دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

ارزیابی راندمان تعدادی از ژن‌های مرجع در آلوروپوس تحت شرایط تنش شوری

امین ابراهیمی[۱]، سجاد رشیدی منفرد[۲]، امیر مرادی سرابشلی[۳] و پرویز حیدری[۴]

۱- استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، (نویسنده مسوول: aminebrahimi@shahroodut.ac.ir)
۲- استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۳- دانشجوی دکتری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۴- استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱

چکیده

استفاده از گونه‌های وحشی گیاهان زراعی یا خویشاوندان هالوفیت آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی به‌منظور توسعه ارقام زراعی متحمل به شوری و خشکی می‌تواند نتایج مفیدی را به دنبال داشته باشد. اخیرا گیاه آلوروپوس به‌عنوان یک مدل هالوفیت برای شناسایی و جداسازی ژن‌های جدید متحمل به شوری مورد توجه محققان قرار گرفته است. در میان روش‌های مورد استفاده برای مطالعات بیان ژن، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی یکی از روش‌های مناسب برای ارزیابی میزان بیان ژن است. در این روش کنترل خطا بین نمونه‌ها ضروری به نظر می‌رسد. روشی که به صورت گسترده برای کنترل خطا مورد استفاده قرار می‌گیرد، نرمال کردن سطوح RNA با یک ژن مرجع یا خانه‌دار می‌باشد. در این تحقیق به‌منظور بررسی پایداری بیان ژن‌ها در اندام‌های برگ و ریشه گیاه آلوروپوس، ۷ ژن مرجع تحت شرایط تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار geNorm نشان داد که ژن‌های *ACT11*، *Beta actin* و *Beta tubulin* در برگ و ژن‌های *Beta tubulin* و *Beta actin* در ریشه دارای بیشترین میزان پایداری هستند. بر اساس آماره توصیفی ژن *ACT11* دارای بیشترین همبستگی (۰/۸۳۶ و ۰/۷۲۲ به ترتیب در ریشه و برگ) با شاخص BestKeeper بود. همچنین با توجه به نتایج این برنامه، ژن *Beta tubulin* در برگ و ریشه دارای بیشترین پایداری (کمترین ضریب تغییرات) بود. بنابراین می‌توان عنوان کرد که ژن‌های *Beta tubulin*، *Beta actin* و *ACT11* می‌توانند به‌عنوان ژن‌های مرجع مناسب در گیاه آلوروپوس به‌منظور نرمال‌سازی داده‌های بیانی مورد استفاده قرار بگیرند.

واژه‌های کلیدی: آلوروپوس، واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز زمان واقعی، تنش شوری، ژن مرجع، BestKeeper

مقدمه

تغییرات عوامل محیطی (تنش‌های زیستی و غیرزیستی) به‌عنوان تهدیدی اصلی برای امنیت غذایی جهان محسوب می‌شوند (۸). تنش شوری یکی از عوامل غیرزیستی اصلی محدود کننده حاصل‌خیزی گیاهان زراعی و توزیع جهانی گیاهان محسوب می‌شود و اکثر گیاهان به شوری حساس می‌باشند (۱۹،۲۳). هر چند پیشرفت در زمینه مدیریت آب و خاک می‌تواند به حل این مشکل کمک کند، اما دانش بدست آمده درباره تحمل به شوری در گونه‌های زراعی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (۹). گونه‌های وحشی گیاهان زراعی یا خویشاوندان هالوفیت آن‌ها منابع ژنتیکی با ارزشی جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی به منظور توسعه ارقام زراعی متحمل به شوری و خشکی محسوب می‌گردند و نتایج مفیدی را به دنبال داشته‌اند (۲). هالوفیت‌ها به‌عنوان گیاهانی تعریف می‌شوند که می‌توانند چرخه زندگی خود را در معرض غلظت‌های بالای شوری کامل کنند (۱۰). این گیاهان منابع ژنتیکی مهمی برای جداسازی راه‌اندازها و ژن‌های جدید هستند که در سازگاری به شوری دخالت دارند و می‌توان آنها را به گلایکوفیت‌ها منتقل کرد (۳۰). در این میان گیاه آلوروپوس به‌عنوان یک مدل هالوفیت برای شناسایی و جداسازی ژن‌های جدید متحمل به شوری، اخیرا مورد توجه محققان قرار گرفته است (۱۴). آلوروپوس (*Aeluropus littoralis*) یک گونه علفی، چند ساله و از خویشاوندان گندم است که به رده *Aeluropus* از طایفه *Clorideae* تعلق دارد. متابولیسم این گیاه از نوع C4 است، که به آن انعطاف‌پذیری بیشتری در برابر تنش‌های خشکی و شوری را می‌دهد (۲۲،۲۹). تحقیقات نشان داده که این گیاه هالوفیت توانایی تحمل به شوری (NaCl) تا سطوح بالاتر از ۶۰۰ میلی‌مولار را دارا می‌باشد (۱۲) و حاوی ژنوم نسبتاً کوچکی در حدود ۳۴۲ مگاجفت‌باز است (۲۱). بخاطر تحمل بالا در برابر شوری، این گیاه یک منبع ژنتیکی با ارزش برای دست‌ورزی مولکولی گلایکوفیت‌ها و بویژه غلات محسوب می‌شود. لذا، درک مکانیسم‌های تحمل به شوری در گیاهان هالوفیت و نیز تعیین تفاوت‌های آنها با گیاهان گلایکوفیت ضروری به نظر می‌رسد (۲۷). در میان روش‌های رایج مطالعات بیان ژن، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی[۱] یکی از دقیق‌ترین روش‌های برای ارزیابی تغییرات رونوشت ژن‌ها محسوب می‌گردد (۱۳). حساسیت، اختصاصی بودن و سادگی این تکنیک در مقایسه با دیگر روش‌های بررسی بیان از قبیل نوردرن‌بلات و دو رگ سازی در محل، ارزیابی حفاظت RNase و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز رونویسی معکوس نیمه کمی (RT-PCR) قابل مقایسه نیست (۴). بخاطر این ویژگی‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی به روش عمومی برای تائید اطلاعات ریزآرایه کل ژنوم یا مجموعه کوچکتری از ژن‌ها و تشخیص‌های مولکولی تبدیل شده است (۱۵). تنوع بین نمونه‌ها ممکن است در مقدار و کیفیت مواد آغازین، آماده سازی RNA، سنتز cDNA، رقیق سازی و پیپت کردن تفاوت ایجاد کند (۲۰،۱۱). لذا کنترل خطا بین نمونه‌ها امری ضروری می‌باشد که روش‌های زیادی برای کنترل این خطا وجود دارد. روشی که به صورت گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد، نرمال کردن سطوح RNA با یک ژن مرجع یا خانه‌دار می‌باشد (۵). سطوح بیان ژن‌های مرجع

