مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۳۰-۱۲۳

ارزیابی سه ژن مرجع جهت نرمال سازی داده های Real-time PCR در ریشه گندم تحت تنش شوری

Evaluation of three reference genes for Real-time PCR normalization in wheat root under salt stress

فاطمه ملکی[۱]، رضا فتوت[۲*]، محمدرضا عظیمی[۲]، فرید شکاری[۲] و زهرا السادات شبر[۳]

Fatemeh Maleki[1], Reza Fotovat[2*], Mohamad Reza Azimi[2], Farid Shekari[2] and Zahra Sadat Shobbar[3]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات،

۲- عضو هیئت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران.

۳- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج.

1. M.Sc, 2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan,. Iran.
3. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), karaj, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: r_fotovat@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۴ - تاریخ پذیرش:۹۵/۶/۲۶)

چکیده

پژوهش‌های بیان ژن با استفاده از Real-time PCR ابزار قدرتمندی برای تجزیه و تحلیل سازوکارهای مقاومت به تنش‌های غیر زیستی در گیاهان بشمار می‌رود. یکی از مراحل مهم استفاده از این روش انتخاب و اعتبارسنجی ژن‌های مرجع بمنظور نرمال کردن بیان ژن‌های هدف تحت شرایط مختلف تنش می‌باشد. بمنظور انتخاب ژن مرجع مناسب در پژوهش‌های ریشه گندم تحت تنش شوری، پایداری بیان سه ژن معروف *GAPD*، *Actin* و*Ta.22845* با استفاده از نرم‌افزارهای NormFinder و BestKeeper و مقایسه مقادیر ΔCT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ژن *Actin* مناسب‌ترین ژن مرجع برای نرمال سازی بیان ژن‌های ریشه گندم تحت تنش شوری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

گندم،
تنش شوری،
ژن‌های خانه‌دار،
ژن کنترل داخلی،
بیان ژن

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.1.8]

مقدمه

بمنظور تأمین غذای انسان در دو دهه آینده افزایش تولیدی بین ۷۰ الی ۱۱۰درصد در محصولات کشاورزی لازم است (Tilman *et al.*, 2011). در کنار روش‌های به‌زراعی، اصلاح برای مقاومت به تنش‌های غیر زیستی از مهمترین راه‌های افزایش عملکرد بشمار می‌رود (Fita *et al.*, 2015). رشد و تولید محصول در گندم نیز همانند سایر گیاهان تحت تأثیر تنش‌های غیر زیستی بخصوص شوری و خشکی می‌باشد (Munns *et al.*, 2012). متأسفانه با وجود تمامی تلاش‌های پژوهشگران موفقیت چندانی در زمینه افزایش عملکرد گندم تحت تنش‌های غیر زیستی حاصل نشده است که ناشی از کمی بودن این صفت و وجود اثر متقابل ژنوتیپ در محیط است (Araus *et al.*, 2002).

تغییر در بیان ژن‌ها از مهمترین اتفاقاتی است که در سلول های گیاهی تحت تنش روی می‌دهد و منجر به پاسخ‌های بیوشیمیائی و فیزیولوژیکی در برابر تنش می‌شود. در سال‌های گذشته بررسی بیان و نحوه تنظیم ژن‌ها بعنوان یکی از ابزارهای مهم در جهت اصلاح برای مقاومت به تنش در گیاهان بکار رفته است (Yousfi *et al.*, 2016). روش‌های مختلفی به‌منظور بررسی بیان ژن وجود دارد با این حال ابداع Real-time PCR انقلابی را در حوزه بررسی بیان ژن در موجودات زنده بوجود آورد. مهمترین مزیت این روش اختصاصی بودن و حساسیت بالای آن است (Pabinger *et al.*, 2014). در روش کمیت سنجی نسبی Real-timePCR کاهش یا افزایش بیان ژن، نسبت به ژن مرجع که به‌طور معمول یک ژن خانه‌دار (housekeeping gene) است مورد بررسی قرار می‌گیرد و لزومی به دانستن تعداد کپی‌های دقیق ژن در نمونه‌ها نیست (Brunner *et al.*, 2004).

