Crop Biotech.
Spring (2021) 10(4): 43-65. DOI: 10.30473/CB.2021.58408.1850

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دهم، شماره چهارم، پیاپی سی‌وچهارم، تابستان ۱۴۰۰ (۷۸-۶۷)

«مقاله پژوهشی»

بررسی پایداری برخی ژن‌های مرجع در ارقام سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین (*Ocimum basilicum* L.) تحت تنش‌های غیر زیستی

مژگان شاهیوند[۱]، رضا میردریکوند[۲*]، مسعود گماریان[۳]، کامران سمیعی[٤]
۱ و ۳. دانشجوی دکتری و استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک. ایران.
۲. استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران.
٤. استادیار، [illegible] واحد کنگاور، دانشگاه آزاد اسلامی، کنگاور، ایران.
(تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۲/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/٦/۳۱)

Evaluation of expression stability of some reference genes in green and red cultivars of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) under abiotic stresses

Mojgan Shahivand[1], Reza Mir Drikvand[2*], Masoud Gomarian[3], Kamran Samiei[4]
1, 3. Ph.D. Candidate and Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Agriculture, Kangavar Branch, Islamic Azad University, Kangavar, Iran.
(Received: Apr. 30, 2021 - Accepted: Sep. 22, 2021)

Abstract

The Real-time PCR is a very powerful technique for the analysis of gene expression in various organisms. However, normalizing gene expression data and obtaining reliable results largely depends on the selection of stable reference genes. In this study, the expression stability of six general reference genes (EF-1α, 18S rRNA, ACTIN, β-Tubulin, HSP and GAPDH) was investigated in green and red cultivars of sweet basil under five abiotic stresses (cold, drought, heat, salt and light). The stability of these reference genes was analyzed using BestKeeper and NormFinder softwares. Results showed that all reference genes had different expression levels in both green and red cultivars of sweet basil. There was no significant difference in expression between green and red cultivars. The highest and lowest expression levels were calculated for β-Tubulin and 18S rRNA reference genes, respectively. The results of BestKeeper software identified HSP and ACTIN genes as stable reference genes, respectively. The NormFinder software identified β-Tubulin genes as stable reference gene. Final ranking of the results of BestKeeper and NormFinder softwares identified ACTIN gene as the most stable reference gene for the gene expression studies in green and red cultivars of sweet basil using real-time PCR.

Keywords: Environmental stresses, Expression analysis, Expression ranking, Gemomics, Real-Time PCR

چکیده

روش PCR در زمان واقعی یک تکنیک بسیار قدرتمند برای تجزیه و تحلیل بیان ژن در موجودات گوناگون است. با این حال، نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن حاصل از این تکنیک و همچنین به‌دست آوردن نتایج قابل اعتماد تا حد زیادی به انتخاب ژن‌های مرجع مناسب و پایدار بستگی دارد. در این مطالعه، پایداری بیان شش ژن مرجع پرکاربرد (EF-1α، 18S rRNA، ACTIN، β-Tubulin، HSP و GAPDH) در ارقام سبز و قرمز ریحان شیرین تحت پنج تنش غیرزیستی (سرما، خشکی، گرما، شوری و تاریکی) مورد بررسی قرار گرفت. پایداری ژن‌های مرجع مذکور با استفاده از نرم‌افزارهای BestKeeper و NormFinder مورد تجزیه و تحلیل قرار داده شد. نتایج نشان داد که تمامی ژن‌های مرجع مورد بررسی دارای سطوح بیان متفاوتی در تنش‌های غیرزیستی در گیاه ریحان شیرین هستند. ژن‌های مرجع مورد بررسی از نظر میزان بیان تفاوت معنی‌داری بین ارقام سبز و قرمز نشان ندادند. بالاترین و پایین‌ترین مقادیر بیان ژن در ارقام سبز و قرمز ریحان شیرین تحت تنش‌های غیرزیستی به ترتیب برای ژن‌های مرجع β-Tubulin و 18S rRNA محاسبه شد. نتایج بررسی با نرم‌افزار BestKeeper به ترتیب ژن‌های HSP و ACTIN را به‌عنوان ژن مرجع پایدار مشخص کرد. نرم افزار NormFinder ژن β-Tubulin را به‌عنوان ژن مرجع پایدار شناسایی کرد. رتبه‌بندی نهایی نتایج نرم افزارهای BestKeeper و NormFinder ژن ACTIN را به عنوان پایدارترین ژن مرجع برای مطالعات بیان ژن در ارقام سبز و قرمز ریحان شیرین با استفاده از تکنیک PCR در زمان واقعی مشخص کرد.

واژه‌های کلیدی: بررسی بیان، تنش‌های محیطی، رتبه‌بندی پایداری، ژنومیکس، PCR در زمان واقعی.

* نویسنده مسئول: رضا میردریکوند
E-mail: drikvand_r@yahoo.com

مقدمه

جنس ریحان (*Ocimum* L.) شامل مجموعه‌ای از گیاهان یکساله علفی از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است. سالیان درازی است که خصوصیات شیمیایی ترکیبات موجود در روغن و اسانس گونه‌های گیاهی موجود در این جنس به خوبی شناخته شده است. این گونه‌های گیاهی دارای اثرات دارویی مختلفی بوده و کاربردهای درمانی و بهداشتی متعددی دارند. جنس ریحان از جمله متنوع‌ترین جنس‌های گیاهی بوده و تخمین زده می‌شود که بیش از ۱۵۰ گونه مختلف در این جنس قرار گرفته باشند (Ahmed *et al.*, 2019; Dhama *et al.*, 2021). در بین گونه‌های مختلف این جنس، گونه ریحان شیرین (*O. basilicum* L.) بیشترین پراکنش را در نقاط مختلف دنیا داشته و نسبت به سایر گونه‌ها، بیشترین کاربرد را در صنایع پزشکی و صنعتی به خود اختصاص داده است. گیاه ریحان حاوی متابولیت‌های ثانویه مختلفی است که از آن جمله می‌توان به فلاونوئیدها، تانن‌ها، رزماریک اسید، فنیل‌پروپانوئیدها و ترپن‌ها اشاره کرد (Rezaie *et al.*, 2020; Dhama *et al.*, 2021). مطالعات متعدد نشان داده‌اند بخش‌های مختلف گیاه ریحان حاوی متابولیت‌های ثانویه متنوعی هستند که دارای خاصیت ضد باکتری، ضد قارچی، ضد انگلی، و ضد لاروی هستند و خاصیت دورکنندگی حشرات نیز برای آن‌ها به اثبات رسیده است (Shahrajabian *et al.*, 2020; Dhama *et al.*, 2021).

