Crop Biotech.
Winter (2015) 12: 1-10.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره دوازدهم، زمستان ۱۳۹۴ (۱۰-۱)

ارزیابی میزان تغییرات بیان ژن‌های خانه‌دار در برهمکنش گندم با بیمارگر *Mycosphaerella graminicola* با روش Reverse northern dot blot

جلال غلام‌نژاد[۱]، فروغ سنجریان[۲*]، ابراهیم محمدی گل‌تپه[۳]، ناصر صفایی[٤]، خدیجه رضوی[٥]

۱. استادیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان، اردکان، ایران
(دانشجوی سابق دکتری بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس)
۲. استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران،
۳. استاد بخش بیماری‌شناسی گیاهی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس،تهران، ایران
٤. دانشیار بخش بیماری‌شناسی گیاهی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس،تهران، ایران
٥. استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۹/۹- تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۱۲/۲۳)

Evaluation of housekeeping gene expression of wheat interaction against *Mycosphaerella graminicola* with Reverse northern dot blot method

Jalal Gholamnezhad[1], Forough Sanjarian[2], Ebrahim Mohammadi Goltapeh[3], Naser Safaei[4], Khadijeh Razavi[5]

1. Assistant Professor, Faculty of agriculture and natural resources, Ardakan University (Former Ph.D. Student of Department of Plant Pathology, Tarbiat Modarres University)
2. Assistant Professor, Agriculture Biotechnology Institute, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Plant Pathology, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
4. Associate Professor, Department of Plant Pathology, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
5. Assistant Professor, Agriculture Biotechnology Institute, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
(Received: Nov. 29, 2015-Accepted: Mar. 13, 2016)

Abstract

As a rule the reference genes used in gene expression analysis have been selected for their housekeeping roles, but the variation observed in most of them is a major obstacle to their effective use. It is widely supported to identify and validate stable reference genes, since no single biological gene is stably expressed between cell types or within cells under different conditions. In this study, suitability of seven wheat housekeeping genes for normalization of mRNA expression in wheat leaves infected by *Mycosphaerella graminicola* was investigated. Expression level of Actin, Rubisco, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), Translation Elongation Factor 1α (*TEF*-1α), α-Tubollin, eukaryotic release factors 1 and 3 (*ERF*1 and *ERF*3) genes were examined by reverse northern dot blot method. Expression stabilities of the reference genes were statistically analyzed by Ecxel and SAS softwares. α-Tubolin, *TEF*-1α and Actin were the three most stable genes whereas the expression of Rubisco and *GAPDH* had the least stability. The presented comprehensive data on changes in expression of various wheat housekeeping genes in wheat- *M. graminicola* photosystem facilitate selection of reference genes for Reverse northern dot blot method.

Keywords: Gene expression analysis, Reference genes, wheat- *M. graminicola,* Reverse northern dot blot

چکیده

به‌طور کلی ژن‌های مرجع در تجزیه و تحلیل‌های بیان ژن، از بین ژن‌های خانه‌دار انتخاب می‌شوند، اما تغییرات دیده شده در مقدار بیان مانع اساسی برای استفاده بهینه از آن‌هاست. از آنجا که بیان هیچ تک ژنی در شرایط مختلف و سلول‌های متفاوت ثابت نیست، معرفی و اعتبارسنجی ژن‌های مرجع بسیار مهم است. در این تحقیق مناسب بودن هفت ژن خانه‌دار گندم برای نرمال‌سازی بیان mRNA در برگ این گیاه در هنگام آلودگی به قارچ *Mycosphaerella graminicola* مطالعه شده است. به این منظور بیان ژن‌های رمزکنندهٔ اکتین، روبیسکو، گلیسرآلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز ، فاکتور طویل‌سازی ترجمهٔ ۱ آلفا (*TEF 1α*)، آلفا-توبولین، فاکتورهای آزادکنندهٔ یوکاریوتی ۱ و ۳ (*ERF*1 و *ERF3*) در طول آلودگی توسط روش نوردن بلات معکوس اندازه گیری، و توسط نرم افزارهای اکسل و SAS از لحاظ آماری بررسی شد. بیان ژن‌های آلفا-توبولین، *TEF 1α* و اکتین از بیشترین پایداری برخوردار بود و ژن‌های روبیسکو و گلیسرآلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز کمترین ثبات بیان را داشتند. مطالعه مقایسه‌ای تغییرات در بیان ژن‌های مختلف خانه‌دار گندم در پاتوسیستم گندم - *M. graminicola* انتخاب ژن‌های مرجع را برای روش لکه‌گذاری نوردن‌بلات معکوس تسهیل می‌کند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه و تحلیل‌های بیان ژن، ژن‌های مرجع، پاتوسیستم گندم، *M. graminicola*، لکه گذاری‌نوردن بلات معکوس.

