بررسی کارایی برخی ژن‌های مرجع موجود در برنج تحت تنش زیستی به روش Real-Time PCR

مهدی رستمی[۱]، حمیدرضا قربانی[۲] و سید حمیدرضا هاشمی پطرودی[۳*]

۱- مربی پژوهش معاونت مازندران، موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، آمل، ایران

۲- دکتری اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استادیار گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: shr.hashemi@sanru.ac.ir

چکیده

پژوهش‌های بیان ژن با استفاده از Real-time PCR ابزار قدرتمندی برای تجزیه و تحلیل سازوکارهای مقاومت به تنش‌های زیستی در گیاهان به شمار می‌رود. یکی از مراحل مهم استفاده از این روش، انتخاب و اعتبارسنجی ژن‌های مرجع به منظور نرمال کردن بیان ژن‌های هدف تحت شرایط مختلف تنش می‌باشد. این تحقیق در خصوص انتخاب ژن‌های مرجع در گیاه برنج در مراحل مختلف نمو و تحت تنش زیستی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور هشت ژن کنترل داخلی شامل UBQ5، eIF-4A، Actin11، Actin1، UBC، Cylophilin، 18SrRNA و GAPDH که معمولاً به عنوان ژن خانه‌دار در گیاهان استفاده می‌شود انتخاب و پایداری بیان آنها در حضور عامل بیماری قارچی استرین RBL1 *Rhizoctonia solani*، سیلیکات پتاسیم به عنوان القاء کننده مقاومت در سه دوره زمانی (۶ ساعت، ۲۴ ساعت، و ۷۲ ساعت) بعد از انجام آلودگی در بافت برگ مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی بیان ژن‌های مرجع نشان داد که ژن‌های UBQ5 و Cyclophilin با میزان انحراف معیار ۰/۰۷۶ و ۰/۰۸۱ و انحراف استاندار ۰/۲۴۲ و ۰/۲۵۸، از پایداری بیان بیشتری نسبت به سایر ژن‌های مورد بررسی در تنش زیستی در نمونه بافت برگی برخوردار بودند. نتایج این تحقیق را می توان در گیاه برنج به عنوان ژن‌های مرجع در در نرمال سازی بیان ژن به وسیله آنالیز Real-Time PCR استفاده نمود.

کلید واژه ها: القاء کننده ، برنج، بیان ژن، تنش زیستی، ژن مرجع.

مقدمه

تغییرات عوامل محیطی (تنش‌های زیستی و غیرزیستی) به عنوان تهدیدی اصلی برای امنیت غذایی جهان محسوب می‌شوند (فدوروف و همکاران، ۲۰۱۰). فعالیت سلول‌ها در همه موجودات با فعال کردن و غیرفعال کردن بیان ژن‌ها تنظیم می‌شود. تجزیه و تحلیل بیان ژن جزء لاینفک مطالعات ژنومیکس کاربردی در همه موجودات زنده بشمار می‌رود (جین و همکاران، ۲۰۰۶). در میان روش‌های رایج مطالعات بیان ژن، واکنش زنجیرهای پلیمراز زمان واقعی یکی از دقیق‌ترین روش‌ها برای ارزیابی تغییرات رونوشت ژن‌ها محسوب می‌گردد (گوتیرز و همکاران، ۲۰۰۸). حساسیت، اختصاصی بودن و سادگی این تکنیک در مقایسه با دیگر روش‌های بررسی بیان از قبیل نوردرنبلات و دورگ سازی در محل، ارزیابی حفاظتی RNase و واکنش زنجیرهای پلیمراز

رونویسی معکوس نیمه کمی (RT-PCR) قابل مقایسه نیست (باستین، ۲۰۰۰). در مطالعات آنالیز بیان ژن در سطح ترانسکریپتوم، نرمال سازی نمونه‌های آزمایشی جهت حداقل سازی خطای نمونه‌برداری بسیار حایز اهمیت می‌باشد (هدا و همکاران، ۲۰۰۴). یکی از روش‌های نرمال‌سازی استفاده از ژن‌های رفرنس می‌باشد. سطوح بیان ژن‌های رفرنس در بین سلول‌های بافت‌های مختلف و تحت شرایط مختلف آزمایشی ثابت فرض می‌شود (تلین و همکاران، ۱۹۹۹). تحقیقات اخیر نشان داده است که هیچ ژن مرجع عمومی (با پایداری بیان بالا) برای همه بررسی‌های بیولوژیکی وجود ندارد (وندسومپل و همکاران، ۲۰۰۲).