ژنومیکس یکی از مهم‌ترین جنبه‌های تحقیقاتی است که می‌تواند در درک مکانیسم بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و همچنین یافتن راه‌کارهایی جهت افزایش کمیت و کیفیت این ترکیبات در گیاهان مختلف و از جمله ریحان به‌کار برده شود (Rai *et al.*, 2019). مهم‌ترین پیش‌نیاز برای یافتن چنین راه‌کارهایی، شناسایی ژن‌های بیوسنتزی و بررسی خصوصیات و نقش آن ژن‌ها در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان است. بررسی میزان بیان ژن‌های بیوسنتزی در بافت‌ها و اندام‌های مختلف گیاهی یکی از مهم‌ترین موارد در شناسایی نقش این ژن‌ها در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه است (Delfin *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2021).

بررسی بیان ژن‌های بیوسنتزی در بافت‌ها و اندام‌های مختلف گیاهی روش‌هایی مختلفی وجود دارند که از بین آن‌ها PCR در زمان واقعی دقیق‌ترین و مطمئن‌ترین روش بوده و از آن برای تأیید نتایج سایر روش‌ها استفاده می‌شود (Forootan *et al.*, 2017). روش PCR در زمان واقعی به علت برخورداری از مزیت‌هایی مانند سرعت تجزیه و تحلیل بالا، حساسیت بالا، تشخیص در زمان واقعی محصولات واکنش و اندازه‌گیری دقیق بیان ژن‌های مورد بررسی، به گسترده‌ترین روش کمی‌سازی بیان ژن در مطالعات ترانسکریپتوم تبدیل شده است (Gachon *et al.*, 2004; Kozera and Rapacz, 2013). همانند سایر روش‌های مولکولی، واکنش PCR در زمان واقعی با محدودیت‌هایی مواجه است و مرسوم‌ترین روش برای کنترل این محدودیت‌ها، استفاده از یک ژن مرجع است که به‌وسیله‌ی آن مقادیر بیان ژن‌ها نرمال‌سازی می‌شوند (Ebrahimi *et al.*, 2018; Forootan *et al.*, 2017). استفاده از یک ژن مرجع مناسب و پایدار یکی از مهم‌ترین موارد در مطالعات بیانی توسط PCR در زمان واقعی بوده و در ایجاد نتایج دقیق و قابل استناد تأثیر بسیار زیادی خواهد داشت (Kozera and Rapacz, 2013; Joseph *et al.*, 2018). ژن‌های مرجع در واقع ژن‌های خانه‌داری (Housekeeping) هستند که همواره در تمامی سلول‌های یک موجود بیان شده و بیان آن‌ها تحت شرایط مختلف زیستی تغییر نمی‌یابد. این ژن‌ها دارای نقش‌های ساختاری و کارکردی مهمی در سلول هستند و هومئوستازی سلول بدون وجود آن‌ها امکان‌پذیر نیست (Zhang

(*et al.*, 2015; Joseph *et al.*, 2018).

تاکنون ژن‌های مرجع مختلفی در گیاهان مختلف معرفی و به‌کار برده شده‌اند، که از آن جمله می‌توان به ژن‌های EF-1α، UBQ، UBC، 18S rRNA، ACTIN، β-Tubulin، α-Tubulin، HSP، GAPDH و TBP اشاره کرد (Kozera and Rapacz, 2013; Wang *et al.*, 2019; Kiarash *et al.*, 2018; Tong *et al.*, 2009; Gutierrez *et al.*, 2008; Ebrahimi *et al.*, 2018). با توجه به این امر که سطوح بیان ژن‌های مرجع باید همواره بین بافت‌های مختلف گیاه و همچنین در تمامی مراحل رشد آن ثابت بوده و نباید تحت تأثیر شرایط زیستی گیاه قرار گیرد، در هر مطالعه بیانی توسط PCR در زمان واقعی ابتدا می‌بایست ثبات و پایداری بیان چندین ژن مرجع بررسی و ارزیابی شود تا مناسب‌ترین و پایدارترین آن‌ها به‌منظور نرمال‌سازی بیان سایر ژن‌ها انتخاب گردد (Bustin, 2000; Wang *et al.*, 2019; Jaiswal *et al.*, 2019). انتخاب مناسب‌ترین و پایدارترین ژن مرجع با بررسی میزان پایداری بیان این ژن‌ها در نمونه‌های مورد نظر با استفاده از روش‌های آماری مبتنی بر آماره‌هایی نظیر واریانس، ضریب تغییرات، میانگین هندسی و ضریب همبستگی تعیین می‌شود (Pfaffl *et al.*, 2004; Vandesompele *et al.*, 2002).