تاکنون ژن‌های خانه‌دار زیادی مثل *ACT*، *GAPDH*، *18SrRNA*، *25SrRNA*، *UBQ*، *UBC*، *EF1A* و *TUB* معرفی شده است که در بررسی بیان ژن‌ها در شرایط گوناگون از جمله در تنش‌های زیستی و غیر زیستی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Sinha *et al.*, 2015). ژن مرجعی که برای نرمال کردن نتایج Real-time PCR استفاده می‌شود بایستی دارای بیان پایدار در سلول‌های بافت‌های مختلف و تحت شرایط متفاوت آزمایشگاهی باشد. بنابراین موفقیت در بررسی بیان ژن، به انتخاب ژن‌های کنترل داخلی مناسب وابسته است.

پژوهش‌ها نشان داده است که سطوح رونوشت ژن‌های خانه‌دار نیز به طور قابل ملاحظه‌ای تحت برخی شرایط مختلف آزمایشی مانند تنش‌های غیرزیستی یا حتی مراحل مختلف نموی گیاه تغییر می‌کند (Paolacci *et al.*, 2009). اثر تنش‌های مختلف غیرزیستی در عدم پایداری ژن‌های خانه‌دار *TUBULIN1* و *18S rRNA* در چای (Ma *et al.*, 2016)، *GAPDH* در هویج (Tian *et al.*, 2015)، *ELF1a* در نخود (Reddy *et al.*, 2016)، *b-tubulin*، *18S rRNA* و *Actin* درسیب زمینی (Nicot *et al.*, 2005) نشان داده شده است. بررسی منابع نشان می‌دهد که بیان برخی ژن-های خانه‌دار در گندم نیز در مرحله پرشدن دانه (Wu *et al.*, 2015)، بیماری (Li *et al.*, 2014; Scholtz and Visser, 2013) و تنش دمائی در مراحل نمو گندم (Paolacci *et al.*, 2009) تغییر می‌کند.

در این پژوهش پایداری بیان دو ژن خانه‌دار معروف *GAPDH* ، *Actin* و نیز ژن جدید *Ta.22845* (Paolacci *et al.*, 2009) در ریشه گیاه گندم تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. اکتین (Actin) پروتئینی محافظت شده با فراوانی بالا در سلولهای یوکاریوتی است. پلیمریزه شدن و دِپلیمریزه شدن رشته‌های اکتینی فرآیندی بسیار تخصصی، قابل تنظیم، فضائی و آنی بوده و این توانایی را به سلول‌ها می‌دهد که در مقابل محرک‌ها و یا پیام‌های خارجی سریع تغییر شکل داده و ساختار اسکلت سلولی خود را تغییر دهند (Huang *et al.*, 2012). تارهای اکتینی در سلولهای جانوری بیشتر به منظور حرکت و تغییر شکل سلول‌ها به کار می‌رود در حالی که در سلول¬های گیاهی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.1.8]

این تارها نقش مهمی را در جریانات سیتوپلاسمی تقسیم، توسعه و نمو سلول به عهده دارد (Tang *et al.*, 2015). گلیسر آلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز (GAPDH) آنزیم کلیدی در چرخه گلیکولیز بوده و کار آن تبدیل گلیسر آلدئید ۳ فسفات (G3P) به ۳،۱ بی‌فسفات گلیسرات می‌باشد (Zeng *et al.*, 2016). ژن *Ta.22845* رمز کننده زیر واحد پروتئوزومی ۲۶ اس می‌باشد. پروتئوزوم ۲۶ اس یک مجموعه پیچیده چند زیر واحدی است که بعنوان مهمترین پروتئاز غیر لیزوزیمی در سلولهای یوکاریوتی شناخته می‌شود و نقش مهمی در تجزیه پروتئین‌ها دارد (Ferrell *et al.*, 2000). نظر به فعالیت‌های حیاتی این سه ژن انتظار بر این است که بیان پایداری در سلولهای گیاهی داشته باشند