* نویسنده مسئول: فروغ سنجریان
E-mail: fsanjarian@nigeb.ac.ir

مقدمه

از میان روش‌های مختلفی که برای بررسی پروفایل بیانی ژن‌ها وجود دارد، PCR کمی زمان واقعی (Real-time PCR)، درشت آرایه (Macroarray) و ریزآرایه (Microarray) از روش‌هایی هستند که به‌صورت گسترده در این زمینه مورد استفاه قرار می‌گیرد و این روش‌ها نقش بسیار مهمی را در تحقیقات زیست شناسی دارد (Kavaousi *et al*., 2009). در مورد Real-time PCR شاخص‌هایی وجود دارد که لازم است در حین انجام PCR مورد توجه و کنترل قرار گیرند. این شاخص‌ها شامل موارد مقدار اولیه نمونه‌ها، غلظت RNA موجود در نمونه، کارایی ساخت cDNA، و تفاوت‌ها در فعالیت نسخه‌برداری‌های کلی در بافت‌ها و سلول‌های مورد تجزیه و تحلیل است (Chen *et al*., 2006). در مورد هر سه روش ذکر شده، برای به‌دست آوردن نتایج دقیق باید سطوح بیانی ژن‌های هدف به‌وسیلهٔ ژن‌های کنترل داخلی، که تحت شرایط مختلف بیان ثابتی دارند و به اصطلاح ژن¬های خانه‌دار یا Housekeeping نامیده می‌شوند، نرمال سازی گردند. ژن‌های کنترل داخلی باید سطح بیان پایداری در بافت-های مختلف تحت تیمارهای متفاوت داشته باشند (Frericks and Esser, 2008). در طول دهه‌های اخیر ژن‌های بتا- اکتین، گلیسرآلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH)، ۱۸S و ۲۶S RNA ریبوزومی، یوبیکوییتین C، آلفا-توبولین، فاکتور رونویسی ۱ آلفا و پروتئین باند شونده به TATA باکس به‌عنوان ژن‌های کنترل داخلی مناسب برای فرایند Real time PCR و همچنین ریزآرایه ارزیابی شده‌اند (Mitter *et al*., 2009). پیداکردن ژن‌های کنترل داخلی عمومی برای نرمال‌سازی در تمامی نمونه‌های مورد مطالعه کاری غیرممکن است. دلیل این امر این است که ممکن است سطوح بیانی ژن‌های کنترل داخلی در بافت خاصی ثابت باشد و در بافت‌های دیگر اینطور نباشد (Bustin, 2002; Bas *et al*., 2004; Glare *et al*., 2002).

برای مثال، ژن GAPDH به‌عنوان یک ژن مأخذ قابل اطمینان در سلول‌های غیر کشنده سرطان ریه عمل می‌کند، در حالی‌که ژن hypoxanthine phosphoribosyl-transferase (HPRT) دارای بیان با ثباتی در کبد است (Chen *et al*., 2006). مناسب بودن ژن‌های کنترل داخلی جهت نرمال‌سازی به‌وسیلهٔ نرم‌افزارهای الگوریتمی مانند geNorm، NormFinder، Bestkeeper و General Pattern Recognition انجام می‌گیرد. سپس، ژن‌هایی که در رده‌بندی دارای بالاترین امتیاز باشند قبل از انجام Real time PCR انتخاب می‌شوند. گندم یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی در جهان است که در رژیم غذایی اکثر مردم قرار دارد (Curtis *et al*., 2002). گیاه گندم در طول دورهٔ رشد در معرض تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده مختلفی مانند بیماری‌ها و خشکی قرار می‌گیرد که رشد گیاه را محدود می‌کنند (Bohnert *et al*., 1995). یکی از بیماری‌هایی که به گندم در زمان کشت خسارت زیادی در اکثر نقاط دنیا وارد می‌کند بیماری سوختگی برگ گندم می‌باشد (Goodwin *et al*., 2003). عامل این بیماری قارچ بیمارگر *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J.Schröt.in Cohen با شکل غیرجنسی *Zymoseptoria tritici* است (Quaedvlieg *et al*., 2011). راه‌های مبارزه با این بیماری متعدد هستند که از آن جمله می‌توان به‌روش‌های مبارزه زراعی، شیمیایی و استفاده از ارقام مقاوم اشاره نمود؛ با توجه به عدم کارایی روش‌های مبارزهٔ زراعی و شیمیایی در کنترل بیماری استفاده از ارقام مقاوم اقتصادی‌ترین، بهترین و از نظر زیست‌محیطی، سالم‌ترین روش مقابله با این بیماری است (Eayle, 1999). دانش ژنتیک مقاومت برای اصلاح گندم مقاوم به بیماری لکه برگی گندم از اهمیت زیادی برخوردار است. مقاومت ژنتیکی در ارقام مختلف به‌دو صورت کمی و کیفی گزارش شده است

(Mccartney *et al.,* 2003). ژن‌های متعددی در پاسخ گیاه به بیمارگر فعال یا خاموش می‌شوند و همچنین ممکن است بیان آن‌ها افزایش یا کاهش پیدا کند. بررسی بیان متمایز ژن‌ها یکی از روش‌های مهم برای مشخص نمودن اساس زیستی سیستم‌های بیولوژیک است (Wang *et al.,* 2009). جهت درک مکانیسم مقاومت به بیماری سوختگی برگ گندم، لازم است که الگوی بیانی ژن‌ها جهت یافتن مسیرهای حیاتی مورد بررسی قرار بگیرند، در نتیجه برای این مطالعات نیاز به ژن‌های خانه‌داری است که بیان ثابتی را در گندم و به‌خصوص در این پاتوسیستم داشته باشند (Tenea *et al.,* 2011). در این مطالعه، تعداد هفت ژن منتخب خانه‌دار برای این پاتوسیستم انتخاب شدند و ثبات بیان آن‌ها در گندم زمانی که برگ‌های آن به‌وسیلهٔ بیمارگر *M. graminicola* تلقیح شدند با استفاده از روش Reverse northern blot بررسی شد. در نهایت انحراف معیار بیان هر یک از ژن‌ها، که با استفاده از این روش به‌دست آمدند، با استفاده از نرم افزارهای Excel محاسبه و با نرم‌افزار SAS مورد مقایسه قرار گرفت. این هفت ژن کنترل داخلی بر اساس ثبات در میزان بیان ژن، که با استفاده از این روش کمی مورد ردیابی قرار گرفتند، رده‌بندی شدند.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان و ایجاد تنش بیمارگر

