Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

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

**Hamidreza Ghorbani**

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

**Seyyed Hamidreza Hashemi-petroudi**

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

**Mehdi Rostami**

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

## Abstract

### Objective

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

### Materials and methods

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

**Results and Conclusions**

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

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

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

Agricultural Biotechnology Journal 11(3), 19-36.
DOI: 10.22103/jab.2019.13158.1095
Received: April 8, 2019; Accepted: September 14, 2019
© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

# بررسی پایداری بیان برخی ژن‌های مرجع به‌روش Real-Time PCR تحت تنش زیستی در گیاه برنج

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

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

**مهدی رستمی**
مربی پژوهش معاونت مازندران، موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، آمل، ایران. ایمیل: mrostamid@gmail.com

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

## چکیده

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

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

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

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

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

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

## مقدمه

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

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

در سال‌های اخیر، پایداری بیان ژن‌های مرجع در برخی از گونه‌ها، بافت‌ها و شرایط مختلف بررسی و نشان داده شده که ژن مرجع در بافت‌های مختلف در یک ژنوتیپ و همچنین بافت یکسان در ژنوتیپ‌های مختلف، متفاوت است. این تغییر بیان ژن مرجع، ضرورت بررسی پایداری ژن مرجع در همه نمونه‌های مورد آزمایش را تأیید می‌کند (Mallona et al. 2010; Vashisth et al. 2011) مطالعات محدودی در این زمینه روی برخی گیاهان انجام شده است که از جمله می‌توان به گیاه جو (Burton et al. 2004)، برنج (Kim et al. 2003) و همچنین آرابیدوپسیس (Vandesompele et al. 2002) اشاره کرد. بررسی‌ها روی گیاه برنج نشان داده است که انتخاب ژن‌های مرجع نیازمند دقت بسیار بالایی می‌باشد؛ بخصوص زمانی که بیان آن ژن مرجع تحت شرایط مختلف محیطی و گونه‌های نزدیک به هم ثابت باشد. همچنین اثبات نمودند که ثبات بیان ژن در بافت ساقه و ریشه در ارقام مختلف برنج قابل تشخیص بوده و در این زمینه، ژن‌های EF-1α، UBI5، GADPH و 18SrRNA به‌عنوان ژن مرجع مناسب پیشنهاد شده‌اند (Caldana et al. 2007). با توجه به اینکه تجزیه دقیق بیان ژن به‌منظور شناسایی سازوکارهای سازگاری به تنش زیستی امری ضروری است؛ هدف از این تحقیق، بررسی کارایی تعدادی از ژن‌های مرجع به‌منظور شناسایی و معرفی ژن‌های مرجع مناسب برای بهینه‌سازی اطلاعات حاصل از PCR زمان واقعی در شرایط نرمال و تنش زیستی در گیاه برنج می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق از یک جدایه قارچ عامل بیماری Rhizoctonia solani RBL1 با گروه آناستوموزی AG1-IA و شماره دسترسی HM211085 از پایگاه مرکز اطلاعات ملی زیست فن‌آوری (NCBI)، با توان بالای بیماری‌زایی (بیماری سوختگی غلاف) در برنج جهت مایه‌زنی گیاهچه‌ها (Naeimi et al. 2010)، سیلیکات پتاسیم (غلظت ۲ میلی‌مولار) به‌عنوان القاءکننده شیمیایی مقاومت، یک جدایه از باکتری Pseudomonas دارای خاصیت آنتاگونیستی (۲۷۵) و یک جدایه دیگر از همین جنس با خاصیت القاءکنندگی (۲۴۳) استفاده شد. برای انجام این کار، ابتدا بذور رقم پرمحصول فجر (رقم حساس به قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف) ضدعفونی گردید و پس از شستشوی سطحی با آب مقطر استریل، به مدت ۲۴ ساعت در سوسپانسیون باکتری جدایه‌های Pseudomona قرار گرفتند. غلظت باکتری در سوسپانسیون $۲ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ml بود که در یک واحد چگالی نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و تعیین جمعیت شد. سپس بذور جوانه زده در گلدان‌های حاوی خاک استریل کاشته شده و گیاهچه‌های ۲۸ روزه برای مایه‌زنی با قارچ و سایر تیمارها مورد استفاده قرار گرفتند.