1- Real time PCR

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-15]

[DOI: 10.29252/jcb.10.25.110]

بایستی بین سلول‌های بافت‌های مختلف و تحت شرایط متفاوت آزمایشی ثابت باقی بماند، در غیر اینصورت، ممکن است منجر به ایجاد نتایج اشتباه شود (۱). تاکنون، ژن‌های خانه‌دار درگیر در فرآیندهای سلولی پایه از قبیل *18S rRNA*، *UBIQUITIN* (*UBQ*)، *ACTIN* (*ACT*)، *β-TUBULIN* (*TUB*) و گلیسرالدهید ۳-فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*) به عنوان کنترل‌های درونی برای تجزیه بیان ژن مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۶). اما تحقیقات اخیر نشان داده است که هیچ ژن مرجع کلی (با پایداری بیان بالا) برای همه بررسی‌های بیولوژیکی وجود ندارد (۲۸). به‌طورکلی، انتخاب یک ژن مرجع ایده‌آل در دو مرحله انجام می‌شود. ابتدا، ژن‌های مرجع کاندید شناسایی می‌شوند و سپس میزان پایداری بیان این ژن‌ها در نمونه‌های مورد نظر تعیین می‌گردد (۱۴). پودوین و همکاران (۲۶) در گزینش و ارزیابی کارایی ژن‌های مرجع نشان دادند که ژن‌های *EF1*، *TUB* و *ACT* می‌توانند برای نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن در گیاهان مورد استفاده قرار بگیرند. الگوریتم‌های آماری از قبیل NormFinder، geNorm و BestKeeper به ترتیب بر اساس مدل ارزیابی واریانس، میانگین هندسی ژن‌های کنترل درونی چندگانه و همبستگی جفتی برای ارزیابی بهترین ژن(های) مرجع مناسب برای نرمال سازی اطلاعات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی در مجموعه نمونه‌های بیولوژیکی خاص توسعه یافته‌اند (۲۸،۲۵). با توجه به اینکه تجزیه دقیق بیان ژن به منظور درک مکانیسم‌های سازگاری به تنش شوری امری ضروری است. هدف از این تحقیق، بررسی کارایی تعدادی از ژن‌های مرجع به منظور شناسایی و معرفی ژن‌های کنترل درونی مناسب برای نرمال‌سازی اطلاعات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی در شرایط نرمال و تنش شوری در گیاه آلوروپوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار

بذرهای آلوروپوس با استفاده از محلول هیپوکلریت دو درصد و سپس قارچ‌کش ویتاواکس به نسبت دو در هزار ضدعفونی شدند و تحت شرایط کنترل شده در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود کشت شدند. محیط هیدروپونیک برای تغذیه و رشد گیاهچه‌ها تا پایان مراحل نمونه‌برداری استفاده شد. محلول هیدروپونیک پس از تنظیم pH به طشتک‌های مخصوص کشت (الواژ) منتقل گردید تا محیط مناسبی برای رشد گیاهچه‌ها فراهم شود. pH محلول غذایی هر روز کنترل و محلول غذایی هر سه روز یکبار تعویض می‌شد. جهت رسیدن به غلظت مورد نظر و جلوگیری از ایجاد شوک اسمزی هر روز محلولی جدید با خارج کردن محیط قدیمی و افزایش غلظت ۵۰ میلی‌مولار از کلریدسدیم به محیط رشد اضافه می‌گردید. محیط رشد گیاهان اتاقک رشد با شرایط ۸/۱۶ ساعت روشنایی/تاریکی، دمای روز/شب ۲۰/۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ تا ۵۰ درصد تنظیم گردید. در این آزمایش تیمارهای شوری صفر و ۴۰۰ میلی‌مولار بعد از گذشت ۱۰ هفته از رشد گیاهان اعمال گردید. همچنین در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت پس از اعمال تیمار شوری، نمونه‌گیری از اندام‌های ریشه و برگ انجام شد و نمونه‌ها بلافاصله جهت استخراج RNA به فریزر ۸۰- °C منتقل شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA با استفاده از کیت RNeasy® Plant Mini Kit ساخت شرکت QIAGEN و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. برای تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده از ژل الکتروفورز یک درصد و دستگاه نانودراپ استفاده شد و جهت ساخت رشته اول cDNA از کیت سنتز رشته اول cDNA شرکت Fermentas استفاده شد.