رقم گندم هگزاپلوئید متحمل زاگرس در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. برای کشت گیاهان، پس از اینکه خاک گلدان‌ها (محتوی پرلیت، خاک و خاکبرگ) سترون شد، با نسبت ۱:۱:۱ مخلوط و در گلدان‌های کوچک ۵۰۰ گرمی ریخته شدند. بعد از آماده‌سازی خاک گلدان‌ها، بذور را در داخل ظرف محتوی الکل ۷۰٪ به‌مدت ۳۰ ثانیه ریخته و سپس الکل را تخلیه و دو بار با آب مقطرسترون، بذرها شسته شدند. بعد از ضدعفونی سطحی، سه بذر در داخل هر گلدان قرارداده شد و روی بذرها به ضخامت یک سانتی‌متر از همان خاک ریخته شد. به‌منظور ارزیابی میزان تغییرات بیان ژن‌های خانه‌دار در گندم نسبت به بیمارگر *M. graminicola* در شرایط گلخانه‌ای، زمانی‌که گیاهچه‌ها به مرحلهٔ دو برگی (۱۲روزه‌گی) رسیدند، سوسپانسیون قارچ بیمارگر بر روی این گیاهان اسپری شد. جهت آماده‌سازی سوسپانسیون و پاشش آن بر روی گیاه از روش Chartrain و همکاران در سال ۲۰۰۴ استفاده شد.

به‌منظور تهیه cDNA گیاهان در شرایط بدون تنش و تنش با بیمارگر *M. graminicola*، در زمان‌های ۰، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی بیمارگر، نمونه‌برداری از برگ‌های گیاه گندم انجام گرفت و بلافاصله برگ‌ها در محل نمونه‌برداری به ظرف نیتروژن مایع منتقل و سپس در فریزر ۷۰°C- آزمایشگاه ذخیره شدند. نمونه‌های شاهد که با آب مقطر مایه‌زنی شده بودند نیز به‌همین ترتیب جمع‌آوری شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت.

انتخاب ژن‌ها و تکثیر آنها

در این تحقیق از هفت ژن منتخب خانه‌دار شامل اکتین، روبیسکو، گلیسرآلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*)، Translation Elongation Factor1-α (*TEF1*α)، آلفا-توبولین، فاکتورهای آزادکنندهٔ یوکاریوتی ۱ و ۳ (*ERF1* و *ERF3*) و همچنین ژن RNA 18S ریبوزومی جهت حذف نمودن اثر پس زمینه (Background) استفاده شد (جدول ۱). این ژن‌ها بر اساس مرور منابع، همواره کمترین تغییرات را در مطالعات انجام شده بیان ژن‌ها با روش‌های مختلفی از جمله Real-time PCR، داشته‌اند (Tenea *et al*., 2011; Paolacci *et al*., 2009; Gimenez *et al*., 2010). آغازگرهای اختصاصی برای هر ژن با استفاده از توالی‌های ژن‌های مورد نظر توسط نرم افزار Oligo5 طراحی شدند. پس از ساخت آغازگرهای اختصاصی

(جدول۱) شرایط PCR برای هر یک از جفت آغازگرهای هر ژن بهینه شد. برای انجام PCR از الگوی cDNA استفاده گردید که متعاقباً روش ساخت آن خواهد آمد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در شرایط دمایی ۹۵ ºC برای واسرشت‌سازی ابتدایی به‌مدت ۴ دقیقه، به دنبال آن ۳۰ چرخه دمای ۹۴ ºC برای ۴۵ ثانیه، دمای چسبیدن بسته دمای ذوب هر آغازگر به‌مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ ºC برای ۴۵ ثانیه و در نهایت ۷۲ ºC برای توسعهٔ نهایی به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از پایان واکنش برای مشاهدهٔ محصول حاصل، الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ در بافر 1x TAE انجام گرفت و جهت نمایان کردن قطعات DNA در ژل از رنگ آمیزی در ژل از رنگ اتیدیوم بروماید و لامپ UV استفاده شد. مقدار هر ژن از مقایسهٔ میزان روشنایی باند محصول PCR با میزان روشنایی باند متناظر Ladder و کمی‌کردن آن با نرم‌افزار Totallab مشخص شد. از محصول PCR هر ژن ۰/۵ تا ۱ میکروگرم جهت لکه‌گذاری بر روی غشا استفاده گردید.