مواد و روش‌ها

بذر گندم رقم بم (متحمل به شوری) از بخش غلات (موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر) تهیه شد. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار زیستی (و دو تکرار تکنیکی در بخش ملکولی) در گلخانه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه زنجان اجرا شد. تنش شوری دو سطح شامل مقادیر ۰ و ۱/۵ گرم کلریدسدیم در کیلوگرم خاک (با هدایت الکتریکی به ترتیب برابر با ۲/۳ و ۱۰ دسی‌زیمنس) اعمال شد. بافت خاک شامل نسبت ۱:۲ از خاک و ماسه بود. آبیاری با آب معمولی، به صورت وزنی و با توجه به ظرفیت زراعی خاک انجام شد. پس از سبزکردن، تغذیه‌ی گیاهان با کود کامل، به صورت محلول ۰/۲ درصد در آب آبیاری، با فواصل زمانی یک روز انجام گرفت. ریشه‌ها ۲۵ روز پس از کاشت، از گلدان خارج و شسته شدند. پس از جدا کردن بخش هوایی، ریشه‌ی گیاه به نیتروژن مایع منتقل شد.

استخراج RNA کل از بافت ریشه با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناکلون، ایران) و سنجش کمیت RNA توسط دستگاه Spectrophotometer (مدل NANODROP 2000 ساخت شرکت Thermo SCIENTIFIC) و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام گرفت. به منظور از بین بردن آلودگی DNA، از آنزیم DNaseI، بافر و محلول EDTA (Thermo USA, SCIENTFIC) طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد.

ساخت cDNA طی واکنش رونویسی معکوس با کیت 2-steps RT-PCR (Vivantis, Malaysia) انجام شد. جهت تامین دماهای ذکر شده در راهنمای کیت، از دستگاه ترموسایکلر iCycler (مدل ۸۸۳۱-۱۷۰ ساخت شرکت BIORAD) استفاده شد.

توالی ژن‌های مورد نظر از سایت NCBI اخذ و آغازگرهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار OLIGO طراحی شدند (جدول۱). آغازگرهای ژن‌های خانه‌دار به صورت پودر خشک از شرکت تکاپوزیست خریداری شد. با افزودن مقدار آب توصیه شده، غلظت آغازگرها به ۱۰۰ پیکومول رسید، سپس با استفاده از ۱۰ میکرولیتر از آن، محلول کاری ۱۰ پیکومول با حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه شد.

به منظور بررسی پایداری بیان ژن‌های خانه‌دار، داده‌های به دست آمده از Real-time PCR با استفاده از نرم‌افزارهای NormFinder و BestKeeper تجزیه شدند. به منظور بررسی پایداری بیان توسط نرم‌افزار Normfinder ابتدا بایستی داده‌های حاصل از میزان بیان یا به عبارتی Ctهای مربوط به هر ژن مرجع (cycle threshold) با استفاده از رابطه‌ی ΔCt و فرمول $2^{-\Delta Ct}$ به کمیت‌های نسبی تبدیل شوند (Zhu *et al.*, 2013). در نرم‌افزار BestKeeper از مقادیر Ct مربوط به هر ژن استفاده می‌شود و انحراف استاندارد (SD) و ضریب تغییرات (CV) محاسبه می‌شود (Pfaffl *et al.*, 2004).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.1.8]

جدول۱- مشخصات آغازگرهای ژن‌های مرجع مورد استفاده در Real-time PCR

Table 1. Details of reference genes primers used for Real-time PCR analysis

Tm (°C)	Primer sequence		Gene description	Accession number	Gene symbol
59.4	5'-GCTGGCTCGTTCAACTGATG	Forward	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	HG670306.1	*Ta.22845*
60.3	5'-GGACCAAGCGTTCTGATTACTC	Reverse			
60.3	5'-GTGTACCCTCAGAGGAATAAGG	Forward	Actin	AB181991.1	*Act*
60.3	5'-GTACCACACAATGTCGCTTAGG	Reverse			
59.8	5'-CTAACTGCCTTGCTCCTCTTG	Forward	Glyseraldehyd-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)	HG670306.1	*GAPDH*
58.4	5'-CTTGGAATGATGTTGAAGCTGG	Reverse			

نتایج

منحنی‌های ذوب نشان دهنده اختصاصی بودن تکثیر ژن-های مورد بررسی بود (شکل۱). عدم وجود پیک اضافی حاکی از نبود پرایمر دایمر و نیز عدم وجود تکثیر غیر اختصاصی است و دلیلی بر طراحی صحیح آغازگرهای مورد استفاده نیز می‌باشد. میزان بیان سه ژن مورد بررسی در نمونه‌ها متفاوت بود و دامنه Ct های محاسبه شده از ۲۰/۰۸ تا ۴۰/۰۴ متغیر بود (شکل۲). ژن *Ta.22845* بیشترین تغییرات و ژن *Actin* کمترین تغییرات را در تمامی نمونه‌ها نشان دادند.