در پژوهشی، میزان پایداری ۱۰ ژن مرجع در بافت‌های مختلف گیاه بلوط چوب‌پنبه‌ای *Quercus suber* بررسی شد و ژن اکتین به‌عنوان پایداترین ژن مرجع انتخاب گردید (Marum *et al.*, 2012). در پژوهشی دیگر، میزان پایداری ۱۳ ژن مرجع در بافت‌های مختلف گیاه سویا تحت تنش غیرزیستی بررسی شد. نتایج نشان داد که ژن ELF1 بیشترین میزان پایداری را نسبت به سایر ژن‌ها نشان داده است (Le *et al.*, 2012). در پژوهشی مشابه، میزان پایداری ۱۴ ژن مرجع در بافت‌های مختلف گیاه بامبو *Phyllostachys edulis* و در دو فاز رویشی و زایشی مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین میزان پایداری ژن‌های مرجع مختلف این گیاه وجود دارد (Fan *et al.*, 2013). در گیاه چچم *Lolium multiflorum* از تعداد ۱۱ ژن مرجع مورد بررسی، ژن GAPDH از بالاترین میزان پایداری تحت شرایط تنش زیستی برخوردار بود (Liu *et al.*, 2018). در پژوهشی در سال ۲۰۲۰ میزان پایداری بیان تعداد ۱۴ ژن مرجع در گیاه شبدر سفید مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که ژن‌های 60SrRNA و ACT101 به‌ترتیب پایدارترین ژن‌های مرجع این گیاه در شرایط مختلف هستند (Pu *et al.*, 2020).

در مطالعه حاضر برای اولین‌بار، میزان پایداری شش ژن مرجع پرکاربرد EF-1α، 18S rRNA، ACTIN، β-Tubulin، HSP و GAPDH در کولیتوارهای سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین تحت شرایط تنش‌های غیرزیستی خشکی، شوری، سرما، گرما و تاریکی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، شرایط کشت و محل اجرای آزمایش

بذور دو کولیتیوار سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین (*O. basilicum* L.) از بانک بذر مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شد و پس از تأیید و تعیین میزان قوه نامیه، برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور تهیه مواد گیاهی مورد نیاز جهت اجرای مراحل مختلف آزمایش، بذور ریحان در گلدان‌هایی با قطر ۱۵ سانتی‌متر و در مخلوط از رس، شن و پیت (با نسبت ۶۰: ۲۰: ۲۰) کشت شدند. گلدان‌ها در شرایط نوری و دمایی معمول کشت شامل ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲۰ درجه

سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد نگهداری شدند. آبیاری بر اساس نیاز گیاه و به طور متوسط هر ۲ تا ۳ روز صورت گرفت، به‌طوری‌که ظرفیت زراعی مزرعه کمتر از ۸۰ درصد نگردد.

شرایط محیطی و اعمال تنش‌ها

در تحقیق حاضر به منظور بررسی پایداری ژن‌های مرجع کاندید، تنش‌های زیستی مختلفی از جمله خشکی، شوری، سرما، گرما و تاریکی اعمال شدند. برای اعمال تیمار تنش خشکی، گیاهان چهار هفته‌ای به مدت یک هفته تحت تنش کم آبیاری و در رطوبت ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه قرار گرفتند. به منظور اعمال تنش شوری، گیاهان چهار هفته‌ای به مدت ۴۸ ساعت با استفاده از محلول نمکی NaCl با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار آبیاری شدند. برای اجرای تیمار تنش سرمایی، گیاهان چهار هفته‌ای ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰ درجه و پس از آن ۲۴ ساعت در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اعمال تنش گرما، گیاهان چهار هفته‌ای به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در نهایت برای اجرای تیمار تنش تاریکی، گیاهان چهار هفته‌ای به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی کامل و در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. از گیاهان رشد یافته در دمای بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی و در خاک با میزان رطوبت بالاتر از ۸۰ درصد ظرفیت زراعی، به عنوان شاهد برای تمامی تنش‌ها استفاده شد. پس از پایان یافتن مدت زمان اعمال تنش‌ها، نمونه‌برداری از برگ‌های گیاهان مورد تنش و شاهد صورت گرفت و نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شدند. نمونه‌ها به منظور نگهداری به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. نمونه‌برداری‌ها در سه تکرار انجام شد و هر تکرار شامل سه گیاه بود.

استخراج RNA و ساخت رشته اول cDNA

استخراج RNA کل از نمونه‌های برگی گیاهان با استفاده از کیت استخراج RNA (CinnaPure) شرکت سیناژن و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده کیت صورت گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز نمونه‌های استخراج شده در ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ بررسی شد. به منظور حذف DNA ژنومی احتمالی، از آنزیم DNaseI شرکت (Thermo Fisher Scientific) استفاده شد و سپس عدم حضور DNA در نمونه‌های RNA تیمار شده با این آنزیم، با واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده روی الگوی RNA کل مورد تأیید قرار گرفت. ساخت رشته اول cDNA از تمامی نمونه‌های RNA استخراج شده با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت یکتا تجهیز آزما و براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

ژن‌های مرجع انتخابی و طراحی آغازگرها

به منظور بررسی میزان پایداری و تعیین بهترین ژن مرجع در شرایط محیطی مختلف، تعداد شش ژن مرجع پرکاربرد EF-1α، 18S rRNA، ACTIN، β-Tubulin، HSP و GAPDH انتخاب شدند. بر این اساس، به علت عدم وجود توالی این ژن‌های مرجع برای گیاه ریحان، توالی‌های کد کننده این ژن‌ها با استفاده از کتابخانه EST این گیاه که در سایت NCBI موجود است، شناسایی شدند. برای این منظور، توالی پروتئینی شش ژن مرجع گیاهان مختلف از سایت NCBI دانلود و با استفاده tBLASTn علیه کتابخانه EST گیاه ریحان هم‌ردیف شد. توالی‌های حاصل از tBLASTn سرهم‌بندی شده و قطعات حاصل که دارای توالی کد کننده کامل شش ژن مرجع بودند به‌عنوان الگو برای طراحی آغازگر مورد استفاده قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد با استفاده از توالی‌های شناسایی شده، آغازگرهایی با استفاده از نرم‌افزار Allel ID 6.0

طراحی شدند (جدول ۱).