جدول ۱. نام ژن‌ها و توالی‌های پرایمری مورد استفاده در نوردرن بلات معکوس

Candidate reference genes	Primers (5′ - 3′)	Annealing temp.
Actin	F: GCCACACTGTTCCAATCTATGA R: TGATGGAATTGTATGTCGCTTC	58 ºC
RUBISCO	F: GTGATGGCTTCGTCGGCTACC R: CTTCTTGACCTCCTCCACCTC	64 ºC
GAPDH	F: TCACTGACAAGGACAAGGCTG R: CTGGCTTCGCAAGTCTAACAG	64 ºC
TEF-1α	F: GGTGATGCTGGCATAGTGAAG R: GATGACACCAACAGCCACAG	64 ºC
α-Tubulin	F:GCTTTCAACACCTTCTTCAG R:GGGGCATAGGAGGAAAGCA	58 ºC
*ERF*1	F: ATTCAGTCATCACTTCAGTCG R: TCGCTCTTCCTCATTTGTGTC	56 ºC
*ERF*3	F: TGGCGAGGGGCAAGCACTAC R: GGAGGAGGAGGACGAGGATG	61 ºC
18S rRNA	F: CTT CGGGATCGGAGTAATGATTAA R: GCCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGA	58 ºC

ساخت پروب نشان‌دار

پس از پودر کردن بافت‌های اندام‌های هوایی در نیتروژن مایع با استفاده ازهاون چینی، استخراج RNA کل توسط کیت RNXplus شرکت سیناژن مطابق دستورالعمل انجام گرفت. در ابتدای کار، در حدود ۵ میکروگرم RNA کل با مقدار ۰/۵ میکرولیتر آغازگر مخلوط شدند. پس از واسرشت شدن در دمای ۶۵ ºC به‌مدت ۵ دقیقه و سرد کردن این مخلوط بر روی یخ، واکنش رونویسی معکوس در حضور Thermo Scientific RiboLock RNase و Reverse Transcriptase به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ ºC انجام گرفت. در مرحلهٔ پایانی به‌منظور غیر فعال نمودن آنزیم ویال به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ºC قرار گرفت و سپس به فریزر ۲۰ºC- منتقل شد. از RNA استخراجی ۰/۵ میکرولیتر آغازگر Ologo $(dt)_{18}$ و در حدود ۵ میکروگرم RNA کل با هم مخلوط شدند. پس از واسرشت نمودن در دمای ۶۵ به‌مدت ۵ مخلوط حاصل بر روی یخ گذاشته شد. به مخلوط حاصل جهت رونوشت برداری معکوس ۴ میکرولیتر بافر 5x، ۱ میکرولیتر از DIG-dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر RiboLock RNase و ۱ میکرولیتر Reverse Transcriptase (هر دو از شرکت Thermo Scientific، آلمان) اضافه شد و مخلوط حاصل به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ ºC قرار داده شد

و پروب نشاندار تهیه گردید. برای تکثیر ژن‌ها، جهت لکه‌گذاری بر روی غشا از cDNA ساخته شده به‌همین روش اما با dNTP معمولی، مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه درشت آرایه محصول PCR ژن‌های انتخابی با استفاده از محلول NaOH ۱ میلی‌مولار و محلول ۰/۲۵ مولار NaCl واسرشت شدند و در دستگاه بلاتر ۹۶ چاهکی بر روی غشاء لکه‌گذاری شدند. پس از خشک شدن غشاء در دمای اتاق، غشاء حاصل به‌مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰°C قرار داده شد تا مولکول‌های cDNA بر روی آن تثبیت شوند. از محصول PCR ژن RNA ۱۸ s ریبوزومی گندم و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (Zheng *et al.*, 2004).

جهت واسرشت کردن، نشانگرها تهیه شده به‌مدت ۵ دقیقه در آب جوش و به‌دنبال آن ۵ دقیقهٔ دیگر بر روی یخ قرار داده شدند. پیش دورگه‌سازی غشا با ۵۰ میلی‌لیتر از محلول پیش دورگ‌سازی با pH= ۷/۲ (۳۵ میلی‌لیتر SDS ۷٪، ۱۰۰ میکرولیتر EDTA ۱ میلی‌مولار و ۱۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲۵ مولار) در دمای ۶۵ °C به‌مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. در مرحلهٔ بعد ۵۰ میکرولیتر نشانگر واسرشته به ۵ میلی‌لیتر محلول پیش هیبریداسیون اضافه گردید و دورگ سازی به‌مدت یک شب در دمای°C ۶۵ انجام شد. بعد از دورگ‌سازی، غشاء سه مرتبه شستشو داده شد. شستشوی اول غشاء با محلول SSC ۲X حاوی ۰/۱ درصد SDS دو مرتبه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، شستشوی دوم غشا با محلول SSC ۰/۵X حاوی ۰/۱ درصد از SDS یک بار به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵°C و شستشوی آخر غشاء با محلول SSC ۰/۲X بدون SDS به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. در مرحلهٔ آخر ۱۰ میکرولیتر سوبسترای CDS-Star به غشا اضافه گردید. سپس غشا به تاریک خانه بوده و در معرض فیلم رادیولوژی (X-ray) گذاشته شد و بعد از ۳۰ دقیقه فیلم ظاهر گردید. امتیازدهی به لکه‌ها با استفاده از نرم افزار TotalLab صورت گرفت که میزان تیرگی لکه‌ها را براساس تعداد نقاط تیره موجود در محدوده لکه مورد نظر مشخص می‌کند. در مرحلهٔ آخر پردازش داده‌های غشا و قبل از ورود داده‌ها به نرم‌افزارهای آماری جهت حذف نمودن اثر پس زمینه (Back ground) همهٔ داده‌ها بر RNA ۱۸ s ریبوزومی تقسیم شدند و سپس داده‌های حاصل از نرم‌افزار TotalLab وارد نرم‌افزار Excel شدند.