نتایج تجزیه با نرم‌افزار BestKeeper

نرم‌افزار BestKeeper انحراف استاندارد (SD) و ضریب تغییرات (CV) را بر مبنای مقادیر Ct برای هر ژن مرجع تعیین می‌کند (Pfaffl et al., 2004). ژن‌های دارای SD بزرگتر از یک، قابل قبول نیستند (Migocka and Papierniak, 2010). در این روش ژن‌های مرجعی که کمترین انحراف استاندارد و ضریب تغییرات (CV±SD) را نشان دهند بیان پایدارتری دارند (Chang et al., 2012). این نرم‌افزار شاخص BestKeeper را بر اساس میانگین هندسی ژن‌های مرجع، محاسبه و پایداری ژن‌ها را بر مبنای ضریب همبستگی با شاخص BestKeeper تعیین می‌کند (Pfaffl et al., 2004). بر اساس نتایج تجزیه با نرم‌افزار BestKeeper بیشترین میزان تغییرات مربوط به *Ta.22845* و کمترین میزان تغییرات مربوط به *Actin* بود (جدول۲).

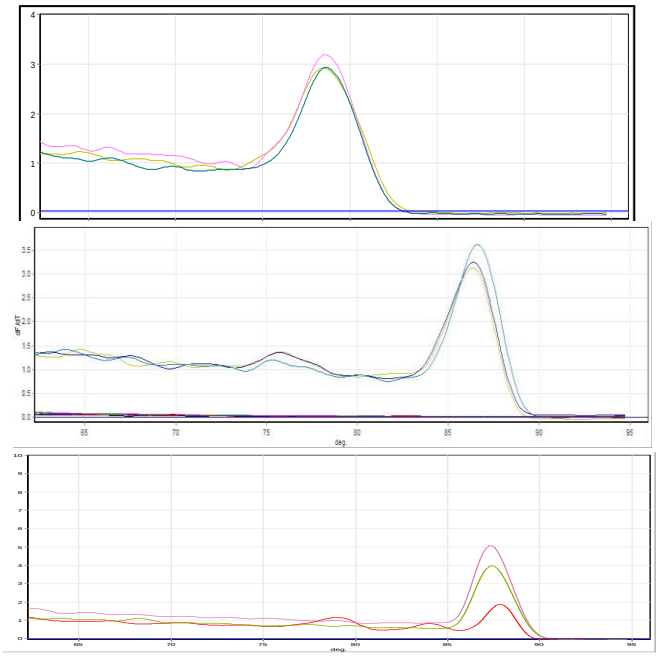
جدول۲- رتبه بندی ژن‌های خانه‌دار مورد آزمایش در ریشه گندم تحت تنش شوری با استفاده از الگوریتم BestKeeper

Table 2. Ranking of tested housekeeping genes for salt stress conditions in wheat root using BestKeeper algorithms.

CV± SD	Gene	Ranking
0.82 ± 0.32	Actin	1
16.76± 4.84	*GAPDH*	2
21.66± 6.68	*Ta.22845*	3

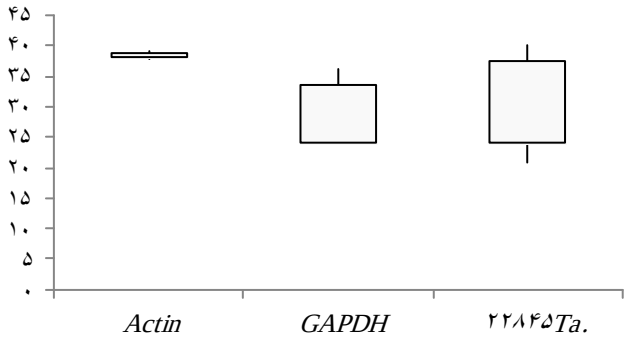
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.1.8]



شکل۱- منحنی ذوب ژن‌های کاندید

Figure 1. Melting curve for the candidate reference genes



شکل۲- مقادیر Ct ژن‌های کاندید در تمام نمونه‌های ریشه گندم

Figure 2. Ct values of candidate reference genes in all wheat root samples.