انتخاب ژن‌های مرجع مختلف

هفت ژن مرجع مختلف با توجه به بررسی منابع جهت مطالعه انتخاب گردیدند (۱۵). اسامی و مشخصات این آغازگرها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای ژن‌های مرجع استفاده شده در این تحقیق (برگرفته از منبع شماره ۱۵)

Table 1. The primer sequences of housekeeping genes used in this study (According to the reference 15)

نام آغازگر	منبع ژن	توالی آغازگر (۳'-۵')	دمای اتصال (°C)	طول قطعه (bp)
Actin 11	برنج	CAGCCACACTGTCCCCATCTA AGCAAGGTCGAGACGAAGGA	58 58	70
Ubiquitin-conjugating enzyme E2	برنج	CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGTG	56 57	76
Eukaryotic elongation factor 1-alpha	برنج	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT GACTTCCTTCACGATTTCATCGTAA	57 57	103
Beta-tubulin	برنج	GCTGACCACACCTAGCTTTGG AGGGAACCTTAGGCAGCATGT	57 58	82
Eukaryotic initiation factor 4a	برنج	TTGTGCTGGATGAAGCTGATG GGAAGGAGCTGGAAGATATCATAGA	56 56	76
18S ribosomal RNA	برنج	CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA ACACTTCACCGGACCATTCAA	59 58	65
25S ribosomal RNA	برنج	AAGGCCGAAGAGGAGAAAGGT CGTCCCTTAGGATCGGCTTAC	58 57	68

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-15]

[DOI: 10.29252/jcb.10.25.110]

انجام واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز زمان واقعی

واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز زمان واقعی در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر حاوی مواد موجود در جدول شماره ۲ و با شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به شرح ذیل انجام شد: ابتدا ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۵۶ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد (دمای Tm آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در این واکنش از iQTM SYBR® Green Supermix از شرکت Bio-Rad جهت مطالعه تغییرات رونوشت ژن‌ها استفاده شد.

جدول ۲- اجزا واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز زمان واقعی

Table 2. Components of master mix used in Real time PCR

ماده	غلظت مورد نیاز	مقدار (میکرولیتر)
iQ™ SYBR® Green Supermix	1x	۱۲/۵
Primer (Forward)	10 Pmol	۱
Primer (Reverse)	10 Pmol	۱
cDNA	250 ng	۵
Strile Water		۵/۵
حجم نهایی		۲۵

استانداردسازی و آنالیز داده‌ها

جهت استانداردسازی از سری‌های رقت مختلفی در این آزمایش استفاده شد. تهیه سری رقت برای تنظیم دستگاه و بدست آوردن کارآیی مناسب صورت گرفت. غلظت‌های cDNA ۰/۱ ، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ به‌عنوان سری‌های رقت برای تمامی ژن‌های مرجع انجام شد. در انتها کارآیی PCR برحسب میزان Ct هر نمونه و منحنی استاندارد محاسبه گردید. از نرم‌افزارهای geNorm (۲۸) و BestKeeper (۲۵) به منظور تعیین مناسب‌ترین ژن رفرنس و با ثبات‌ترین مقادیر بیان ژن استفاده شد.

نتایج و بحث

به‌منظور بررسی پایداری بیان ژن‌ها در اندام‌های برگ و ریشه در گیاه آلوروپوس، تعداد ۷ ژن مرجع در شرایط تنش شوری بررسی شد. بررسی نمونه‌های آزمایشی RNA و کنترل خطا بین نمونه‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد، چرا که تنوع بین نمونه‌ها ممکن است در مقدار و کیفیت مواد آغازین، آماده سازی RNA، سنتز cDNA، رقیق‌سازی و پیپت کردن تفاوت ایجاد کند. 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 حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که ژن‌های *Beta actin* و *ACT11* و پس از آن‌ها ژن *Beta-tubulin* در برگ دارای بیشترین پایداری هستند (جدول ۳). در ریشه ژن *25S* دارای بیشترین پایداری در میان ژن‌های مرجع بود (جدول ۳). متاسفانه اطلاعات بسیار اندکی درباره ژنوم آلوروپوس در بانک‌های اطلاعاتی وجود دارد (تنها یک ژن مرجع به صورت یک توالی ناقص از آلوروپوس در بانک‌های اطلاعاتی ثبت گردیده است) لذا به‌منظور بررسی تعدادی از ژن‌های کاندید، از ژن‌های مرجع سایر گیاهان نزدیک به آلوروپوس استفاده شد (۷). پایین بودن ضریب تنوع دلالت بر پایداری بیشتر ژن‌های مرجع دارد. در مطالعه حاضر، ژن‌های *Beta actin* و *25S* به ترتیب در برگ و ریشه دارای کمترین ضریب تنوع بودند. آماره توصیفی ارائه شده توسط نرم‌افزار BestKeeper، ثبات ژن‌های مرجع را بر اساس مقادیر خام Ct رتبه‌بندی می‌کند. بر این اساس ژن *ACT11* در اندام ریشه و برگ دارای بیشترین همبستگی با شاخص BestKeeper (۰/۸۳۶ و ۰/۷۲۲ به ترتیب در اندام ریشه و برگ) می‌باشد (جدول ۴). بنابراین برنامه BestKeeper ژن *ACT11* را به‌عنوان ژن مرجع قابل اعتماد برای نرمال‌سازی بیان ژن‌های هدف در گیاه آلوروپوس معرفی کرد.