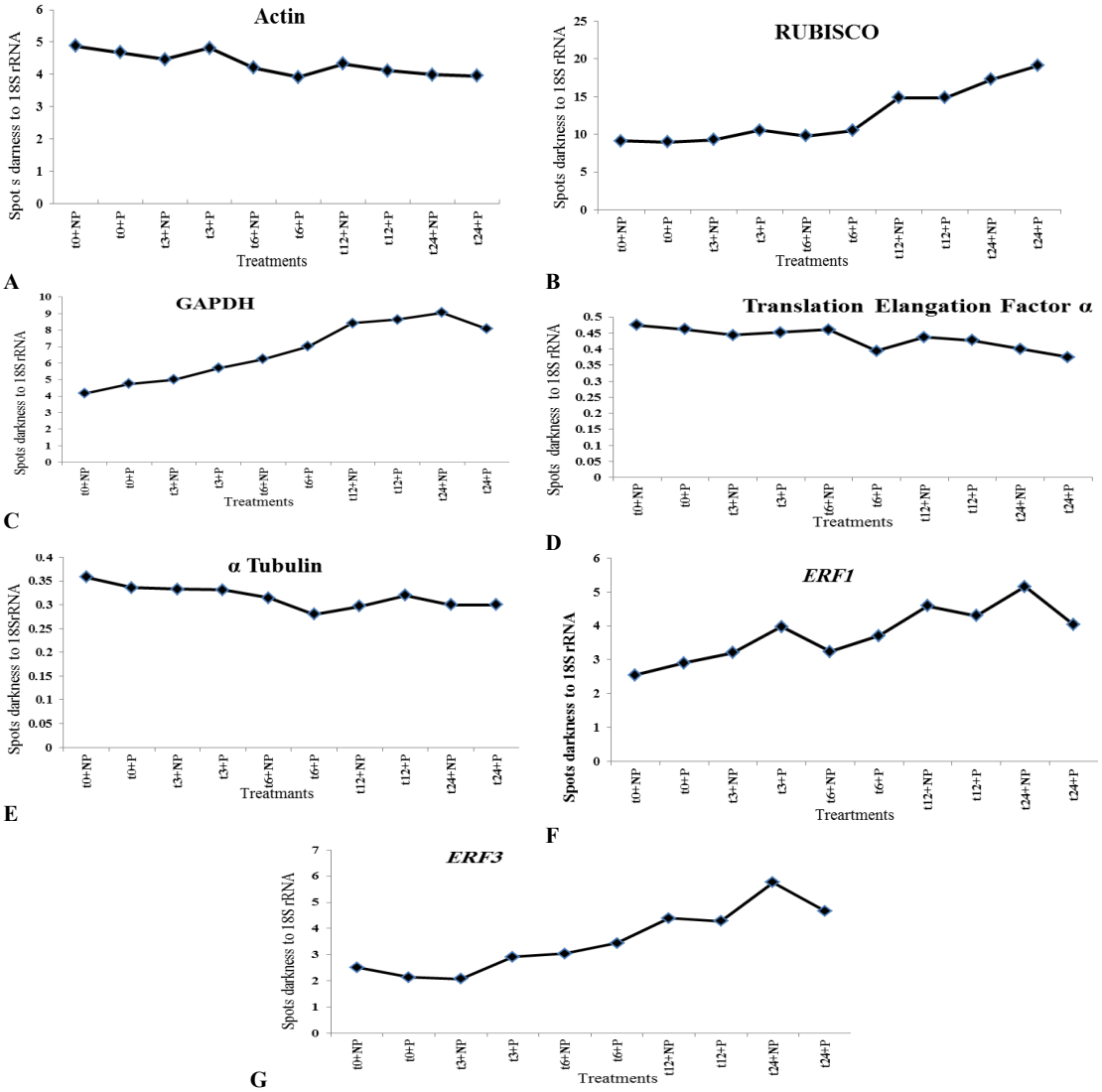
تجزیه و تحلیل‌های آماری

سطوح بیانی ژن‌ها، که در واقع تیرگی لکه‌ها است، به‌صورت کمی از نرم‌افزار TotalLab خروجی گرفته می‌شود. برای محاسبهٔ تغییرات بیان ژن در طول زمان داده‌های حاصله وارد Excel شدند، برای هر کدام از این ۷ ژن، در طول ۲۴ ساعت نمودار خطی (میانگین چهار تکرار) رسم شد و میزان نوسان این ژن‌ها با شاخص انحراف معیار اندازه‌گیری شد و سپس میانگین انحراف معیار مربوط به هر ژن با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان به‌وسیلهٔ نرم افزار SAS ver.9 مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