قارچ عامل بیماری به مدت ۳ روز در محیط کشت محتوی آنتی بیوتیک استرپتومایسین ۰/۰۱ ٪ سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA) و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد رشد نمود. سپس دیسک پنج میلی‌متری از قارچ به مرکز محیط کشت مذکور که در اطراف آن خلال‌هایی به اندازه یک سانتی‌متر به صورت مورب قرار داشت، کشت و پس از ۷۲ ساعت نگهداری در درجه حرارت ۲۷ درجه سانتیگراد، جهت تلقیح استفاده شد. مایه تلقیح، روی پنجه اصلی گیاهچه به تعداد ۳ عدد بین غلاف‌های اول، دوم و سوم گیاهچه، قرار گرفتند. تیمارهای آزمایش در شرایط گلخانه به شرح ذیل اعمال شدند (جدول ۱).

نمونه‌برداری از غلاف برگی گیاهچه‌ها در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری انجام شد. نمونه‌ها در هاون چینی محتوی ازت مایع خرد و بلافاصله به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. جهت انتخاب ژن کاندید و طراحی آغازگر از ژن‌های مرجع براساس داده‌های منتشر شده در پایگاه داده‌های NCBI برای گیاه برنج استفاده گردید. ژن‌های مورد نظر شامل UBQ5، eIF4A، Actin11، Actin1، UBC، Cylophilin، 18SrRNA و GAPDH می‌باشند (جدول ۲). طراحی آغازگر با استفاده از سایت پرایمر ۳ و نرم افزار OLIGO (ورژن 1.1.2.19) برای تکثیر قسمتی از ژن واقع در منطقه حفاظت شده[1] (CDS) آن انجام شد.

استخراج RNA از بافت برگ بر اساس روش ترایزول که حاوی گوانیدین ایزوسیانات[2] است، انجام گردید (Chomczynski & Sacchi 1987). کیفیت و کمیت RNA استخراجی با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های RNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد و مقایسه آن با نشانگر وزنی استاندارد (۱ kb) نشان داد که RNAهای استخراج شده از نمونه‌های بافت برگ از کمیت و کیفیت مناسب جهت ساخت cDNA برخوردار هستند. برای حذف آلودگی DNA از RNase-free DNase I (Thermo Scientific) استفاده شد و ساخت رشته cDNA با استفاده از کیت شرکت Thermo scientific و طبق دستورالعمل آن انجام گرفت. نمونه cDNA ساخته شده برای انجام تمام واکنش‌ها به میزان ۹ برابر توسط آب دوبار تقطیر رقیق شد. مطالعه بیان ژن با استفاده از دستگاه C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) و کیت SYBR Green I PCR Master Mix (Termo Scientific, USA) در سه تکرار مستقل انجام گرفت. شرایط بهینه برای اجرای واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل SYBR Green به‌مقدار ۵ میکرولیتر، آغازگر رفت و برگشت ۰/۳ میکرولیتر، نمونه cDNA ۲ میکرولیتر و آب عاری از نوکلئاز ۲/۷ میکرولیتر فراهم گردید. چرخه دمایی برای تکثیر نمونه‌ها شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه بود که در ۴۰ چرخه تکرار شد.