جدول ۳- انحراف معیار و ضریب تنوع بیان ژن‌های خانه‌دار در ریشه و برگ گیاه آلوروپوس

Table 3- Standard deviation and Coefficient of variation of housekeeping genes in root and shoot of *Aeluropus*

ژن		*Beta actin*	*25S*	*eEF-1a*	*18S*	*ACT11*	*eIF-4a*	*Beta tubulin*
حداقل	ریشه	۲۱/۰۷	۲۱/۵۹	۲۳/۱۳	۱۵/۰۴	۲۴/۹۸	۲۵/۲۵	۲۱/۰۷
	برگ	۲۳/۸۱	۱۹/۹۷	۲۵/۶۱	۱۶/۶۹	۲۳/۸۱	۲۶/۷۷	۲۶/۰۱
حداکثر	ریشه	۳۶/۷۱	۳۱/۱۸	۳۸/۶۸	۳۵/۳۱	۳۸/۶۴	۳۸/۶۷	۳۶/۷۱
	برگ	۲۶/۹۱	۳۰/۶۵	۳۹/۰۷	۳۵/۳۱	۳۱/۲۲	۴۰/۳۹	۳۱/۳۱
انحراف معیار[1]	ریشه	۳/۷۵	۲/۶۲	۴/۹۳	۵/۳۰	۴/۹۵	۳/۷۶	۳/۷۵
	برگ	۰/۵۲	۲/۶۷	۳/۶۷	۴/۶۴	۰/۸۱	۳/۲۸	۱/۳۲
ضریب تنوع (درصد)[2]	ریشه	۱۴/۳۵	۱۰/۶۰	۱۵/۵۸	۲۱/۳۳	۱۵/۸۷	۱۲/۱۴	۱۴/۳۵
	برگ	۲/۰۲	۱۰/۵۰	۱۱/۱۰	۱۸/۷۳	۳/۱۰	۱۰/۱۶	۴/۶۴

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-15]

[DOI: 10.29252/jcb.10.25.110]

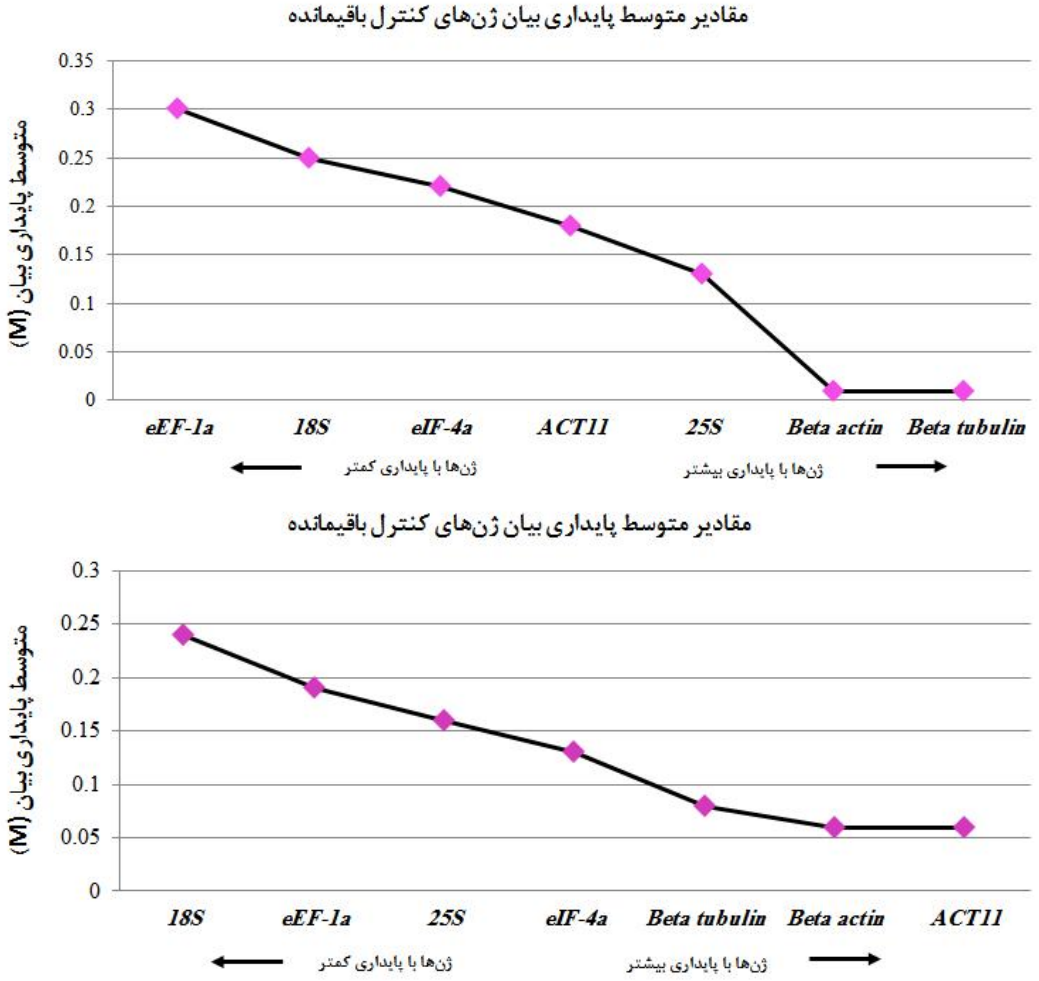
جدول ۴- روابط بین ژنی و همبستگی بین ژن‌های مرجع براساس شاخص BestKeeper در گیاه آلوروپوس
Table 4. Pairwise correlation and correlation analysis of housekeeping genes based on BestKeeper Index in *Aeluropus*