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

نام ژن	کارکرد ژن	نام آغازگر	توالی آغازگر ('3-'5)	طول (bp) قطعه	T_a (^0C)
Beta tubulin	اسکلت سلولی	β-Tubulin-F	AGTATCCGACACTGTTGTTGAG	۱۳۷	۵۸
		β-Tubulin-R	GGGTGGTAAGTTTGAGGGTTC		
Elongation factor 1 alpha	ترجمه	EF-1α-F	AGGAACTTGAGAAGGAACC	۱۶۰	۵۵
		EF-1α-R	ATCACACCAACAGCAACC		
Heat shock protein	سیستم چاپرونی	HSP-F	AGCGGCGGACGAACTTACC	۷۵	۶۰
		HSP-R	GAAGGAAGGAGCAGGAGGAGAAG		
Beta actin	اسکلت سلولی	ACTIN-F	AGAGAAGCGAGGATTGAACC	۱۱۸	۵۸
		ACTIN-R	CCGACAGGATGAGCAAGG		
18s ribosomal RNA	ساختمان ریبوزوم	18S-F	TTGTTACGACTTCTCCTTCC	۱۲۴	۵۵
		18S-R	GCTCCTACCGATTGAATGG		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	اکسیداسیون و احیاء سلولی	GAPDH-F	CAGCCACCGTGACTTGAG	۱۲۷	۶۰
		GAPDH-R	GAGAGCGATGCCGTTGAG		

واکنش PCR در زمان واقعی و انتخاب پایداترین ژن مرجع

واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از مستر میکس سایبرگرین شرکت یکتا تجهیز آزما و در یک ترموسایکلر BioRad CFX96 انجام شد. اجرای تمامی واکنش‌های PCR در زمان واقعی در دو تکرار تکنیکی صورت گرفت. کارایی و اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده به ترتیب با استفاده از منحنی استاندارد و منحنی ذوب تعیین شد. تعیین پایدارترین ژن مرجع در ارقام ریحان شیرین تحت تنش‌های مختلف با استفاده از دو نرم‌افزار BestKeeper v1.0 (2004) و NormFinder v0.953 (2003) صورت گرفت. نرم‌افزار BestKeeper از مقادیر Ct تبدیل نشده برای بررسی میزان پایداری ژن‌های مرجع استفاده می‌کند (Pfaffl *et al.*, 2004). با استفاده از BestKeeper، تغییرات Ct و انحراف معیار محاسبه شد و ژن‌هایی با انحراف معیار بیشتر از یک ناپایدار در نظر گرفته شده و حذف شدند. در نرم‌افزار NormFinder از مقادیر نسبی بیان استفاده شد و مقادیر Cp با استفاده از روابط ΔCp و $2^{-\Delta Cp}$ به کمیت‌های نسبی تبدیل شدند (Vandesompele *et al.*, 2002). در نهایت، ارزش پایداری (Stability value: SV) محاسبه شد و ژن‌های مرجع با کمترین مقدار SV به‌عنوان پایدارترین ژن‌ها در نظر گرفته شدند (Andersen *et al.*, 2004).

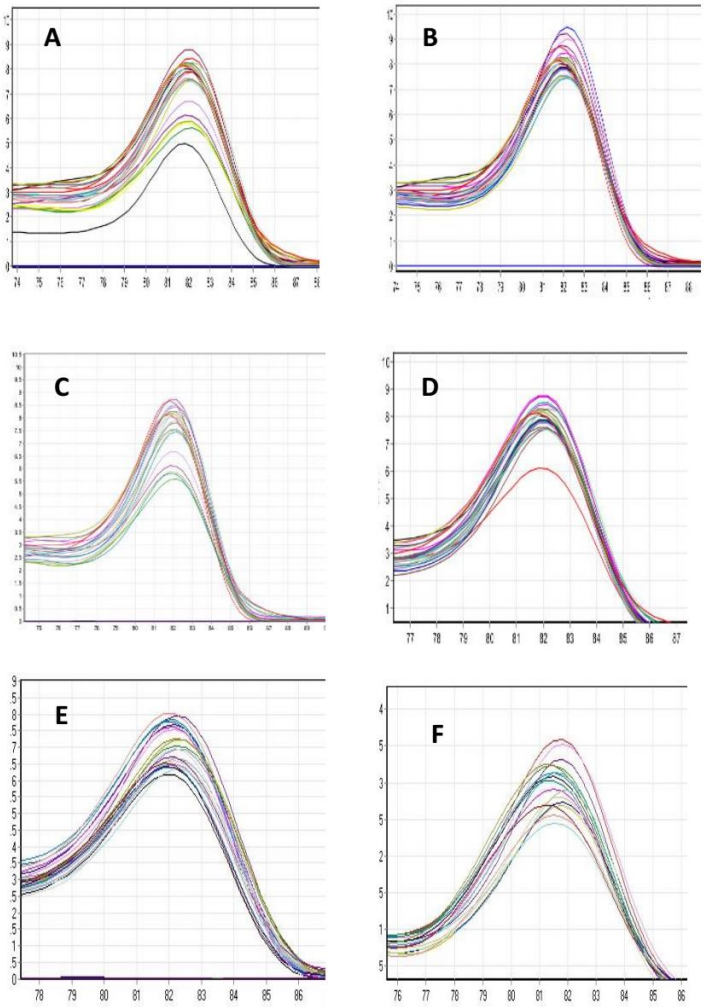
نتایج و بحث

به‌منظور بررسی میزان پایداری بیان و انتخاب پایدارترین ژن مرجع در کولیتوارهای سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین تحت شرایط تنش‌های غیرزیستی خشکی، شوری، سرما، گرما و تاریکی، شش ژن مرجع پرکاربرد EF-1α، 18S rRNA، ACTIN، β-Tubulin، HSP و GAPDH مورد بررسی قرار گرفتند. در ابتدا به‌منظور اطمینان از انجام واکنش PCR در زمان واقعی با دقت و کارایی بالا، کارایی

واکنش و همچنین اختصاصی بودن آغازگرها بررسی شد. نتایج تعیین کارایی واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از منحنی استاندارد نشان داد که آغازگرهای طراحی شده برای تمام ژن‌های مرجع مورد بررسی دارای کارایی تکثیر بیشتر از ۹۰ درصد هستند (جدول۲). بیشترین و کمترین میزان کارایی ژن‌های مرجع به ترتیب مربوط به ژن‌های ACTIN و HSP بود (جدول ۲). نتایج بررسی میزان اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های مرجع با استفاده از منحنی ذوب نشان داد که تمامی آغازگرهای طراحی‌شده تنها محصول مورد نظر را تکثیر کرده و فاقد هرگونه دایمر و یا باند اضافی بودند (شکل ۱).

