. سنجریان، ف. محمدی گل‌تپه، ا. صفایی، ن. رضوی، خ. ۱۳۹۴. ارزیابی میزان تغییرات بیان ژنهای خانه‌دار در برهمکنش گندم با بیمارگر *Mycosphaerella graminicola* با روش Reverse northern dot blot. مجله زیست‌فناوری گیاهان زراعی، شماره ۱۲. صفحه ۱-۱۰.
- ۷- موسوی، س.ط. جعفریان، و. بهاری، ع. ۱۳۹۵. بررسی مولکولی و تعیین ویژگی‌های عملکردی جلبک *Chlorella* با رویکرد بیان ژن هیدروژناز. مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران، شماره ۲۹. صفحه ۲۱-۳۶.
- ۸- میرشمسی کاخکی، ا. بهرامی، ا.ر. شهریاری‌احمدی، ف. ا. گری، ج. ۱۳۹۲. بررسی بیان ژن *ein2* در گیاه اطلسی (*Petunia hybrida*) و مطالعه نقش تنظیم‌کنندگی آن در مسیر انتقال پیام اتیلن. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، شماره ۴. صفحه ۵۷۲-۵۸۶.

- 12- Chen L. Zhong H.y. Kuang, J.f. Li, J.g. Lu, W.j. Chen J.y. 2011. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta*. 234(2):377-390.
- 13- Cruz F. Kalaoun S. Nobile P. Colombo C. Almeida J. Barros L.M. Romano E. Grossi-de-Sá M.F. Vaslin M. and Alves-Ferreira M. 2009. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Molecular Breeding*. 23(4):607-616.
- 14- Fariduddin Q. Mir, B.A. Yusuf M. Ahmad A. 2013. Comparative roles of brassinosteroids and polyamines in salt stress tolerance. *Acta physiologiae plantarum*. 35(7):2037-2053.
- 15- Fernandez P. Di Rienzo J.A. Moschen S. Dosio G.A. Aguirrezábal L.A. Hopp H.E. Paniego N. and Heinz R.A. 2011. Comparison of predictive methods and biological validation for qPCR reference genes in sunflower leaf senescence transcript analysis. *Plant cell reports*. 30(1):63-74.
- 16- Gu C. Chen S. Liu Z. Shan H. Luo H. Guan Z. and Chen F. 2011. Reference gene selection for quantitative real-time PCR in *Chrysanthemum* subjected to biotic and abiotic stress. *Molecular Biotechnology*. 49(2):192-197.
- 17- Guénin S. Mauriat M. Pelloux J. Van Wuytswinkel O. Bellini C. Gutierrez L. 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of experimental botany*. 60(2):487-493.
- 18- Henry E. Fung N. Liu J. Drakakaki G. and Coaker G. 2015. Beyond glycolysis: GAPDHs are multi-functional enzymes involved in regulation of ROS, autophagy, and plant immune responses. *PLoS Genet* 11(4):e1005199.
- 19- Hussain S.S. Ali, M. Ahmad M. Siddique K.H. 2011. Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology advances*. 29(3):300-311.
- 20- Juszczak I. and Bartels D. 2017. LEA gene expression, RNA stability and pigment accumulation in three closely related Linderniaceae species differing in desiccation tolerance. *Plant Science*. 255:59-71.
- 21- Kim B.R. Nam H.Y. Kim S.U. Kim S.I. and Chang Y.J. 2003. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnology letters*. 25(21):1869-1872.
- 22- Liu J.H. Wang W. Wu H. Gong X. and Moriguchi T. 2015. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Frontiers in plant science*. 6:827.
- 23- Løvdaal 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.
- 24- Mallona I. Lischewski S. Weiss J. Hause B. and Egea-Cortines M. 2010. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biology*. 10(1):4
- 25- McNulty S.E. and Toscano W. 1995. Transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochemical and biophysical research communications*. 212(1):165-171.
- 26- Munns R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist* 167:645-663.
- 27- Nicot N. Hausman J.F. Hoffmann L. and Evers D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of experimental botany*, 56(421):2907-2914.
- 28- Orsel M. Krapp A. and Daniel-Vedele F. 2002. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant physiology*. 129:886-896.
- 29- Petriccione M. Mastrobuoni F. Zampella L. and Scortichini M. 2015. Reference gene selection for normalization of RT-qPCR gene expression data from *Actinidia deliciosa* leaves infected with *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Scientific reports*. 5:16961.
- 30- Qi J. Yu S. Zhang F. Shen X. Zhao. Yu Y. and Zhang D. 2010. Reference gene selection for real-time quantitative polymerase chain reaction of mRNA transcript levels in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Molecular Biology Reporter*. 28:597-604.
- 31- Rius S.P. Casati P. Iglesias A.A. and Gomez-Casati D.F. 2008. Characterization of *Arabidopsis* lines deficient in GAPC-1, a cytosolic NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant physiology*. 148(3):1655-1667.
- 32- Sambrook J. and Russell D.W. 2001. In vitro mutagenesis using double-stranded DNA