		Beta actin	*25S*	*eEF-1a*	*18S*	*ACT11*	*eIF-4a*	*Beta tubulin*
25S	ریشه	۰/۶۶۹						
	برگ	۰/۰۷۰						
eEF-1a	ریشه	-۰/۵۲۴	-۰/۵۱۶					
	برگ	۰/۲۹۶	-۰/۰۵۱					
18S	ریشه	۰/۴۸۳	۰/۵۶۱	-۰/۴۷۵				
	برگ	-۰/۲۳۱	-۰/۱۳۹	-۰/۵۱۰				
ACT11	ریشه	۰/۵۱۶	۰/۴۹۹	-۰/۱۴۱	۰/۷۲۱			
	برگ	۰/۶۲۳	۰/۲۶۵	۰/۲۷۸	۰/۲۲۴			
eIF-4a	ریشه	۰/۲۵۲	۰/۲۲۶	-۰/۳۰۲	۰/۵۷۳	۰/۳۹۱		
	برگ	-۰/۰۴۴	-۰/۱۷۲	-۰/۳۲۵	۰/۳۵۲	۰/۲۹۲		
Beta tubulin	ریشه	۰/۰۰۱	۰/۶۶۹	-۰/۵۲۴	۰/۴۸۳	۰/۵۱۶	۰/۲۵۲	
	برگ	۰/۲۵۸	-۰/۲۷۵	-۰/۰۳۵	۰/۱۵۴	-۰/۰۴۵	۰/۰۲۱	
BestKeeper	ریشه	۰/۸۰۹	۰/۷۱۹	-۰/۳۷۷	۰/۸۳۰	۰/۸۳۶	۰/۵۶۳	۰/۸۰۹
	برگ	۰/۱۷۱	۰/۲۰۶	-۰/۰۴۶	۰/۷۰۰	۰/۷۲۲	۰/۵۱۰	۰/۲۰۵
p-value	ریشه	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۱۲۳	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۱۵	۰/۰۰۱
	برگ	۰/۵۰۰	۰/۴۱۳	۰/۸۵۹	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۳۱	۰/۴۱۳