در نتایج حاصله از این نرم‌افزار فاصله پایداری *Actin* نسبت به دو ژن دیگر تفاوت فاحشی داشت. به طور کلی در نتایج بدست آمده توسط هر دو نرم‌افزار، ژن *Ta.22845* دارای بیشترین تغییرات و ناپایدارترین بیان بود. در حالی که بر اساس نتایج یک آزمایش که در ۲۴ نمونه‌ی مورد مطالعه‌ی گندم صورت گرفت این ژن در تمامی بافت‌ها و تیمار اعمال شده سرما به عنوان پایدارترین ژن معرفی شده است (Paolacci *et al.*, 2009).

نتایج تجزیه با نرم‌افزار Normfinder

نرم‌افزار NormFinder یک برنامه کاربردی نوشته شده با ویژوال بیسیک بر پایه اکسل می‌باشد که بمنظور تعیین پایدارترین ژن‌های خانه‌دار بکار می‌رود (Chang *et al.*,

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.1.8]

2012). در این نرم‌افزار واریانس بین و درون گروه‌های ژن‌های مرجع محاسبه و پایداری بیان آن‌ها توسط ارزشی به‌نام M محاسبه می‌شود. ژن‌های با ارزش M کمتر دارای پایداری بیشتر هستند. محاسبات بعمل آمده با این نرم-افزار، ژن *GAPDH* را با ارزش پایداری ۱/۰۷۷ بعنوان پایدارترین ژن معرفی کرد. ژن‌های *Actin* و *Ta.22845* نیز به ترتیب از نظر پایداری در رتبه‌های بعدی قرار داشتند (جدول۳).

جدول۳– رتبه بندی ژن‌های خانه‌دار مورد آزمایش در ریشه گندم تحت تنش شوری با استفاده از الگوریتم Normfinder

Table 3. Ranking of tested housekeeping genes for salt stress conditions in wheat root using Norm Finder algorithms