جدول ۲. پارامترهای میزان کارایی آغازگرهای مورد استفاده

نام ژن	درصد کارایی	شیب منحنی	R^2
β-Tubulin	۹۳	-۳/۵۴۱	۰/۹۹۵۲
EF-1α	۹۷	-۳/۷۷۲	۰/۹۹۸۶
HSP	۹۱	-۳/۳۸۲	۰/۹۹۲۱
ACTIN	۱۰۸	-۳/۳۸۹	۰/۹۹۹۶
18S rRNA	۹۴	-۳/۸۹۵	۰/۹۹۷۵
GAPDH	۹۶	-۳/۴۹۵	۰/۹۹۹۳

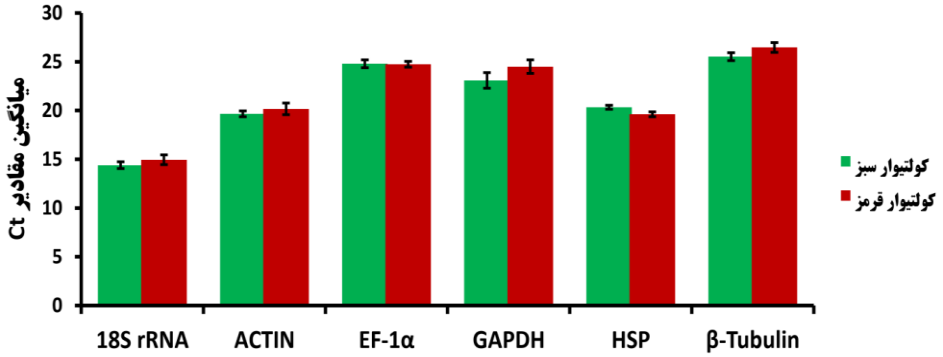


شکل ۱. نمودار ذوب ژن‌های مرجع در ارقام سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین. (A) نمودار ذوب ژن مرجع EF-1α، (B) نمودار ذوب ژن مرجع ACTIN، (C) نمودار ذوب ژن مرجع 18S rRNA، (D) نمودار ذوب ژن مرجع β-Tubulin، (E) نمودار ذوب ژن مرجع HSP و (F) نمودار

ذوب ژن مرجع GAPDH.

نتایج بررسی بیان ژن‌های مرجع بر اساس مقادیر Cp نشان داد که ژن‌های مرجع مورد بررسی دارای سطوح بیان مختلفی در گیاه ریحان هستند. میزان بیان تفاوت معنی‌داری بین ارقام سبز و قرمز نداشت. بیشترین و کمترین میزان میانگین Cp به ترتیب برای ژن‌های β-Tubulin و 18S rRNA محاسبه شد (شکل ۲).

نتایج بررسی مقادیر Cp با استفاده از نرم‌افزار BestKeeper نشان داد که تنها ژن‌های مرجع HSP و ACTIN دارای انحراف معیار پایین‌تر از یک در بین نمونه‌های مورد بررسی بودند و به‌عنوان ژن‌های با پایداری بیان بالا شناسایی شدند (جدول۳). از طرفی، ژن‌های 18S rRNA، EF-1α، GAPDH و β-Tubulin دارای انحراف معیار بالاتر از یک در بین نمونه‌های مورد بررسی بودند و به‌عنوان ژن‌های با پایداری بیان پایین شناسایی شدند (جدول ۳). همچنین، ژن‌های مرجع HSP و ACTIN نسبت به ژن‌های 18S rRNA، EF-1α، GAPDH و β-Tubulin کمترین میزان ضریب تغییرات Cp را نشان دادند (جدول ۳). براساس نتایج نرم‌افزار BestKeeper، ژن‌های مرجع HSP و ACTIN به‌عنوان ژن‌های مرجع پایدار برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از PCR در زمان واقعی در بافت‌های برگی ارقام سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین تحت تنش‌های غیرزیستی خشکی، شوری، سرما، گرما و تاریکی مشخص شدند.



شکل ۲. میانگین مقادیر Cp برای ژن‌های مرجع مورد بررسی در دو ارقام سبز و قرمز ریحان شیرین. خطوط روی ستون‌ها نشان دهنده خطای استاندارد است.

جدول ۳. آماره‌های توصیفی محاسبه‌شده برای ژن‌های مرجع توسط نرم‌افزار Bestkeeper

فاکتور	18S rRNA	ACTIN	EF-1α	GAPDH	HSP	β-Tubulin
تعداد نمونه	۳۶	۳۶	۳۶	۳۶	۳۶	۳۶
میانگین هندسی Cp	۱۴/۴۱	۱۹/۸۸	۲۲/۷۵	۲۴/۳۱	۱۹/۹۵	۲۵/۹۰
میانگین حسابی Cp	۱۴/۶۷	۱۹/۹۲	۲۲/۹۲	۲۴/۷۲	۱۹/۹۷	۲۶
حداقل Cp	۸	۱۷	۱۲	۱۶	۱۸	۲۱/۵۰
حداکثر Cp	۲۲	۲۲	۳۱	۳۲	۲۳	۲۸/۵۰
انحراف معیار (±Cp)	۲/۰۴	۰/۹۹	۱/۳۳	۳/۹۰	۰/۷۱	۱/۹۷
ضریب تغییرات (%Cp)	۱۳/۸۹	۴/۹۷	۵/۸۲	۱۵/۷۷	۳/۵۳	۷/۵۹
min [x-fold]	−۸۴/۹۹	−۷/۳۵	−۱۷۲۲/۲۴	−۳۱۷/۴۳	−۳/۸۵	−۲۱/۱۶
max [x-fold]	۱۹۲/۷۸	۴/۳۵	۳۰۴/۴۲	۲۰۶/۴۵	۸/۳۱	۶/۰۵
std dev [± x-fold]	۴/۱۰	۱/۹۹	۲/۵۲	۱۴/۹۱	۱/۶۳	۳/۹۲