- templates: selection of mutants with DpnI. *Molecular cloning*. 2:13-19.
- 33- Suzuki T. Higgins P. Crawford D. 2000. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 29:332-337.
- 34- 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*. 75:291-295.
- 35- Tong Z. Gao Z. Wang F. Zhou J. and Zhang Z. 2009. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*. 10(1):71.
- 36- Vandesompele J. De Preter K. Pattyn F. Poppe B. Van Roy N. De Paep A. and Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 3(7): research0034-1.
- 37- Vashisth T. Johnson L.K. Malladi A. 2011. An efficient RNA isolation procedure and identification of reference genes for normalization of gene expression in blueberry. *Plant cell reports*. 30:2167-2176.
- 38- Volkov R.A. Panchuk I.I. and Schöffl F. 2003. Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. *Journal of Experimental Botany*. 54:2343-2349.
- 39- Wu Z.J. Tian C. Jiang Q. Li X.H. and Zhuang J. 2016. Selection of suitable reference genes for qRT-PCR normalization during leaf development and hormonal stimuli in tea plant (*Camellia sinensis*). *Scientific reports*, 6:19748.
- 40- Xu M. Zhang B. Su X. Zhang S. and Huang M. 2011. Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Populus*. *Analytical biochemistry*. 408(2):337-339.
- 41- Yang Y. Zhang X. Chen Y. Guo J. Ling H. Gao S. Su Y. Que Y. and Xu L. 2016. Selection of Reference Genes for Normalization of MicroRNA Expression by RT-qPCR in Sugarcane Buds under Cold Stress. *Frontiers in plant science*. 7:86.
- 42- Zhang X.H. Rao X.L. Shi H.T. Li R.J. and Lu Y.T. 2011. Overexpression of a cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene *OsGAPC3* confers salt tolerance in rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 107:1-11.
- 43- Zhu J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Science*. 6:66-71.

## Comparison of two reference genes (*GAPDH* and *EF1 $\alpha$* ) expression in medicinal pumpkin plant (*Cucurbita pepo* L.) during spermine pretreatment and salt stress

Nejad-Alimoradi F.<sup>1,2</sup>, Nasibi F.<sup>1</sup>, Manoochehri Kalantari Kh.<sup>1</sup>, Torkzadeh-Mahani M.<sup>3</sup> and Rezanejad F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Biology Dept., Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

<sup>3</sup> Biotechnology Dept., Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

### Abstract

One of the first effects of various stresses, is related Changes in gene expression. So, study of the effect of stress on gene expression is of special importance. The analysis of gene expression requires precise, and reproducible measurements for quantitative or semi-quantitative mRNA level. For normalization of the data, the selection of suitable internal control (reference or housekeeping) genes, whose expression do not fluctuate during treatments is important. The *GAPDH* and *EF1 $\alpha$*  genes are used as reference genes in many studies. In this study, the expression of two reference genes under spermine (0 and 0.1 mM) pretreatment, salinity (0 and 80 mM NaCl), and the stability of their expression in leaves and roots of pumpkin were investigated. Study of the reference genes expression showed that, the expression of *GAPDH* gene varied in both different organs and under salinity stress and spm application, but *EF1 $\alpha$*  gene has more stable expression than *GAPDH* gene in the roots and leaves. Therefore, the results of this study suggests that *GAPDH* plays an important role in salt stress tolerance in pumpkin, and also *EF1 $\alpha$* , can be used as suitable reference gene for normalization of gene expression analysis in pumpkin under salinity stress.

**Key words:** Normalization factor, Salinity, Semi- Semi-Quantitative expression