۱. Conserved domain sequence

۱. Guanidinium isothiocyanate

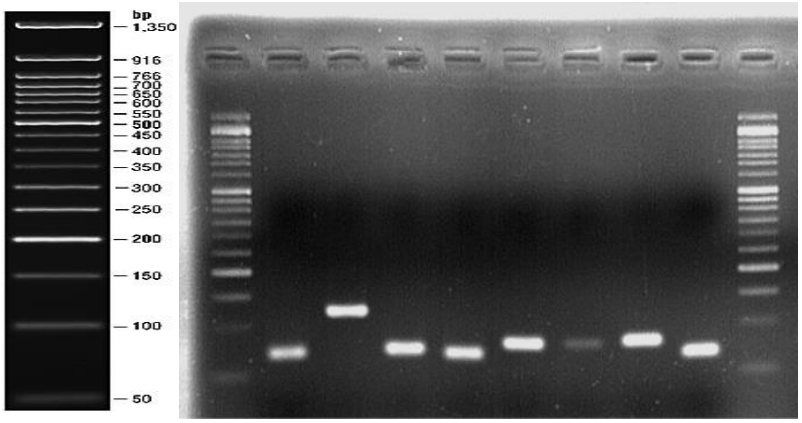


Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

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

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

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




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

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

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

تجزیه و تحلیل منحنی ذوب نمونه‌ها بررسی و از نرم‌افزارهای NormFinder (Andersen et al. 2004) و BestKeeper (Pfaffl et al. 2004) به‌منظور رتبه‌بندی پایداری و اندازه‌گیری بیان ژن پایدار در تمامی نمونه‌ها استفاده شد. در نرم‌افزار NormFinder مقادیر Ct حاصل از آزمایش، با استفاده از رابطه ΔCt و فرمول $2^{-\Delta Ct}$ به کمیت‌های نسبی تبدیل می‌شوند (Vandesompele et al. 2002) درحالی‌که در نرم‌افزار BestKeeper مقادیر Ct بدون تبدیل شدن به مقادیر بیان نسبی، مورد استفاده قرار می‌گیرند. در نهایت، میانگین هندسی میزان بیان ژن‌های مرجع انتخاب شده؛ به‌عنوان ژن کنترل داخلی در آزمایش در نظر گرفته شد و بیان ژن‌های مرجع نسبت به آن با استفاده از فرمول لیواک (Livak & Schmittgen 2001) در نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 محاسبه شد.

۲. Primer dimer

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

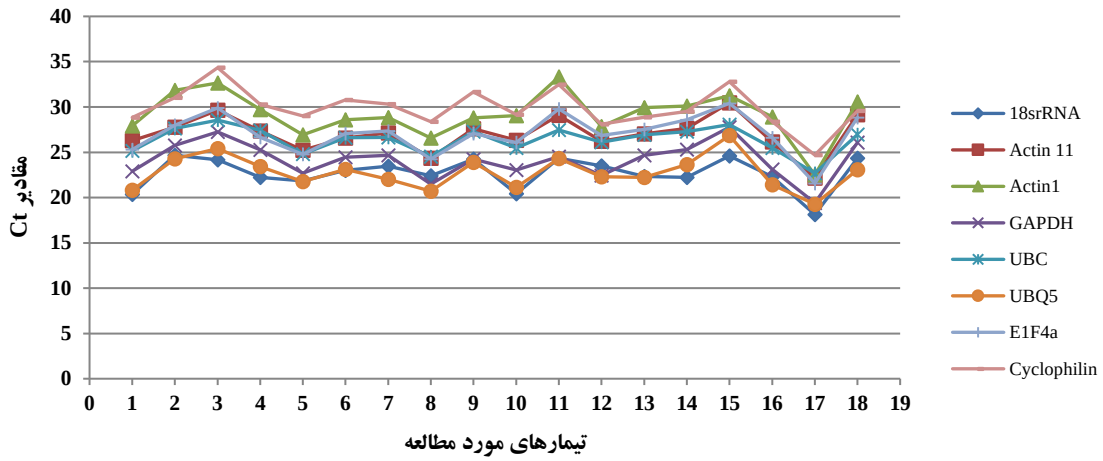
**Table 2. Rice reference genes and the primer information.**

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

## نتایج و بحث

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

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




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

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

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

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

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

| ژن Gene | 18SrRNA | Actin11 | Actin1 | GAPDH | UBC | UBQ5 | eIF4a | Cyclophilin |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| حداقل Min. | 18.12 | 22.16 | 22.49 | 19.41 | 22.68 | 19.27 | 21.57 | 24.69 |
| حداکثر Max. | 24.66 | 30.46 | 33.31 | 27.77 | 28.54 | 26.84 | 30.40 | 34.34 |
| انحراف معیار[1] S.E. | 1.24 | 1.47 | 1.76 | 1.56 | 1.17 | 1.47 | 1.58 | 1.61 |
| ضریب تغییرات (درصد)[2] C.V. | 5.90 | 5.24 | 6.04 | 6.47 | 4.42 | 6.44 | 5.84 | 5.39 |

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

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

**جدول ٤. روابط همبستگی بین ژن‌های مرجع و شاخص BestKeeper در گیاه برنج.**

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

| Reference genes ژن های مرجع | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cyclophilin | elF4a | UBQ5 | UBC | GAPDH | Actin1 | Actin11 | 18SrRNA | |
| 0.92 | 0.97 | 0.94 | 0.97 | 0.95 | 0.94 | 0.97 | 0.87 | BestKeeper |
| 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | p-value |