بر اساس نتایج رتبه‌بندی براساس نرم‌افزار BestKeeper، ژن‌های HSP و ACTIN به ترتیب رتبه‌های اول و دوم را به‌عنوان ژن‌های مرجع در بافت‌های برگی ارقام سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین تحت تنش‌های غیرزیستی خشکی، شوری، سرما، گرما و تاریکی کسب کردند و سایر ژن‌های مرجع EF-1α، β-Tubulin، 18S rRNA و GAPDH به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (جدول ۴).

جدول ۴. نتایج رتبه‌بندی ژن‌های مرجع مورد بررسی در نرم‌افزارهای BestKeeper و NormFinder

ژن‌های مرجع	نرم‌افزار BestKeeper		نرم‌افزارهای NormFinder		نرم‌افزارهای BestKeeper و NormFinder
	انحراف معیار	رتبه	ارزش پایداری	رتبه	ترتیب نهایی پایداری ژن‌های مرجع
β-Tubulin	۱/۹۷	۴	۰/۰۳۴	۱	ACTIN
EF-1α	۱/۳۳	۳	۰/۱	۴	HSP
HSP	۰/۷۱	۱	۰/۰۷۱	۳	β-Tubulin
ACTIN	۰/۹۹	۲	۰/۰۶۲	۲	EF-1α
18S rRNA	۲/۰۴	۵	۰/۱۷۳	۶	18S rRNA
GAPDH	۳/۹۰	۶	۰/۱۴۱	۵	GAPDH

نرم‌افزار NormFinder تغییرات کلی ژن‌های مرجع را برآورد کرده و براساس آن، ارزش پایداری (SV) را محاسبه می‌کند. ژن‌های مرجع با کمترین ارزش پایداری به عنوان مناسب‌ترین آنها در نظر گرفته می‌شود (Andersen *et al.*, 2004). میزان پایداری ژن‌های مرجع در دو رقم سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین با استفاده از نرم‌افزار NormFinder مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی با نرم‌افزار NormFinder نشان داد که ژن مرجع β-Tubulin با کمترین میزان ارزش پایداری، دارای بیشترین میزان پایداری بیان بین ژن‌های مورد بررسی است (جدول ۴). ژن‌های مرجع ACTIN، HSP، EF-1α، GAPDH و 18S rRNA به ترتیب بر اساس میزان ارزش پایداری خود، پس از ژن β-Tubulin در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (جدول ۴). براساس نتایج نرم‌افزار NormFinder، ژن β-Tubulin به‌عنوان ژن مرجع پایدار برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از PCR در زمان واقعی در بافت‌های برگی ارقام سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین تحت تنش‌های غیرزیستی خشکی، شوری، سرما، گرما و تاریکی مشخص شد.

با توجه به اینکه دو نرم‌افزار BestKeeper و NormFinder از الگوریتم‌های آماری مختلفی برای ارزیابی میزان پایداری بیان ژن‌های مرجع استفاده می‌کنند، وجود تفاوت در رتبه‌بندی ژن‌ها امری بدیهی به نظر می‌رسد. این امر در مطالعات دیگری نیز مشاهده شد، به‌طور مثال در مطالعه Cao و همکاران (۲۰۱۶) نیز گزارش شد که دلیل اختلاف در رتبه‌بندی ژن‌های مرجع، استفاده از الگوریتم‌های مختلف آماری است. پس از بررسی میزان پایداری ژن‌های مرجع با استفاده از دو نرم‌افزار BestKeeper و NormFinder، رتبه‌بندی نهایی میزان پایداری ژن‌های مرجع بر اساس رتبه‌بندی تجمعی صورت گرفت. نتایج رتبه‌بندی نهایی نشان داد که ژن‌های ACTIN و HSP به‌ترتیب پایدارترین ژن‌های مرجع برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از PCR در زمان واقعی در بافت‌های برگی ارقام سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین تحت تنش‌های غیرزیستی خشکی، شوری، سرما، گرما و تاریکی هستند (جدول ۴). نتایج رتبه‌بندی نهایی همچنین نشان داد که ژن‌های مرجع 18S rRNA و GAPDH از پایداری مناسبی برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از PCR در زمان واقعی در بافت‌های برگی ارقام سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین تحت تنش‌های غیرزیستی خشکی، شوری، سرما، گرما و تاریکی برخوردار نیستند (جدول ۴).