از آنجایی که الگوریتم‌های مختلفی برای تجزیه و تحلیل متوسط پایداری بیان در این تحقیق بکار رفته است بدیهی است که رتبه‌بندی ژن‌های مرجع در برخی موارد دارای تفاوت‌هایی باشد. کائو و همکاران (۶) نیز در تحقیق خود اعلام کردند که دلیل اختلاف در رتبه‌بندی ژن‌های مرجع، استفاده از الگوریتم‌های مختلف آماری می‌باشد. الگوریتم‌های متفاوتی برای تجزیه و تحلیل پایداری بیان ژن‌های مرجع کاندید در شرایط آزمایشی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برای این هدف در این تحقیق از برنامه geNorm استفاده شد. پایدارترین ژن مرجع بیان شده دارای حداقل مقدار متوسط پایداری بیان (M) است درحالی‌که ژن مرجع با پایداری کمتر دارای بالاترین مقدار متوسط پایداری بیان می‌باشد (۳). بر اساس الگوریتم geNorm، مقدار متوسط پایداری بیان ۰/۵ به‌عنوان نقطه برش در نظر گرفته می‌شود، بطوریکه ژن‌ها با میزان متوسط پایداری بیان کمتر از ۰/۵ می‌تواند به‌عنوان ژن‌های مرجع کاندید مناسب مدنظر قرار بگیرد. بر اساس نتایج بدست آمده، ژن‌های *Beta tubulin* و *ACT11* در برگ و ژن‌های *Beta tubulin* و *Beta actin* در ریشه دارای بیشترین پایداری بودند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ژن‌های *Beta tubulin*، *Beta actin* و *ACT11* می‌توانند به‌عنوان ژن‌های مرجع در گیاه آلوروپوس به منظور نرمال‌سازی داده‌های بیانی مورد استفاده قرار گیرند. پایداری ژن *Beta tubulin* به‌عنوان ژن رفرنس تحت شرایط محیطی مختلف در گیاهان گندم، جو و جو دوسر گزارش شده است (۱۷). همچنین ژیان و همکاران (۱۸) ژن‌های *ACT11* و *CYP2* به‌عنوان پایدارترین ژن‌ها تحت شرایط مختلف فیزیولوژیکی و محیطی در گیاه سویا معرفی کردند. بر اساس الگوریتم‌های مورد مطالعه در این تحقیق، ژن‌های *Eukaryotic elongation factor 1-alpha* و *18S* دارای کمترین پایداری بودند. نارسایی و همکاران (۲۴) در تحقیق خود نیز اعلام کردند که ژن *18S* دارای نقطه برش تنوع جفتی مطلوب می‌باشد و ژن‌های مرجع اضافی درصورتی‌که میزان $V_{n/n+1}$ آنها کمتر از این مقدار باشد، نیازی نیست. با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر، می‌توان گفت که دو ژن مرجع می‌تواند برای نرمال‌سازی ژن در شرایط مختلف محیطی مناسب باشد (شکل ۲). به صورت کلی استفاده از یک ژن مرجع به تنهایی قابل اعتماد نخواهد بود، چرا که بیان ژن‌های مرجع در بافت‌ها و شرایط رشدی مختلف یکسان نمی‌باشد. استفاده از دو یا تعداد بیشتری ژن مرجع پایدار ممکن است برای افزایش صحت نتایج مورد نیاز باشد (۳). برای دستیابی به این هدف (یعنی تعیین تعداد بهینه ژن‌های مرجع مطلوب) از شاخص NF (Normalization Factor) که توسط برنامه geNorm محاسبه می‌گردد، استفاده شد. در این روش از تنوعات جفتی (Vn/n+1) بین دو فاکتور نرمال‌ساز متوالی (NFn /NFn+1) که با پایدارترین ژن‌ها آغاز می‌گردد، برای تعیین اینکه آیا اضافه کردن ژن‌های نرمال بعدی که دارای پایداری مناسبی هستند، نیاز است یا خیر، استفاده می‌شود. در حقیقت این برنامه ابتدا پایدارترین ژن‌های مرجع بعد از ژن اول (یعنی ژن دوم و سوم) سپس ژن‌های بعدی (ژن‌های سوم و چهارم) و الی آخر را آنالیز کرده و برای هر یک از جفت ژن‌های مذکور شاخص مورد نظر را محاسبه می‌کند. Vandesompele و همکاران (۲۸) نشان دادند که میزان عددی ۰/۱۵ به عنوان نقطه برش تنوع جفتی مطلوب می‌باشد و استفاده از ژن‌های مرجع اضافی درصورتیکه میزان Vn/n+1 (V میزان عددی مربوط به تنوعات جفتی، n اولین ژن وارد شده به مدل و n+1 ژن جدیدی است که به منظور بررسی پایداری وارد مدل می‌گردد) آن‌ها کمتر از این مقدار باشد، نیازی نیست. با توجه به اینکه استفاده از تنها یک ژن مرجع نمی‌تواند قابل اعتماد باشد، لذا در صورتی‌که V2/3<0.15 باشد از یک جفت ژن و در صورتی‌که مقدار V2/3>0.15 باشد به منظور دستیابی به نتیجه مطلوب از ژن سوم نیز استفاده می‌گردد. با توجه به شکل ۲ چون V2/3 (۰/۰۶۷) و (۰/۰۳۱)کمتر از ۰/۱۵ است، لذا استفاده از دو ژن مرجع کافی و قابل اعتماد می‌باشد (شکل ۲۳).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-15]
[DOI: 10.29252/jcb.10.25.110]

مطالعه بیان ژن با استفاده از Real-time PCR به‌عنوان یک روش استاندارد دارای کاربرد فراوانی در زمینه تائید اطلاعات ریزآرایه کل ژنوم یا مجموعه کوچکتری از ژن‌ها و تشخیص‌های مولکولی است. انتخاب ژن رفرنس مناسب در افزایش دقت اطلاعات حاصل و کنترل خطا بین نمونه‌ها، دارای نقش بسزایی می‌باشد. جهت انتخاب ژن رفرنس مناسب در گیاه آلوروپوس، چندین ژن رفرنس شناخته شده تحت تنش شوری در بافت‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که ژن‌های *Beta tubulin* و *ACT11* در برگ و ژن‌های *Beta tubulin* و *Beta actin* در ریشه آلوروپوس دارای بیشترین پایداری هستند. لذا می‌توان از این ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های مرجع در گیاه آلوروپوس به‌منظور نرمال‌سازی داده‌های بیانی استفاده کرد. از طرفی دیگر بر اساس الگوریتم‌های مورد مطالعه در این تحقیق، ژن‌های *Eukaryotic elongation factor 1-alpha* و *18S* دارای کمترین پایداری بودند و جهت مطالعات بیان ژن تحت تنش شوری پیشنهاد نمی‌شوند.