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 (مالونا و همکاران، ۲۰۱۰؛ واشیس و همکاران، ۲۰۱۱) مطالعات مختلفی در این زمینه روی برخی گیاهان انجام شده است که از جمله می‌توان به جو (بورتون و همکاران، ۲۰۰۴)، برنج (کیم و همکاران، ۲۰۰۳)، آرابیدوپسیس (وندسومپل و همکاران، ۲۰۰۲) اشاره کرد.

کالدانا و همکاران (۲۰۰۷) با مطالعه روی برنج بیان داشتند 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 بیان داشتند که ثبات بیان در بافت ساقه و ریشه در ارقام مختلف برنج قابل تشخیص بوده و ژن‌های EF-1α و UBI5، GADPH، 18S-rRNA را به عنوان ژن مرجع مناسب پیشنهاد کرده‌اند. هدف از این تحقیق، بررسی کارایی تعدادی از ژن‌های مرجع به منظور شناسایی و معرفی ژن-های کنترل درونی مناسب برای نرمال‌سازی اطلاعات حاصل از واکنش زنجیرهای پلیمراز زمان واقعی در شرایط نرمال و تنش زیستی (عامل بیماری *Rhizoctonia solani* RBL1) در گیاه برنج می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار

در این تحقیق از استرین *Rhizoctonia solani* RBL1 دارای شماره دسترسی HM211085، با توان بالای بیماری زایی روی برنج، سیلیکات پتاسیم در غلظت ۲ میلی مولار به عنوان ماده شیمیایی القاء کننده مقاومت، از یک جدایه Pseudomonas دارای خاصیت آنتاگونیستی (۲۷۵) و یک جدایه Pseudomonas دارای خاصیت القاء کنندگی (۲۴۳) استفاده شد. ترکیبات تیمارهای آزمایش در شرایط گلخانه روی گیاهچه های ۲۸ روزه اعمال شدند. نمونه برداری از برگ گیاهچه‌ها در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از مایه زنی با قارچ عامل بیماری انجام و در هاون چینی محتوی ازت مایع خرد و بلافاصله به فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند. جهت انتخاب ژن کاندید و طراحی پرایمر از ژن‌های مرجع براساس داده‌های منتشر شده در NCBI برای گیاه برنج استفاده گردید که این ژن‌ها شامل UBQ5، eIF-4A، Actin11، Actin1، UBC، Cylophilin، 18SrRNA و GAPDH می‌باشند (جدول ۱). طراحی پرایمر با استفاده از سایت پرایمر ۳ (http://primer3.ut.ee) و نرم افزار OLIGO (نسخه 1.1.2.19) برای تکثیر قسمتی از ژن واقع در ناحیه حفاظت شده آن (CDS) انجام شد.

انجام واکنش زنجیره ی پلیمراز زمان واقعی

استخراج RNA از بافت برگ با استفاده از محلول ترایزول انجام شد (هاشمی و همکاران، ۲۰۱۶). برای تعیین کیفیت RNAاستخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۳ درصد استفاده شد. به منظور حذف آلودگی DNA، تیمار با آنزیم DNaseI

(Fermentase) انجام و ساخت cDNA براساس دستورالعمل کیت شرکت Thermo scientific و طبق دستورالعمل آن انجام گرفت. نمونه cDNA سنتز شده برای انجام تمام واکنش‌ها در حجم ۱:۹ 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. چرخه دمایی برای تکثیر نمونه‌ها به این ترتیب استفاده شد که ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۱۵ ثانیه، ۵۸ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۱۵ ثانیه در ۴۰ سیکل چرخه تکرار شد. آنالیز منحنی ذوب نمونه‌ها بررسی شده و میانگین میزان بیان ژن ها به عنوان ژن کنترل داخلی در آزمایش در نظر گرفته شده و بیان ژن-های رفرنس نسبت به آن با استفاده از فرمول لیواک (لیواک و اشمیگن، ۲۰۰۱) در نرم افزار Microsoft Excel 2010 محاسبه شد.