امروزه روش PCR در زمان واقعی به یک روش استاندارد برای بررسی روند بیان ژن‌های مختلف تبدیل شده است که دارای کاربردهای فراوانی در زمینه‌هایی مانند تأیید نتایج توالی‌یابی ترانسکریپتوم با استفاده از RNA-seq، ریزآرایه کل ژنوم و همچنین تشخیص مولکولی است. از زمان ابداع این روش تاکنون تعداد زیادی از ژن‌های مرجع از جمله 18S rRNA، GAPDH، ACTIN، HSP، EF-1α، UBQ، UBC، β-Tubulin و غیره معرفی شده و برای نرمال‌سازی بیان ژن‌ها در شرایط مختلف مانند تنش‌های محیطی زیستی و غیرزیستی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. سطح بیان یک ژن مرجع مناسب باید در تمامی شرایط آزمایش ثابت باشد، با این‌حال، تاکنون هیچ ژن مرجعی شناسایی نشده است که در تمامی شرایط دارای بیان ثابتی باشد. تحقیقات بی‌شماری نشان داده‌اند که همانند سایر ژن‌های یک گیاه، میزان بیان ژن‌های مرجع نیز ممکن است در مراحل نموی و یا تحت شرایط تنش‌های محیطی تغییرات قابل توجهی پیدا کند (Joseph *et al.*, 2018). Tian و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که ژن مرجع GAPDH گیاه هویج در شرایط تنش‌های غیرزیستی و تیمار محرک‌های هورمونی پایداری مناسبی در برگ‌های این گیاه نشان نمی‌دهد. در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۱۶ مشخص شد که ژن‌های مرجع 18S rRNA و TUBULIN تحت شرایط تنش‌های غیرزیستی مختلف ناپایدار بوده و بیان آن‌ها تغییرات قابل توجهی را نشان می‌دهد (Ma *et al.*, 2016). Reddy و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که بیان ژن مرجع EF-1α گیاه نخود به طور قابل توجهی تحت تأثیر تنش‌های غیر زیستی قرار گرفته و ناپایدار است. در پژوهش Nicot و همکاران (۲۰۰۵) مشخص شد که ژن‌های مرجع 18S rRNA، ACTIN و β-Tubulin گیاه سیب‌زمینی از پایداری بیان مناسبی تحت شرایط تنش‌های غیرزیستی برخوردار نیستند و بیان آن‌ها به طور معنی‌داری تحت تأثیر شرایط تنش قرار می‌گیرد. چنین بیان ناپایداری برای ژن‌های مرجع در گیاهان تحت تنش‌های زیستی مختلف نیز مشاهده شده است (Joseph *et al.*, 2018; Nicot *et al.*, 2005; Scholtz and Visser, 2013; Li *et al.*, 2014). در مواردی که نرم‌افزاهای تعیین پایداری نتایج رتبه‌بندی متفاوتی را برای ژن‌های مرجع مورد بررسی نشان می‌دهند، می‌توان از دو ژن مرجع که بهترین رتبه را از لحاظ میزان پایداری کسب کرده‌اند، استفاده کرد و یا داده‌های بیان ژن هدف را با استفاده از میانگین هندسی ژن‌های مرجع بهینه‌سازی کرد (Vandesompele *et al.*, 2002). در پژوهشی مشخص شد که اغلب مقالات بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از PCR در زمان واقعی، تنها با یک ژن مرجع مورد نرمال‌سازی قرار گرفته‌اند و هیچ‌گونه اعتبارسنجی برای انتخاب ژن‌های مرجع در آن‌ها صورت نگرفته است(Kozera and Rapacz, 2013; Chervoneva *et al.*, 2010; Gutierrez *et al.*, 2008). این امر مشخص می‌کند که با وجود دقت بالای روش PCR در زمان واقعی برای بررسی بیان ژن‌ها، کاربرد ژن‌های مرجع با میزان پایداری کم، باعث ایجاد خطاهای بزرگی در نرمال‌سازی و بررسی بیان ژن‌های مورد بررسی خواهد شد. نتایج این تحقیقات همچنین این موضوع را مشخص می‌کند که انتخاب ژن مرجع مناسب برای مطالعات بیانی با روش PCR در زمان واقعی بر اساس مرور منابع کار دقیقی نبوده و میزان پایداری این ژن‌های مرجع بایستی قبل از استفاده مورد ارزیابی قرار گیرد (Kozera and Rapacz, 2013; Chervoneva *et al.*, 2010; Gutierrez *et al.*, 2008; Nicot *et al.*, 2005).

در این پژوهش، میزان پایداری شش ژن مرجع

پرکاربرد EF-1α، 18S rRNA، ACTIN، β-Tubulin، HSP و GAPDH در کولیتوارهای سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین تحت شرایط تنش‌های غیرزیستی خشکی، شوری، سرما، گرما و تاریکی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس رتبه‌بندی تجمعی نتایج آنالیز میزان پایداری بیان توسط نرم‌افزارهای BestKeeper و NormFinder، ژن مرجع ACTIN به‌عنوان بهترین و پایدارترین ژن مرجع برای نرمال‌سازی بیان ژن‌های مورد مطالعه توسط روش PCR در زمان واقعی در کولیتوارهای سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین شناخته شد. این ژن مرجع توسط هر دو نرم‌افزار BestKeeper و NormFinder رتبه یکسانی را دریافت کرد و با توجه به یکسان بودن نتایج در هر دو نرم‌افزار به‌عنوان پایدارترین ژن مرجع انتخاب شد. نتایج پژوهش حاضر با تنها پژوهش بررسی پایداری ژن‌های مرجع در گیاه ریحان که در آن دو ژن مرجع ACTIN و 18S rRNA به طور همزمان برای نرمال‌سازی بیان ژن‌های بیوسنتزی مونو و سزکوئی‌ترپن‌های گیاه ریحان شیرین تحت تنش سرما استفاده شده بودند یکسان بود و در آن ژن مرجع ACTIN از پایداری نسبتاً مناسبی در تیمارهای مختلف سرما برخوردار بود و در مقابل ژن 18S rRNA پایداری بیان مناسبی را نشان نداد (Senji and Mandoulakani, 2018). پژوهش ما در مقیاسی بالاتر و تحت تیمار پنج تنش غیرزیستی خشکی، شوری، سرما، گرما و تاریکی، پایداری ژن مرجع ACTIN را به اثبات رساند. نتایج پژوهش حاضر در کنار سایر پژوهش‌ها به وضوح نشان داد که قبل از هر گونه اقدام برای مطالعه بیان ژن و تجزیه و تحلیل داده‌های روش PCR در زمان واقعی لازم است پایداری بیان ژن‌های مرجع در موجود مورد مطالعه به دقت مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج این پژوهش همچنین نشان داد که از ژن مرجع ACTIN می‌توان برای نرمال‌سازی بیان ژن‌های مورد مطالعه توسط روش PCR در زمان واقعی در کولیتوارهای سبز و قرمز گیاه ریحان شیرین استفاده کرد و نتایج قابل اعتمادی را به دست آورد.