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

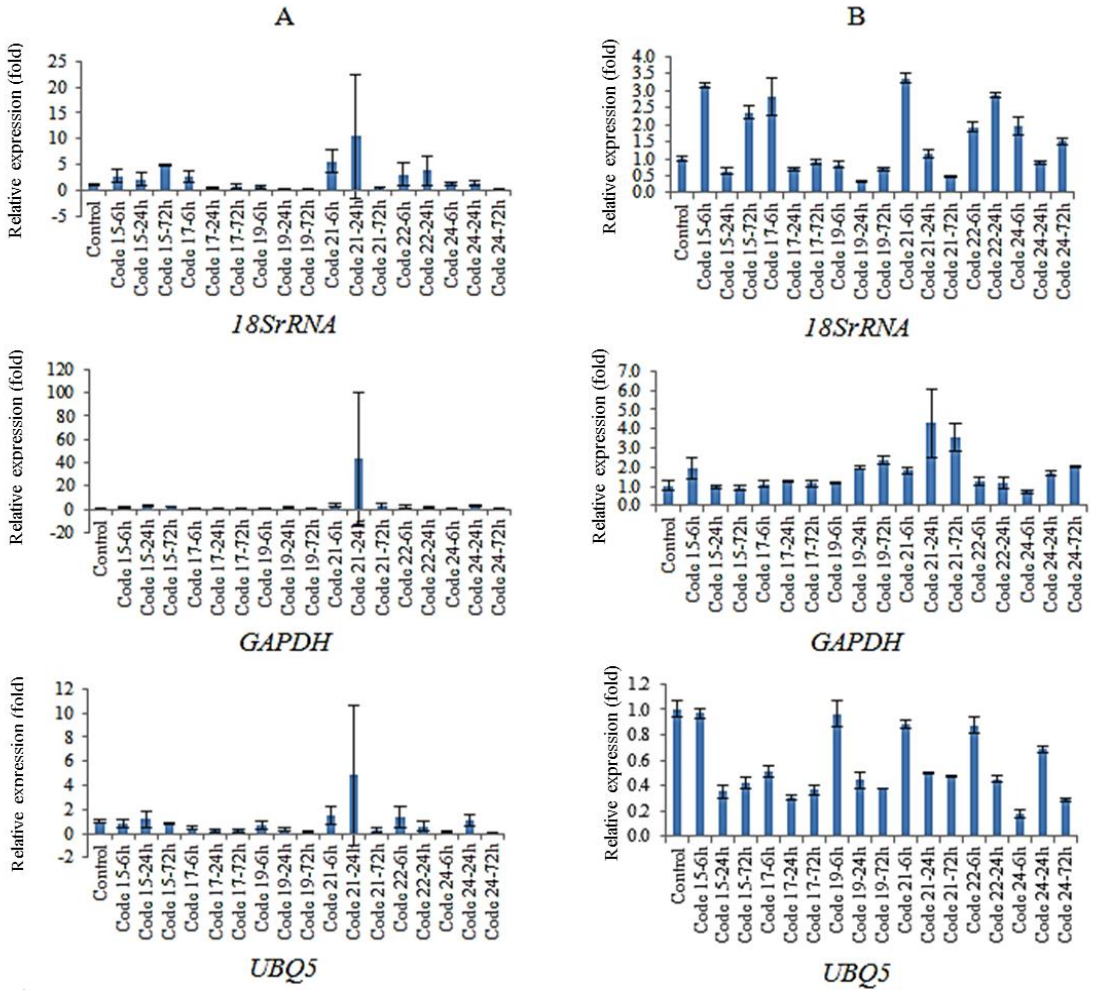
**جدول ۵. مقادیر پایداری بیان و رتبه‌بندی ژن‌های مرجع با استفاده از نرم‌افزار NormFinder.**

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

| Cyclophilin | elF4a | UBQ5 | UBC | GAPDH | Actin1 | Actin11 | Gene ژن |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.926 | 0.567 | 0.713 | 0.659 | 0.612 | 1.019 | 0.356 | مقدار پایداری Stability Value |
| 6 | 2 | 5 | 3 | 4 | 7 | 1 | Order رتبه |

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

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




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

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

## References

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

Burton RA, Shirley NJ, King BJ et al. (2004) The CesA gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. Plant Physiol 134, 224-236.

Bustin SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol 25, 169-93.