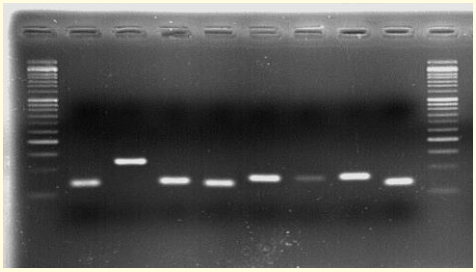
جدول ۱- انتخاب ژن‌های مرجع برای برنج و اطلاعات مربوط به جفت پرایمرها

کد ژن	توالی آغازگر	دمای ذوب
Actin1	CTCCCCCATGCTATCCTTCG TGAATGAGTAACCACGCTCCG	۵۴/۳
Actin11	CAGCCACACTGTCCCCATCTA AGCAAGGTCGAGACGAAGGA	۵۳/۱
UBQ5	ACCACTTCGACCGCCACTACT ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	۵۵/۵
GAPDH	AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT	۵۱/۶
Cyclophilin	CCACCATCACAGATCGGATCTT GCGGTCAGAGCGAAAGTAGCTA	۵۲/۴
eIF-4a	TTGTGCTGGATGAAGCTGATG GGAAGGAGCTGGAAGATATCATAGA	۵۱/۲
18SrRNA	CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA ACACTTCACCGGACCATTCAA	۵۲/۲
UBC	CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGTG	۵۱/۳

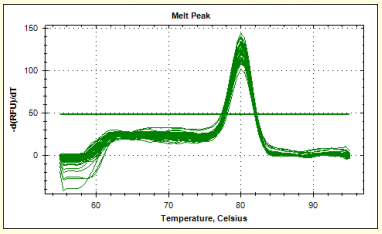
نتایج و بحث

بسیاری از مطالعات مربوط به مکانیسم‌های دفاعی و تنش در گیاهان بر بیان ژن استوار بوده است. مطالعات رونوشت به ارائه درک بهتری از پاسخ‌های تنش گیاه کمک کرده‌اند (نیکوت و همکاران، ۲۰۰۵). بیان ژن نیاز به سنجش همزمان ژن یا ژن‌های مرجع دارد تا اطمینان حاصل شود که هر نوع تغییر در سیگنال هدف به دلیل تغییر در میزان الگوی استفاده شده جهت تنظیم PCR نیست. به منظور بررسی پایداری بیان ژن‌ها در اندام های برگی در گیاه برنج، تعداد ۸ ژن مرجع در شرایط تنش زیستی بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد نشان داد که RNAهای استخراج شده از کمیت و کیفیت مناسب جهت ساخت cDNA برخوردار هستند. پس از ساخت cDNA و تکثیر آن توسط Real-Time الکتروفورز ژل اگارز ۳ درصد انجام پذیرفت تا از اختصاصی بودن تکثیر محصولات بدست آمده و عدم وجود پرایمر دایمر اطمینان حاصل شود. نتایج نشان داد که تکثیر اختصاصی ژن مورد نظر انجام و هیچ باند اضافی دیده نشد (شکل ۱). آنالیز منحنی ذوب نشان‌دهنده وجود تنها یک پیک با دمای ذوب مشخص می‌باشد و تاییدی بر اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده می‌باشد (شکل ۲).