REFERENCES

Ahmed AF, Attia FA, Liu Z, Li C, Wei J, Kang W (2019) Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. Food Science and Human Wellness. 8 (3): 299-305.

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 research. 64 (15): 5245-5250.

Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology. 25 (2): 169-193.

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. PeerJ. 4: e1697.

Chervoneva I, Li Y, Schulz S, Croker S, Wilson C, Waldman SA, Hyslop T (2010) Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. BMC bioinformatics.11(1): 253.

Delfin JC, Watanabe M, Tohge T (2019) Understanding the function and regulation of plant secondary metabolism through metabolomics approaches. Theoretical and Experimental Plant Physiology. 31 (1): 127-138.

Dhama K, Sharun K, Gugjoo MB, Tiwari R, Alagawany M, Iqbal Yatoo M,

Thakur P, Iqbal HM, Chaicumpa W, Michalak I (2021) A comprehensive review on chemical profile and pharmacological activities of Ocimum basilicum. Food Reviews International. 1-29.

Ebrahimi A, Rashidi Monfared S, moradi sarabshelli A, heidari P (2018) Validation of some of Housekeeping Genes in *Aeluropus littoralis* under Salinity Stress. Journal of Crop Breeding. 10(25): 110-117. (In Persian).

Fan C, Ma J, Guo Q, Li X, Wang H, Lu M (2013) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*). PloS one. 8 (2): e56573.

Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögreen B, Linz L, Kubista M (2017) Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). Biomolecular detection and quantification. 12: 1-6.

Gachon C, Mingam A, Charrier B (2004) Real-time PCR: what relevance to plant studies? Journal of experimental botany. 55 (402): 1445-1454.

Guo J, Huang Z, Sun J, Cui X, Liu Y (2021) Research Progress and Future Development Trends in Medicinal Plant Transcriptomics. Frontiers in plant science. 12.

Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, Bellini C, Van Wuytswinkel O (2008) Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. The Plant Cell. 20 (7): 1734-1735.

Jaiswal PS, Kaur N, Randhawa GS (2019) Identification of Reference Genes for qRT-PCR Gene Expression Studies during Seed Development and under Abiotic Stresses in Cyamopsis tetragonoloba. Crop Science. 59(1): 252-265.

Joseph JT, Poolakkalody NJ, Shah JM (2018) Plant reference genes for development and stress response studies. Journal of biosciences. 43 (1): 173-187.

Kiarash JG, Wilde HD, Amirmahani F, Moemeni MM, Zaboli M, Nazari M, Moosavi SS, Jamalvandi M (2018) Selection and validation of reference genes for normalization of qRT-PCR gene expression in wheat (*Triticum durum* L.) under drought and salt stresses. Journal of Genetics. 97(5): 1433-1444.

Kozera B, Rapacz M (2013) Reference genes in real-time PCR. Journal of applied genetics. 54 (4): 391-406.

Le DT, Aldrich DL, Valliyodan B, Watanabe Y, Van Ha C, Nishiyama R, Guttikonda SK, Quach TN, Gutierrez-Gonzalez JJ, Tran L-SP (2012) Evaluation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in soybean tissues under various abiotic stress conditions. PloS one. 7 (9): e46487.

Li Y, Chen W, Wang Q, Wang N, Wu Y (2014) Assessment of reference genes for quantitative real-time PCR gene expression normalization in periwinkle during Wheat Blue Dwarf phytoplasma infection. Australasian Plant Pathology. 43 (4): 477-485.

Liu Q, Qi X, Yan H, Huang L, Nie G, Zhang X (2018) Reference gene selection for quantitative real-time reverse-transcriptase PCR in annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) subjected to various abiotic stresses. Molecules. 23 (1): 172.

Ma Q, Hao S, Chen X, Li X (2016) Validation of reliability for reference genes under various abiotic stresses in tea plant. Russian Journal of Plant Physiology. 63 (3): 423-432.

Marum L, Miguel A, Ricardo CP, Miguel C (2012) Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in Quercus suber. PloS one. 7 (4): e35113.

Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. Journal of experimental botany. 56 (421): 2907-2914.

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. Biotechnology letters. 26 (6): 509-515.

Pu Q, Li Z, Nie G, Zhou J, Liu L, Peng Y (2020) Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR in white clover (*Trifolium repens* L.) involved in five abiotic stresses. Plants. 9 (8): 996.

Rai A, Yamazaki M, Saito K (2019) A new era in plant functional genomics. Current Opinion in Systems Biology. 15: 58-67.

Reddy DS, Bhatnagar-Mathur P, Reddy PS, Sri Cindhuri K, Sivaji Ganesh A, Sharma KK (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): e0148451.

Rezaie R, Mandoulakani BA, Fattahi M (2020) Cold stress changes antioxidant defense system, phenylpropanoid contents and expression of genes involved in their biosynthesis in Ocimum basilicum L. Scientific reports. 10 (1): 1-10.

Scholtz JJ, Visser B (2013) Reference gene selection for qPCR gene expression analysis of rust-infected wheat. Physiological and molecular plant pathology. 81: 22-25.

Senji BM, Mandoulakani BA (2018) The impact of cold stress on genes expression pattern of mono-and sesquiterpene biosynthesis and their contents in *Ocimum basilicum* L. Phytochemistry. 156: 250-256.

Shahrajabian MH, Sun W, Cheng Q (2020) Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): a review. International Journal of Food Properties. 23 (1): 1961-1970.

Tian C, Jiang Q, Wang F, Wang G-L, Xu Z-S, Xiong A-S (2015) Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves. PLoS One. 10 (2): e0117569.

Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J, Zhang Z (2009) Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. BMC molecular biology. 10 (1): 71.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome biology. 3 (7): research0034. 0031.

Wang Y, Dai M, Cai D, Shi Z (2019) Screening for quantitative real-time PCR reference genes with high stable expression using the mRNA-sequencing data for pear. Tree Genetics & Genomes. 15 (4): 54.

Zhang Y, Li D, Sun B (2015) Do housekeeping genes exist? PLoS One. 10 (5).