هدف اصلی از نرمال‌سازی بیان ژن‌ها کم‌کردن اختلاف بین نمونه‌های آزمایشی است، که این اختلافات ناشی از تفاوت در روش آزمایش، تفاوت در آماده‌سازی نمونه‌ها، کیفیت RNA کل، سنتز cDNA و راندمان تکثیر ژن‌های هدف می‌باشد. ژن‌هایی که برای فرایند نرمال‌سازی مورد استفاده قرار می‌گیرند ژن‌های مرجع نامیده می‌شوند و غالباً تغییراتی در سطوح بیانی آن‌ها در طول آزمایش اتفاق نمی‌افتد (Galiventi *et al.,* 2010). تحقیقات زیادی در مورد معرفی ژن مرجع در گندم جهت استفاده در روش Real time PCR صورت گرفته است، اما تاکنون مطالعات سیستماتیکی در مورد فرایند نرمال سازی ژن‌ها با استفاده از روش نوردرن بلات معکوس انجام نشده است ، مطالعه حاضر اولین تحقیق در مورد ژن‌های مرجع با این روش در

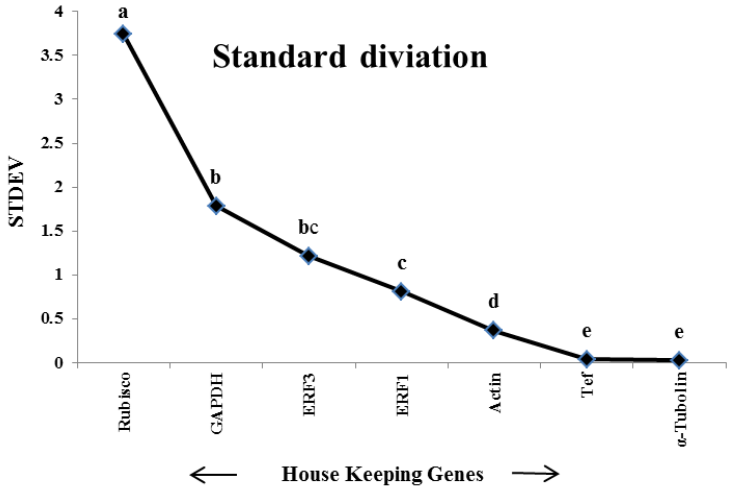
پاتوسیستم مذکور است. در این مطالعه هفت ژن (جدول۱) جهت انتخاب بهترین ژن‌های مرجع در پاتوسیستم گندم – *M. graminicola* مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس اطلاعات به‌دست آمده از غشاء (برای مثال شکل ۳ لکه‌ها مربوط به ژن اکتین) میزان بیان ژن‌های خانه‌دار در دورهٔ ۲۴ ساعت نمونه‌برداری به‌صورت متفاوتی تغییر پیدا کرد (نمودارهای ۱، A-G). مقادیر میزان پایداری بیان ژن‌های خانه‌دار با استفاده مقایسهٔ انحراف معیار داده‌های مربوط به هر ژن خانه‌دار در طی زمان ۲۴ ساعت مشخص شد. به این ترتیب که هر چه انحراف معیار کمتر باشد در نتیجه پراکندگی داده‌ها کمتر و داده‌ها از پایداری بیشتری در طی زمان نمونه‌برداری برخوردار بوده‌اند. ثبات بیان بالای ژن آلفا–توبولین، نشان‌دهندهٔ آن است که می‌توان از آن به‌عنوان یک ژن کنترل داخلی مناسب استفاده شود.



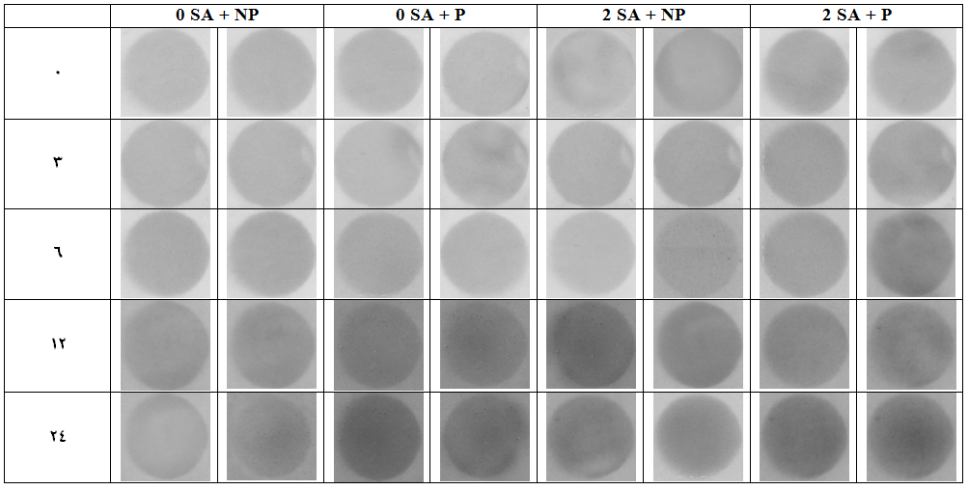
شکل۱. تغییر بیان ژن‌های خانه‌دار در روش نوردرن بلات معکوس. زمان نمونه برداری ۰، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از تلقیح بیمارگر و شاهد تلقیح شده با آب، t: زمان نمونه برداری به ساعت. NP+: تیمار بدون بیمارگر، P+: تیمار با وجود بیمارگر. نمودارها کمیت مربوط به تیرگی ژن‌ها نسبت به لکهٔ 18SrRNA در هر بلات را نشان می‌دهد که با استفاده از نرم افزار TotalLab به‌دست آمده است. A: اکتین، B: روبیسکو، C: گلیسرآلدهید ۳– فسفات دهیدروژناز، D: *TEF 1α*، E: آلفاتوبولین، F: فاکتورهای آزادکنندهٔ یوکاریوتی۱ (*ERF1*) G: فاکتورهای آزادکنندهٔ یوکاریوتی ۳ (*ERF*3)