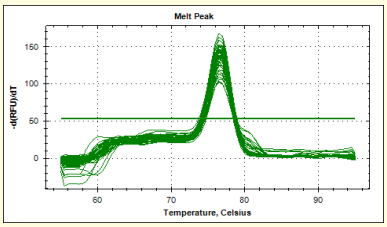
در این تحقیق مقدار Ct (Cq) مشاهده شده با استفاده از ۸ ژن رفرنس در ۱۷ تیمار مختلف مورد بررسی از۱۸/۰۰ برای ژن 18SrRNA تا ۳۴/۵۵ برای ژن Cyclophilin متغیر بود. در این تحقیق دو ژن UBQ5 و 18SrRNA با مقدار Ct ۱۹/۱۷ و ۱۸/۰۰ از میزان mRNA بیشتری برخوردار بوده در حالی‌که دو ژن Cyclophilin و Actin1 با مقدار Ct ۳۴/۵۵ و ۳۲/۴۳ از میزان mRNA کمتری برخوردار بودند. در میان همه ژن‌های مورد بررسی، ژن Actin1 و GAPDH بیشترین میزان تغییرپذیری را در میزان Ct نشان دادند بطوریکه میزان SD (انحراف استاندارد) به ترتیب ۲/۵۱ و ۲/۰۳ بود. در حالیکه دو ژن UBC و 18SrRNA با مقدار SD ۱/۴۴ و ۱/۷۱ حداقل تغییرپذیری را نشان دادند. در حالت مطلوب، شرایط آزمایش نباید بیان ژن کنترل داخلی را تحت تأثیر قرار دهد. انتخاب ژن کنترل داخلی مناسب، جهت تعیین بیان ژن حتی در مطالعات اولیه مولکولی خیلی مهم است و این ژن باید طوری انتخاب شود که کمترین میزان تغییرات را در اندام‌ها و شرایط تیماری متفاوت نشان دهد، در حالی‌که ژن هدف به طور معمول وابسته به شرایط آزمایش، به میزان زیادی تغییر می‌نماید (نیکوت و همکاران، ۲۰۰۵؛ کی و همکاران، ۲۰۱۰). استفاده از حداقل دو ژن کنترل داخلی جهت مقایسه سطوح بیان ژن توسط تلین و همکاران (۱۹۹۹) توصیه شد. بعد از محاسبه مقادیر بیان ژن‌ها (شکل ۳)، اولین شاخصی که در بررسی پایداری بیان ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد، انحراف معیار سطوح بیانی می‌باشد. به‌طورکلی انحراف معیار کمتر نشان‌دهنده پایداری بیشتر ژن مذکور در طی فرآیند آزمایش است. نتایج نشان داد که ژن‌های GAPDH و 18SrRNA با میزان انحراف معیار ۰/۴۲۸ و ۰/۳۱۸ و انحراف استاندارد ۱/۰۰۷ و ۱/۳۵۴، کمترین میزان پایداری و ژن‌های UBQ5 و Cyclophilin با میزان انحراف معیار ۰/۰۷۶ و ۰/۰۸۱ و انحراف استاندار ۰/۲۴۲ و ۰/۲۵۸، بیشترین میزان پایداری را به خود اختصاص دادند (جدول ۲). لازم بذکر است در منابع مختلف SD بیشتر از ۱ بعنوان ژن‌های با پایداری بیان پایین لحاظ می‌گردند (فافل و همکاران، ۲۰۰۴). 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. در این بررسی نیز بر روی نمونه‌های برگی گیاه و تحت شرایط مختلف آزمایش بیان متفاوتی از ژن‌های مرجع مشاهده شد. بررسی بیان ژن‌های رفرنس نشان داد که ژن‌های UBQ5 و Cyclophilin با میزان انحراف معیار و انحراف استاندار کمتر، از پایداری بیان بیشتری نسبت به سایر ژن‌های مورد بررسی برخوردار بودند. استفاده از این ژن‌ها در گیاه برنج می‌تواند در نرمال سازی بیان ژن به وسیله آنالیز Real-Time PCR در شرایط تنش زیستی (عامل بیماری *Rhizoctonia solani* RBL1) مفید باشد.



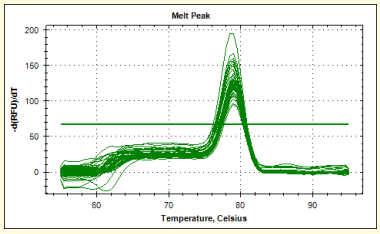
شکل ۱- الکتروفورز محصولات Real-Time PCR بر روی ژل آگارز ۳ درصد با مارکر وزنی 50، از چپ به راست:
lad-Actin11-Actin1-UBQ5-18SrRNA-UBC-elF4a-GAPDH-Cyclophilin-lad