Caldana C, Scheible W, Mueller-Roeber B, Ruzicic S (2007) A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. Plant Methods 3, 7.

Cao J, Wang L, Lan H (2016) Validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in Suaeda aralocaspica, an annual halophyte with heteromorphism and C4 pathway without Kranz anatomy. Peer J 4, 16-97.

Chang EM, Shi SQ, Liu JF et al. (2012) Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in Platycladus orientalis (Cupressaceae) using real-time PCR. Plos One 7(3): e33278.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Signal-Step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-henol-chloroform extraction. Anal Biochem 162, 156-159.

Dheda K, Huggett JF, Bustin SA et al. (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. Biotechniques 37, 112-114.

Fedoroff NV, Battisti DS, Beachy RN et al. (2010) Radically rethinking agriculture for the 21st century. Science 327, 833-834.

Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J et al. (2008) Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. Plant Cell 20, 17-34.

Hashemi SHR, Nematzadeh GA, Ahmadian GR et al. (2016) Identification and validation of Aeluropus litoralis reference genes for quantitative real-time PCR normalization. J Biol Res-Thessalon 23, 18.

Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. Biochem Biophys Res Commun 345, 646-651.

Kim BR, Nam HY, Kim SU et al. (2003) Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. Biotechnol Lett 25, 1869-1872.

Kozera B, Rapacz M (2013) Reference genes in real-time PCR. J Appl Genet 54, 391-406.

Li Y, Chen W, Wang Q et al. (2014) Assessment of reference genes for quantitative realtime PCR gene expression normalization in periwinkle during wheat blue dwarf phytoplasma infection. Australas Plant Pathol 43, 477-485.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods 25, 402-408.

Ma QP, Hao S, Chen X, Li XH (2016) Validation of reliability for reference genes under various abiotic stresses in tea plant. Russ J Plant Physiol 63, 423-432.

Mallona I, Lischewski S, Weiss J et al. (2010) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in Petunia hybrida. BMC Plant Biol 10, 4.

Martin KJ, Rygiewicz PT (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiol 5, 28.

McCartney HA, Foster SJ, Fraaije BA, Ward E (2003) Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. Pest Manag Sci 59, 129-42.

Naeimi Sh, Okhovvat SM, Javan-nikkhah M, Vagvolgyi C, Khosravi V, Kredics L (2010) Biological control of Rhizoctonia solani AG1-1A, the causal agent of rice sheath blight with Trichoderma strains. Phytopathol Mediterr 49, 287-300.

Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. J Exp Bot 56, 2907-2914.

Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. BMC Mol Biol 10, 11.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol Lett 26, 509-515.

Qi J, Yu S, Zhang F et al. (2010) Reference gene selection for real-time quantitative polymerase chain reaction of mRNA transcript levels in chinese cabbage (Brassica rapa L. ssp. pekinensis). Plant Mol Biol Rep 28, 597-604.

Reddy DS, Bhatnagar-Mathur P, Reddy PS et al. (2016) Identification and validation of reference genes and their impact on normalized gene expression studies across cultivated and wild cicer species. Plos One 11: 2. DOI: 10.1371/journal.pone.0148451.

Scholtz JJ, Visser B (2013) Reference gene selection for qPCR gene expression analysis of rust-infected wheat. Physiol Mol Plant Pathol 81, 22-25.

Sinha P, Saxena RK, Singh VK et al. (2015) Selection and validation of housekeeping genes as reference for gene expression studies in pigeonpea (Cajanus cajan) under heat and salt stress conditions. Front Plant Sci 6, 1071.

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B et al. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J Biotechnol 75, 291-295.

Tian C, Jiang Q, Wang F et al. (2015) Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves. Plos One 10: 2.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3, 7.

Vashisth T, Johnson LK, Malladi A (2011) An efficient RNA isolation procedure and identification of reference genes for normalization of gene expression in blueberry. Plant Cell Rep 30, 2167-2176.

Wu D, Dong J, Yao YJ et al. (2015) Identification and evaluation of endogenous control genes for use in quantitative RT-PCR during wheat (Triticum aestivum L.) grain filling. Genet Mol Res 14, 10530-10542.

Xu H, Bao JD, Dai JS et al. (2015) Genome-wide identification of new reference genes for qRT-PCR normalization under high temperature stress in rice endosperm. Plos One 10: 11.



Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500