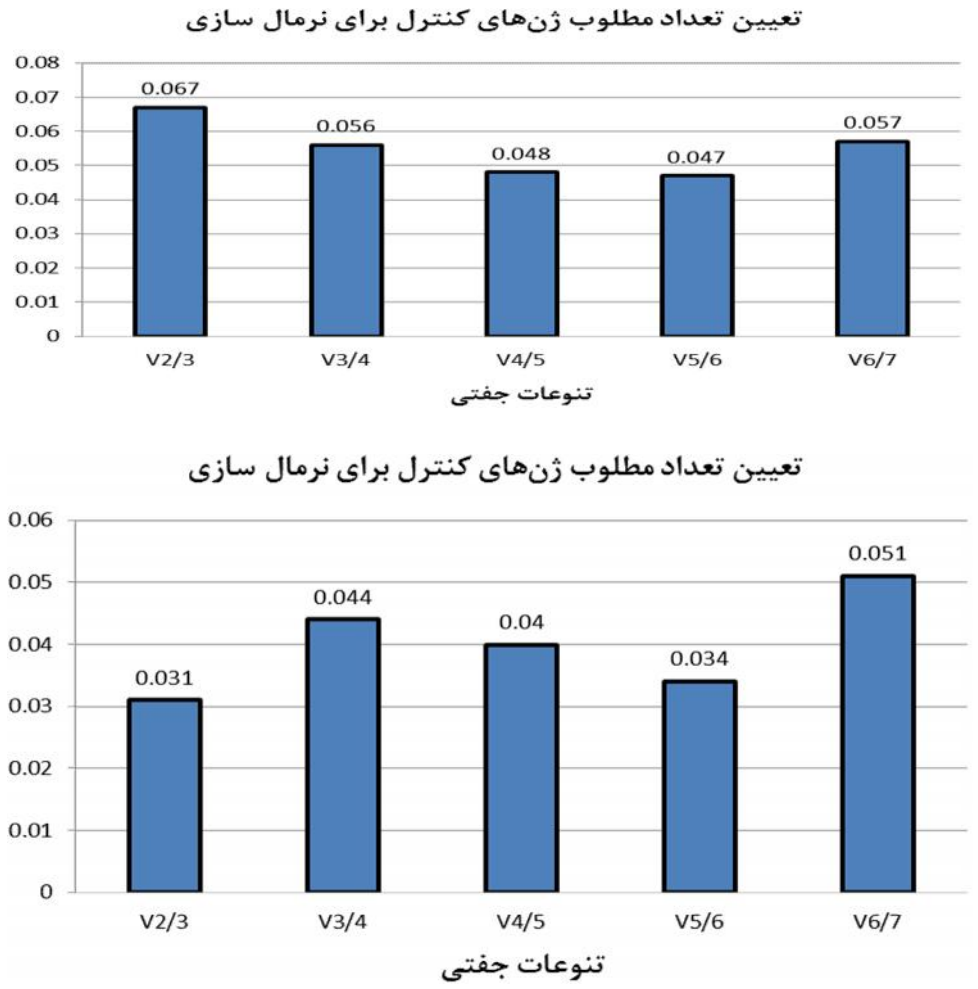


شکل ۱- مقادیر پایداری بیان (M) و رتبه‌بندی ژن‌های مرجع محاسبه شده توسط الگوریتم geNorm (نمودار بالا در بافت ریشه و نمودار پایین در برگ).

Figure 1. Average values (M) of expression stability and ranking of housekeeping genes analyzed by geNorm (above and below figure is related to root and leaf respectively).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-15]

[DOI: 10.29252/jcb.10.25.110]



شکل ۲- تعیین تعداد بهینه ژن‌های مرجع برای نرمال سازی در گیاه آلوروپوس، بالا: ریشه، پائین: برگ. حد آستانه ۰/۱۵ به‌عنوان معنی‌داری در نظر گرفته شد.

Figure 2. Determination of the optimal number housekeeping genes for normalization in *Aeluropus*, Using the cut-off value V = 0.15 (above and below figure is related to root and leaf respectively).

منابع

1. Andersen, C.L., J.L. Jensen and T.F. Rntoft. 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 Research, 64: 5245-50.
2. Ben-Saad, R., W. Ben-Ramdhan, N. Zouari, J. Azaza, D. Mieulet and E. Guiderdoni. 2012. Marker-free transgenic durum wheat cv. Karim expressing the AlSAP gene exhibits a high level of tolerance to salinity and dehydration stresses. Molecular Breeding, 30: 521-33.
3. Bevitori, R., M.B. Oliveira, M.F. Grossi-de-Sá, A.C. Lanna, R.D. da Silveira and S. Petrofeza. 2014. Selection of optimized candidate reference genes for qRT-PCR normalization in rice (*Oryza sativa* L.) during Magnaporthe oryzae infection and drought. Genetics and Molecular Research, 13: 9795-9805.
4. Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25: 169-93.
5. Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR RT-PCR: trends and problems. Journal of Molecular Endocrinology, 29: 23-29.
6. Cao, J., L. Wang and H. Lan. 2016. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in *Suaeda aralocaspica*, an annual halophyte with heteromorphism and C4 pathway without Kranz anatomy. PeerJ, 4: 16-97.
7. Ebrahimi, A., R. Maali-Amiri, Gh.A. Nematzadeh and H. Alizadeh. 2014. Bioinformatical analysis of Isolated ESTs from *Aeluropus littoralis* under salinity stress. Genetics engineering and Biosafety Journal, 3: 31-40 (In Persian).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-15]

[DOI: 10.29252/jcb.10.25.110]