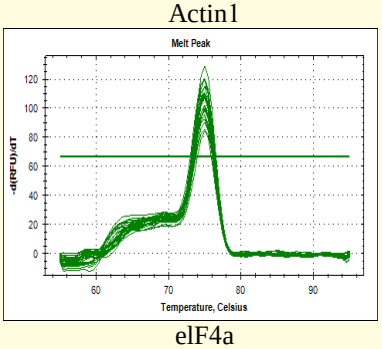
Actin1



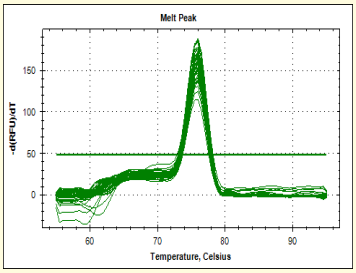
Actin11



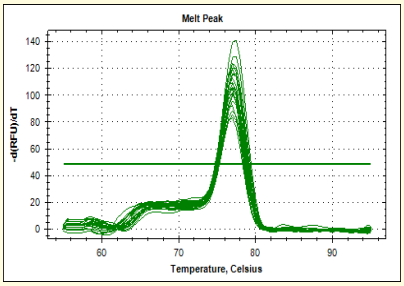
18SrRNA



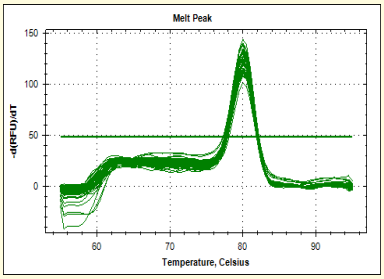
elF4a



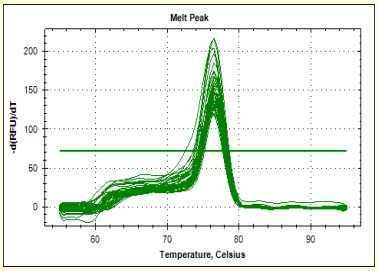
GAPDH



Cyclophilin

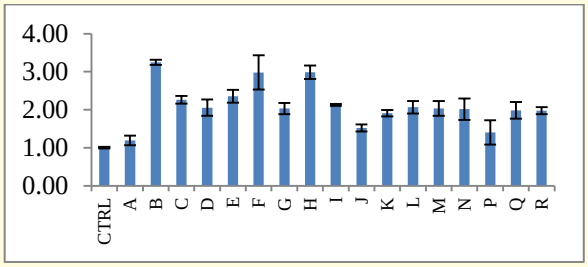


UBQ5

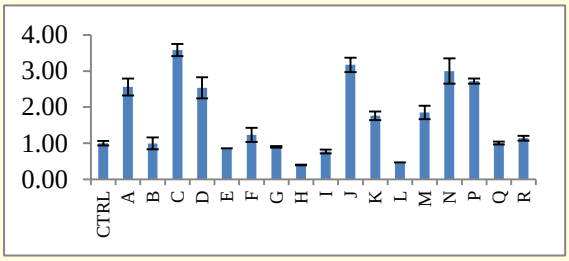


UBC

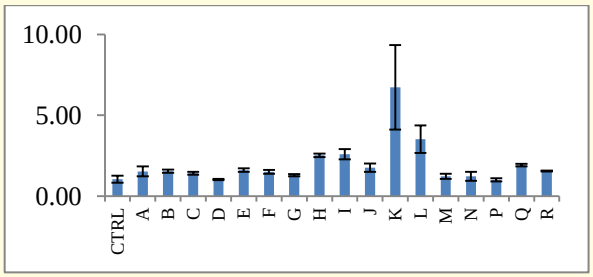
شکل ۲- منحنی ذوب محصولات PCR که نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی ژن مورد نظر می‌باشد.