Stability value	Gene	Ranking
1.077	*GAPDH*	1
3.175	Actin	2
3.439	*Ta.22845*	3

بحث

گرچه امروزه روش‌های با کارائی بالا مانند تکنولوژی ریزآرایه (Microarray) و تکنیک‌های نسل جدید توالی یابی (NGS) با قابلیت ارزیابی هزاران ژن بطور همزمان در مطالعات بررسی بیان ژن‌های دخیل در ایجاد تحمل به تنش در گیاهان بکار می‌روند (Mwadzingeni *et al.*, 2016)، با اینحال روش Real-time PCR با وجود محدودیت در تعداد ژن مورد بررسی، بعلت تکرارپذیری، حساسیت و اختصاصی بودن، کاربرد زیادی در بررسی بیان ژن‌ها و همچنین اعتبار سنجی سایر روش‌های با کارائی بالا دارد (Reddy *et al.*, 2016). کارائی و اعتبار کاربرد روش کمیت سنجی نسبی Real-time PCR در پایداری ژن‌های خانه‌داری است که برای نرمال‌سازی نتایج بیان ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند. یک بررسی نشان داده است که در مقالات چاپ شده با کاربرد روش کمیت سنجی نسبی توسط Real-time PCR، در بیش از ۹۰درصد موارد تنها از یک ژن خانه‌دار استفاده شده است و انتخاب ژن‌های مرجع موردنظر نیز بدون اعتبارسنجی آن‌ها بوده است (Kozera and Rapacz, 2013). این موضوع نشان می‌دهد که با وجود مزیت‌های ذکر شده برای کاربرد روش کمیت سنجی نسبی در Real-time PCR، استفاده از ژن‌های خانه‌دار ناپایدار ممکن است منجر به بروز اشتباهات زیادی در اندازه‌گیری ژن‌های هدف شود (Kozera and Rapacz, 2013; Nicot *et al.*, 2005). بر اساس نتایج بدست آمده از این آزمایش دو ژن *GAPDH* و *Actin* در رده اول و دوم رتبه بندی پایداری ژن‌ها به ترتیب توسط نرم‌افزارهای NormFinder و BestKeeper قرار گرفتند. از میان این دو ژن، *Actin* را به دلیل داشتن واریانس کمتر را می‌توان بعنوان ژن مرجع مطلوب جهت نرمال سازی بیان ژن‌های هدف در مطالعات بیان نسبی با استفاده از Real-time PCR در آزمایش‌های ریشه گندم تحت تنش شوری پیشنهاد کرد. پایداری ژن‌های *GAPDH* و *Actin* تحت تنش‌های خشکی و شوری در خرما (V. Patankar *et al.*, 2016)، ریشه و برگ هویج (Tian *et al.*, 2015) و چای (Ma *et al.*, 2016) نیز نشان داده شده است و برای آزمایش‌های مربوط به بیان ژن در تنش شوری در این گیاهان توصیه می‌شود. با اینحال تنش‌های غیر زیستی سرما و شوری در سیب‌زمینی (Nicot *et al.*, 2005) وسرما در گندم (Paolacci *et al.*, 2009) موجب تغییر بیان ژن *Actin* شده است. همچنین نتایج پژوهشگران نشان داده است که بیان ژن‌های *GAPDH* و *Actin* در تنش‌های غیر زیستی در گیاه ارزن وحشی (*Setaria viridis*) تغییر می‌یابد (Martins *et al.*, 2016). میزان پایداری ژن خانه‌دار *GAPDH* حتی در مراحل مختلف نموی جو تغییر کرده است (Rapacz *et al.*, 2012). به احتمال زیاد این امر با این امکان که ژن‌های خانه‌دار در سایر فعالیت‌های سلولی نیز سهیم هستند تا حدودی قابل تفسیر باشد (Hancock *et al.*, 2005; Kamal *et al.*, 2012; Komatsu *et al.*,

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.1.8]

2014). این نتایج بخوبی نشان می‌دهد که تنها با بررسی منابع نمی‌توان ژن خانه‌دار مناسب را برای مطالعه مورد نظر انتخاب نمود و میزان پایداری آن‌ها بایستی قبل از استفاده در کمیت سنجی نسبی مورد ارزیابی قرار گیرد. در بعضی موارد که انتخاب یک ژن خانه‌دار بعلت تفاوت در نتایج رتبه‌بندی نرم‌افزارها و یا تفاوت کم در شاخص-های پایداری مشکل است می‌توان بیش از یک ژن مرجع انتخاب نموده و داده‌های بیان ژن هدف را با استفاده از از میانگین هندسی ژن‌های خانه‌دار نرمال کرد (Vandesompele *et al.*, 2002).

منابع

Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP, Royo C. 2002. Plant Breeding and Drought in C3 Cereals: What Should We Breed For? Annals of Botany 89(7):925-940.

Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH. 2004. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. BMC Plant Biology 4(14).

Chang EM, Shi SQ, Liu JF, Cheng TL, Xue L, Yang XY, Yang WJ, Lan Q, Jiang ZP. 2012. Selection of Reference Genes for Quantitative Gene Expression Studies in *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) Using Real-Time PCR. Plos One 7(3).

Ferrell K, Wilkinson CRM, Dubiel W, Gordon C. 2000. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. Trends in Biochemical Sciences 25(2):83-88.

Fita A, Rodríguez-Burruezo A, Boscaiu M, Prohens J, Vicente O. 2015. Breeding and Domesticating Crops Adapted to Drought and Salinity: A New Paradigm for Increasing Food Production. Frontiers in Plant Science 12(6):978.

Hancock JT, Henson D, Nyirenda M, Desikan R, Harrison J, Lewis M, Hughes J, Neill SJ. 2005. Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in Arabidopsis. Plant Physiology and Biochemistry 43(9):828-835.

Huang Y-C, Huang W-L, Hong C-Y, Lur H-S, Chang M-C. 2012. Comprehensive analysis of differentially expressed rice actin depolymerizing factor gene family and heterologous overexpression of *OsADF3* confers *Arabidopsis Thaliana* drought tolerance. Rice 5(1):33.