جهت ارزیابی پایداری در سطوح بیانی این هفت ژن، انحراف معیار سطوح بیانی این ژن‌ها محاسبه شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9، مورد مقایسه قرار گرفتند. در شکل ۲ انحراف معیار هر یک از این ژن‌ها نشان داده شده است، انحراف معیار کمتر نشان‌دهندهٔ پایداری بیشتر ژن مذکور در طی فرایند آزمایش است.

بر اساس نتایج این مطالعه، ژن‌های آلفا–توبولین، *TEF-1α* و اکتین پایدارترین ژن‌ها جهت استفاده به‌عنوان ژن‌های کنترل داخلی بودند، و ژن *ERF*1 چهارمین ژن پایدار در این تحقیق بود. بر اساس نمودار ۲ ژن روبیسکو و GAPDH کمترین پایداری را در بین ژن‌های بررسی شده در این تحقیق با استفاده از روش نوردرن‌بلات معکوس داشتند.



شکل ۲. انحراف معیار بیان ژن‌های خانه‌دار، مقدار عددی بیشتری نشان‌دهندهٔ پایداری کمتر در بیان ژن است. انحراف معیارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.



شکل ۳. عکس از درشت آرایه‌های تهیه شده از بیان ژن خانه دار اکتین، 0SA+NP: گیاه گندم تحت تیمار آب مقطر و عدم وجود بیمارگر، 0SA+P: گیاه گندم تحت تیمار آب مقطر و بیمارگر ، 2SA+NP: گیاه گندم تحت تیمار غلظت ۲ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک و عدم وجود بیمارگر، 0SA+P: گیاه گندم تحت تیمار غلظت ۲ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک و بیمارگر؛ نقاط زمانی شامل ساعت ۰، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از نمونه‌برداری است.

در مطالعه‌ای که با استفاده از روش Real time PCR انجام گرفت، ثبات بیان ژن‌های خانه‌دار اکتین (Ta54825)، آلفا-توبولین (Ta25534)، بتاتوبولین (Ta44405)، یوبیکوئیتین (Ta50503)، GAPDH (Ta30768)، Translation elongation factor (Ta53964)، Translation initiation factor (Ta54280)، Ribosomal protein (Ta27771) و هیستون (Ta38797) در گندم بررسی شد. نتایج این تحقیق که با استفاده از الگوریتم‌های ریاضی geNorm و NormFinder انجام گرفت نشان داد که همگی این ژن‌ها از سطح بیان قابل قبولی در ارقام مختلف گندم برخوردار بودند و می‌توانند به‌عنوان ژن خانه‌دار انتخاب شوند (Paolacci *et al.,* 2009). با بررسی سه ژن TaFNRII (ferredoxin- ،ACT2 (actin 2) NADP(H) oxidoreductase، و rrn26 (a putative Homologuse to RNA 26S gene) که به‌عنوان ژن‌های مرجع شناخته شده‌اند و دو ژن دیگر TaWIN1 (14-3-3 وYP18-2 (Cyclophilin A like protein) در گندم‌های زمستانه تحت تنش نیترات، ژن‌های TaFNRII, ACT2 و CYP18-2 به‌عنوان ژن‌های مرجع در این سیستم پیشنهاد شده‌اند (Tenea *et al.,* 2011). مطالعه جهت تعیین بهترین ژن مرجع در دوره نمو گیاه چای مشخص شد که ژن‌های GAPDH و بتا توبولین بدترین انتخاب‌ها وژن TATA-box binding protein بهترین انتخاب در این سیستم از میان نه ژن مورد بررسی، هستند (Wu, Z.-J. *et al.,* 2016). گرچه از ژن GAPDH در مطالعات زیادی به‌عنوان ژن مرجع استفاده شده است، اما در مطالعه حاضر الگوی بیانی ثابتی را نشان نمی‌داد. مطالعات دیگری نیز عدم ثبات بیانی این ژن را نشان داده‌اند (Wu, Z.-J. *et al.,* 2016; Yang *et al*., 2016). با توجه به اینگونه مطالعات، تعداد بهینه ژن مرجع برای نرمال سازی در هر پژوهش، دو تا سه ژن است که با توجه به‌تعداد نمونه‌ها و روش مورد استفاده، متفاوت خواهد بود. در اغلب مواقع، استفاده از حداکثر سه ژن مرجع حدقابل قبولی از نرمال سازی را به وجود می‌آورد (Gime´nez *et al.,* 2010). مطالعات زیادی نشان دادند که بیان ژن‌های خانه‌دار در طی ایجاد تنش در شرایط مختلف می‌تواند به‌طور چشم‌گیری تغییر پیدا کند و در نتیجه تأثیر زیادی هم بر روی نتایج نهایی می‌گذارد (Bustin, 2000). علاوه بر شاخص‌های زیستی، محدودیت‌های آزمایشگاهی و عوامل اقتصادی در انتخاب تعداد مطلوب ژن‌های کنترل داخلی دخالت دارند (Lopez-Landavery *et al.,* 2014). ریزآرایه و Real time PCR از روش‌های مرسوم در کمی‌سازی بیان ژن هستند (Kavaousi *et al.,* 2009). استفاده از روش ریزآرایه احتیاج به تجهیزات خاص دارد که ممکن است در دسترس همگان نباشد. با روش Real time PCR نیز در هر آزمایش تعداد معدودی ژن را می‌توان بررسی کرد. درشت آرایه نیز یکی از ابزارهای قدرتمند بررسی بیان ژن است که امکان بررسی همزمان تعداد قابل توجهی ژن را با تجهیزات معمول آزمایشگاه می‌دهد (Ji *et al*, 2003). مطالعه حاضر ژن‌های مرجع مناسب برای استفاده در این روش ارایه داده که در برهمکنش گندم و قارچ *M. graminicola* کارآمد بوده و در مطالعات آتی مورد استفاده قرار خواهند گرفت.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (طرح ۴۵۱م) و همچنین دانشگاه تربیت مدرس برای فراهم آوردن امکانات این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Bas AG, Forsberg S, Hammarstrom ML (2004) Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, β-Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-

Dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. Scand. J. Immunol. 59: 566-573.

Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptation to environmental stresses. Plant Cell. 7: 1099-1111.

Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinol. 25: 169-193.

Chartrain L, Brading P, Makepeace J, Brown J (2004) Sources of resistance to *Septoria tritici* blotch and implications for wheat breeding. Plant Pathol. 53: 454-460.

Chen J, Rider DA, Ruan R, (2006) Identification of valid housekeeping genes and antioxidant enzyme gene expression change in the aging rat liver. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 61: 20-27.

Curtis BC, Rajaram S, Gomez Macpherson H, (2002) Bread wheat. Improvement production. FAO, Rome.

Eyal Z, (1999) Breeding for resistance to Septoria and Stagonospora diseases of wheat.In Septoria on Cereals: A Study of Pathosystems. JA Lucas, P. Bowyer, and AM Anderson, eds .CAB International, Wallingford, UK: 115-130.

Frericks M, Esser C, (2008) A toolbox of novel murine house-keeping genes identified by meta-analysis of large scale gene expression profiles. Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech. 1779: 830-837.

Galiventi C, Rozhdestvensky R, Brosius RT, Lehrach H, Konthur Z (2010) Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR. METHOD. 16(2): 450-461.

Gimenez MJ, Fernando P, Atienza SG (2010) Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae. Planta, DOI 10.1007/s00425-010-1290-y.

Glare E, Divjak M, Baile M, Walters E (2002) β-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalizing mRNA levels. Thorax, 57: 765-770.

Goodwin SB (2007) Back to basics and beyond: increasing the level of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. Australasian Plant Pathol. 36: 532-538.

Kavousim HR, Marashi H, Mozafari J, Bagheri AR (2009) Expression of phenylpropanoid pathway genes in chickpea defense against race 3 of *Ascochyta rabiei*. Plant Pathol. J., 8: 127-132.

López-Landavery, EA, Portillo-López A, Gallardo-Escárate C, Del Río-Portilla MA (2014) Selection of reference genes as internal controls for gene expression in tissues of red abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca, Vetigastropoda; Swainson, 1822). Gene 549: 258–26

Mccartney C, Brute-Babel A, Lamari L, Somers D (2003) Chromosomal location of a race-specific resistance gene to *Mycosphaerella graminicola* in the spring wheat ST6. Theor. Appl Genet. 107: 1181- 1186.

Mitter K, Kotoulas G, Magoulas A, Mulero V, Sepulcre P *et al*., (2009) Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. 153: 340-347.

Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M (2009 Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. BMC Molecul. Biol. 10(11): 1-

27.

Quaedvlieg W, Kema GHJ, Groenewald JZ, Verkley GJM, Seifbarghi S, Razavi M, Gohari AM, Mehrabi R (2011) Zymoseptoria gen. Nov.: A new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts. Persoonia – Molecul. Phyl and Evol. Fungi. 26: 57-69.

Tenea GN, Bota AP, Raposo F, Maquet C (2011) Reference genes for gene expression studies in wheat flag leaves grown under different farming conditions. BMC. 4:373-385.

Wang X, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang C, Liu BZ, Zhao J, Han Q, Huang L (2009) cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with *Puccinia striifonnis* f. sp. *tritici*. BMC 10: 289-304.

Wu, ZJ, Tian Ch, Jiang Q, Li X-H, Zhuang (2016) Selection of suitable reference genes for qRT-PCR normalization during leaf development and hormonal stimuli in tea plant (*Camellia sinensis*). *Sci. Rep.* 6, 19748; doi: 10.1038/srep19748.

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. *Front. Plant Sci*. 7:86. doi: 10.3389/fpls.2016.00086

Zheng J, Zhao J, Tao Y, Wang J, Liu Y, Fu J, Jin Y, Gao P, Zhang J, Bai Y, Wang G (2004) Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. Plant Molecul. Biol. 55: 807-823.