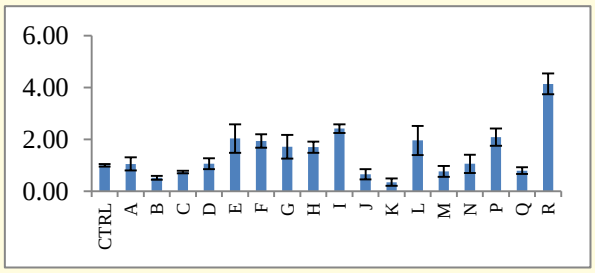
Actin11



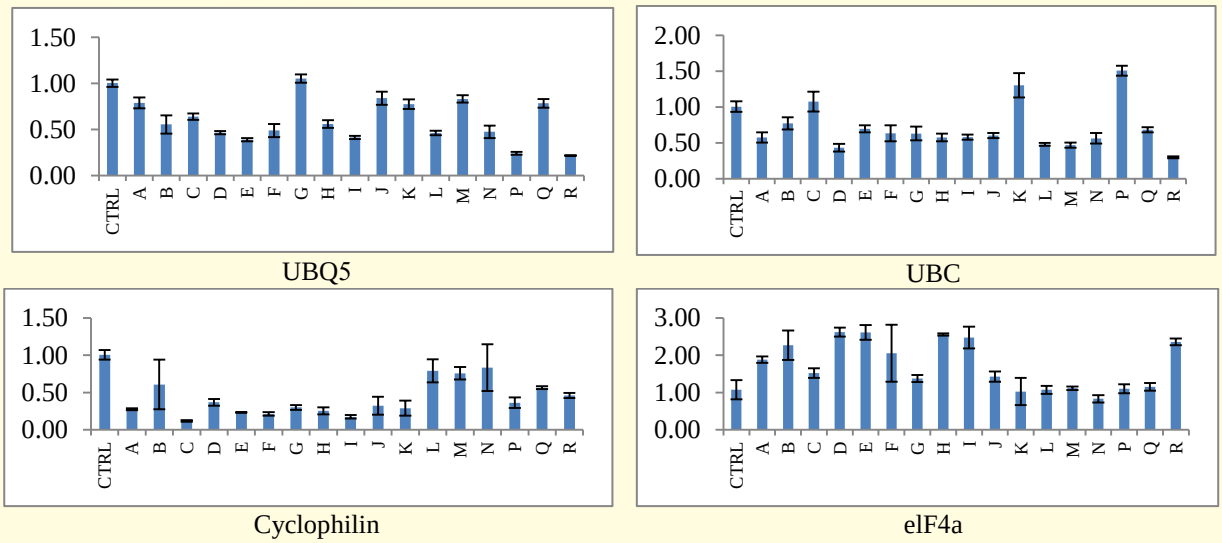
18SrRNA



GAPDH



Actin1



شکل ۳- بیان ژن‌ها در مراحل مختلف رشدی تحت شرایط نرمال و تنش زیستی

جدول ۲- مقادیر انحراف استاندارد و انحراف معیار بیان ژن‌های رفرنس مورد مطالعه

	18SrRNA	Actin11	Actin1	GAPDH	UBC	UBQ5	elF4a	Cyclophilin
انحراف استاندارد	۱/۰۰۷	۰/۵۸۸	۰/۹۱۶	۱/۳۵۴	۰/۳۱۲	۰/۲۴۲	۰/۶۴۷	۰/۲۵۸
انحراف معیار	۰/۳۱۸	۰/۱۸۵	۰/۲۸۹	۰/۴۲۸	۰/۰۹۸	۰/۰۷۶	۰/۲۰۴	۰/۰۸۱

منابع

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.
Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25: 169-93.
Caldana, C., Scheible, W., Mueller-Roeber, B. and Ruzicic, S. 2007. A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. Plant Meth. 3(7).
Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G. and Zumla, A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. Biotechniques. 37: 112-114.
Fedoroff, N.V., D.S. Battisti, R.N. Beachy, P.J.M. Cooper, D.A. Fischhoff, C.N. Hodges, V.C. Knauf, D. Lobell, B.J. Mazur, D. Molden, M.P. Reynolds, P.C. Ronald, M.W. Rosegrant, P.A. Sanchez, A. Vonshak and Zhu, J.K. 2010. Radically rethinking agriculture for the 21st century, Science, 327: 833- 834.
Gutierrez, L., M. Mauriat, J. Pelloux, C. Bellini and Van Wuytswinkel, O. 2008. towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. The Plant Cell, 20: 17-34.
Hashemi, S.H.R., Nematzadeh, G.A. Ahmadian, G.R. Yamchi A. and Kuhlmann, M. 2016. Identification and validation of *Aeluropus litoralis* reference genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization. Journal of Biological Research-Thessaloniki, 23: 18 pp.
Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A.K. and Khurana, J.P. 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative Real-Time PCR. Biochem. Biophys. Res. Comm. 345: 646-651.
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.
Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods, 25:402-408.

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
Nicot, N., Hausman, J.F., Hoffmann, L. and Evers, D. 2005. Housekeeping gene selection for realtime RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. Journal of experimental botany, 56(421):2907-2914.
Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. and Neuvians, T.P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper- xcel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters 26:509-515.
Qi, J., Yu, S., Zhang, F., Shen, X., 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.
Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J. Biotechnol. 75: 291-295.
Vandesompele, J., De Preter, K. Pattyn, F. Poppe, B. Van Roy, N. De Paepe A. and Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology, 31 pp.
Vashisth, T., Johnson, L.K. and 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.

Study of some Reference Genes efficiency in Rice under Biotic Stress by Real-Time PCR

Mehdi Rostami[1] , Hamidreza Ghorbani[2] and Seyyed Hamidreza Hashemi-petroudi[3*]

1- Rice Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Amol, Iran.
2- Ph.D. in Plant Breeding, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.
3- Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran, P. O. Box 578.
*Corresponding author email: shr.hashemi@sanru.ac.ir

Abstract
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. 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 in three time periods (6 h, 24 h and 72 h). Result showed that, *UBQ5* and *Cyclophilin* genes with the value of 0.076 and 0.081 for Standard error and the value of 0.242 and 0.258 Standard deviation have more stable expression than the other investigated genes, respectively. Overall, the sets of reference genes proposed in this study are ideal normalizers for qPCR analysis in *oryza sativia/ Rhizoctonia solani* intraction.

Keywords: Biotic stress, Inducer, Gene expression, Reference genes, Rice.