8. 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 J.K. Zhu. 2010. Radically rethinking agriculture for the 21st century, Science, 327: 833-834.
9. Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany, 55: 307-319.
10. Flowers, T.J. and T.D. Colmer. 2008. Salinity tolerance in halophytes. New Philologist, 179: 945-963.
11. Gal, A.B., J.W. Carnwath, A. Dinnyes, D. Herrmann, H. Niemann and C. Wrenzycki. 2006. Comparison of real-time polymerase chain reaction and end-point polymerase chain reaction for the analysis of gene expression in pre-implantation embryos. Reproduction, Fertility and Development, 18: 365-371.
12. Gulzar, S., M.A. Khan and I.A. Ungar. 2003. Salt tolerance of a coastal salt marsh grass. Communications in Soil science and Plant analysis, 34: 2595-2605.
13. Gutierrez, L., M. Mauriat, J. Pelloux, C. Bellini and O. Van Wuytswinkel. 2008. towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. The Plant Cell, 20: 17-34.
14. Hashemi, S.H.R., G.A. Nematzadeh, G.R. Ahmadian, A. Yamchi and M. Kuhlmann. 2016. Identification and validation of *Aeluropus litoralis* reference genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization. Journal of Biological Research-Thessaloniki, 23: 18 pp.
15. Jain, M., A. Nijhawan, A.K. Tyagi and J.P. Khurana. 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications, 345: 646-651.
16. Jain, M., N. Kaur, R. Garg, J.K. Thakur, A.K. Tyagi and J.P. Khurana. 2006. Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). Functional and Integrative Genomics, 6: 47-59.
17. Jarošová, J. and K.K. Jiban. 2010. Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. BioMed Central Plant Biology, 10: 146.
18. Jian, B., B. Liu, Y. Bi, W. Hou, C. Wu and T. Han. 2008. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. BioMed Central Molecular Biology, 9: 59 pp.
19. Kamrava, S., B.J. Nadali and B. Nadali. 2016. Evaluation of Some Soybean Genotypes (*Glycine max*) under Salt Stress. Journal of Crop Breeding, 8: 57-63.
20. Karge, W.H., E.J. Schaefer and J.M. Ordovas. 1998. Quantification of mRNA by polymerase chain reaction (PCR) using an internal standard and a nonradioactive detection method. Methods in Molecular Biology, 110: 43-61.
21. Kaya, C., H. Kirnak, D. Higgs and K. Saltali. 2002. Supplementary calcium enhances plant growth and fruit yield in strawberry cultivars grown at high (NaCl) salinity. Scientia Horticulturae, 93: 65-74.
22. Modarresi, M., G.A. Nematzadeh and F. Moradian. 2011. Enzyme Assay of *Aeluropus littoralis* Regarding to the Salt (NaCl) Stresses, 5: 17-29.
23. Munns, R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. Plant, Cell Environment, 16: 15-24.
24. Narsai, R., A. Ivanova, S. Ng and J. Whelan. 2010. Defining reference genes in *Oryza sativa* using organ, development, biotic and abiotic transcriptome datasets. BioMed Central Plant Biology, 10: 56.
25. Pfaffl, M.W., A. Tichopad, C. Prgomet and T.P. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters, 26: 509-515.
26. Podevin, N., A. Krauss, I. Henry, R. Swennen and S. Remy. 2012. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR expression studies of the non-nodel crop *Musa*. Molecular Breeding, 30: 1237-1252.
27. Saad, R.B., W.B. Romdhan., N. Zouari, J. Azaza, D. Mieulet, J.L. Verdeil, E. Guiderdoni and A. Hassairi. 2011. Promoter of the *AlSAP* gene from the halophyte grass *Aeluropus littoralis* directs developmental-regulated, stress-inducible, and organ-specific gene expression in transgenic tobacco. Transgenic Research, 20: 10-18.
28. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology, 31 pp.
29. Wang, Z.L., L. Ping-hua, F. Mark, G. Zhi-zhong, C.S. Kim, Z. Changquing, B. Hans, Z. Jian-kang, B. Ray, H. Paul, Z. Yan-xiu and Z. Hui. 2004. Expressed sequence tags from *Thellungiella halophila*, a new model to study plant salt-tolerance. Plant Science, 166: 609-616.
30. Zouari, N., R. Ben Saad, T. Legavre, J. Azaza, X. Sabau, M. Jaoua, K. Masmoudi and A. Hassairi. 2007. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. Gene, 404: 61-69.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-15]

[DOI: 10.29252/jcb.10.25.110]

Validation of some of Housekeeping Genes in *Aeluropus littoralis* under Salinity Stress

Amin Ebrahimi[1], Sajad Rashidi Monfared[2], Amir Moradi Sarabshelli[3] and Parviz Heidari[4]

1- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Semnan
(Corresponding author: aminebrahimi@shahroodut.ac.ir)
2- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University
3- Ph.D. Student, Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University
4- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Semnan
Receive: November 2, 2016 Accepted: February 19, 2017

Abstract

Application of wild type crops or wild relatives' cultivars that are halophyte in plant breeding program would provide better results in order to develop cultivars that are resistant toward drought as well as salinity. Recently, *Aeluropus littoralis* has attracted the attention of researcher in order to identify novel genes and their regulatory elements that are involved in salinity stress. Currently, Quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) is one of the best and sensitive techniques in order to determine the expression profiling of genes in plants. In this method, normalizations of the obtained data with appropriate housekeeping genes are certainly crucial. In the current research, the efficiency of seven reference genes to be employed in the normalization of the data was investigated. Statistical analysis of the data was done via geNorm program and it was demonstrated that the *ACT11*, *Beta Actin* and *Beta tubulin and Beta tubulin* and *Beta Actin were* constitutively expressed in leaf as well as roots, respectively. Based on the gained results through Best Keeper, the *ACT11* poses the highest correlations with the BestKeeper (0.836 and 0.722 in leaf and root respectively). Additionally, it was shown that the *Beta tubulin* has the lowest coefficient variation in term of expression in root and leaf. Taken together, it was evidently demonstrated that the *ACT11*, *Beta Actin* and *Beta tubulin* are the best reference gene to be employed for the normalization of expression data in the *Aeluropus littoralis.*

Keywords: *Aeluropus littoralis,* Real time PCR, salinity, Reference gene and BestKeeper

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-15]

[DOI: 10.29252/jcb.10.25.110]