Kamal AHM, Cho K, Kim D-E, Uozumi N, Chung K-Y, Lee SY, Choi J-S, Cho S-W, Shin C-S, Woo SH. 2012. Changes in physiology and protein abundance in salt-stressed wheat chloroplasts. Molecular biology reports 39(9):9059-9074.

Komatsu S, Kamal AHM, Hossain Z. 2014. Wheat proteomics: proteome modulation and abiotic stress acclimation. Frontiers in Plant Science 5(684).

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

Li Y, Chen W, Wang Q, Wang N, Wu YF. 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.

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

Martins PK, Mafra V, de Souza WR, Ribeiro AP, Vinecky F, Basso MF, da Cunha B, Kobayashi AK, Molinari HBC. 2016. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in Setaria viridis. Scientific Reports 6(28348).

Migocka M, Papierniak A. 2010. Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. Molecular Breeding(28):343–357.

Munns R, James RA, Xu B, Athman A, Conn SJ, Jordans C, Byrt CS, Hare RA, Tyerman SD, Tester M. 2012. Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na^+ transporter gene. Nature biotechnology 30(4):360-364.

Mwadzingeni L, Shimelis H, Dube E, Laing MD, Tsilo TJ. 2016. Breeding wheat for drought tolerance: Progress and technologies. Journal of Integrative Agriculture 15(5):935-943.

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. Journa of Experimental Botany 56(421):2907–2914.

Pabinger S, Rödiger S, Kriegner A, Vierlinger K, Weinhäusel A. 2014. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. Biomolecular Detection and Quantification 1(1):23-33.

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

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.1.8]

integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters 26(6):509-515.

Rapacz M, Stepien A, Skorupa K. 2012. Internal standards for quantitative RT-PCR studies of gene expression under drought treatment in barley (*Hordeum vulgare* L.): the effects of developmental stage and leaf age. Acta Physiologiae Plantarum 34(5):1723-1733.

Reddy DS, Bhatnagar-Mathur P, Reddy PS, Cindhuri KS, Ganesh AS, 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).

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.

Sinha P, Saxena RK, Singh VK, Krishnamurthy L, Varshney RK. 2015. Selection and Validation of Housekeeping Genes as Reference for Gene Expression Studies in Pigeonpea (*Cajanus cajan*) under Heat and Salt Stress Conditions. Frontiers in Plant Science 6(1071).

Tang C, Deng L, Chang D, Chen S, Wang X, Kang Z. 2015. TaADF3, an Actin-Depolymerizing Factor, Negatively Modulates Wheat Resistance Against Puccinia striiformis. Frontiers in plant science 6(1214).

Tian C, Jiang Q, Wang F, Wang GL, Xu ZS, Xiong AS. 2015. Selection of Suitable Reference Genes for qPCR Normalization under Abiotic Stresses and Hormone Stimuli in Carrot Leaves. Plos One 10(2).

Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort BL. 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(50):20260-20264.

V. Patankar H, M. Assaha DV, Al-Yahyai R, Sunkar R, Yaish MW. 2016. Identification of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Subjected to Drought and Salinity. Plos One 11(11).

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).

Wu D, Dong J, Yao YJ, Zhao WC, Gao X. 2015. Identification and evaluation of endogenous control genes for use in quantitative RT-PCR during wheat (*Triticum aestivum* L.) grain filling. Genetics and Molecular Research 14(3):10530-10542.

Yousfi S, Márquez AJ, Betti M, Araus JL, Serret MD. 2016. Gene expression and physiological responses to salinity and water stress of contrasting durum wheat genotypes. Journal of Integrative Plant Biology 58(1):48-66.

Zeng L, Deng R, Guo Z, Yang S, Deng X. 2016. Genome-wide identification and characterization of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes family in wheat (*Triticum aestivum*). BMC Genomics 17(240).

Zhu J, Zhang L, Li W, Han S, Yang W, Qi L. 2013. Reference Gene Selection for Quantitative Real-time PCR Normalization in Caragana intermedia under Different Abiotic Stress Conditions. PLos One 8(1).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.1.8]