

# 杂交兰实时荧光定量PCR内参基因的筛选

林榕燕<sup>1,2,3</sup> 钟淮钦<sup>1,2,3</sup> 黄敏玲<sup>1,2,3\*</sup> 樊荣辉<sup>1,2,3</sup> 吴建设<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013; <sup>2</sup>福建省农业科学院花卉研究中心, 福州 350013;

<sup>3</sup>福建省特色花卉工程技术研究中心, 福州 350013)

**摘要** 为了给杂交兰的基因功能表达和调控研究提供内参基因, 本研究采取同源克隆方法和RT-PCR技术, 以杂交兰‘黄金小神童’叶片为材料, 分离杂交兰*Ch18S rRNA*、*Ch28S rRNA*、*ChACT*、*ChTUA*、*ChTUB*、*ChUBQ*、*ChEF-1α*和*ChrhoB*基因的片段, 以10个不同品种杂交兰叶片及‘黄金小神童’花器官不同部位为材料, 利用实时荧光定量PCR(Real-time quantitative PCR, qPCR)检测分析各引物的扩增效率和相对表达量, 采用geNorm、NormFinder和BestKeeper软件对各个候选内参基因的表达稳定性进行分析, 并通过研究杂交兰花器官不同部位*ChPDS*基因的表达模式来验证筛选得到的内参基因的可靠性。结果显示, 各引物扩增的片段长度分别为171 bp、148 bp、183 bp、146 bp、130 bp、147 bp、203 bp、139 bp, 扩增效率分别为1.94、2.19、1.88、1.99、2.12、2.20、2.11、1.98。综合3个软件的评价结果发现, 杂交兰不同品种叶片中最佳内参基因为*ChACT*, 不同花器官部位中最稳定内参基因为*ChACT*、*ChTUB*、*ChUBQ*和*ChEF-1α*; 而对于实验中所有样品来说, 内参基因稳定性最高的为*ChTUB*; 说明不同的实验条件下, 所需的内参基因不同。*ChPDS*基因相对表达水平分析结果证实了所筛选内参基因的可靠性, 以*ChUBQ*、*ChEF-1α*、*ChTUB*、*ChACT*及*ChUBQ*和*ChEF-1α*基因组合进行校正的*ChPDS*基因的相对表达量均为花瓣>唇瓣>蕊柱。

**关键词** 杂交兰; 实时荧光定量PCR; 内参基因; 表达稳定性

## Reference Gene Selection of Real-time Quantitative PCR in *Cymbidium* Hybrid

Lin Rongyan<sup>1,2,3</sup>, Zhong Huaqin<sup>1,2,3</sup>, Huang Minling<sup>1,2,3\*</sup>, Fan Ronghui<sup>1,2,3</sup>, Wu Jianshe<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>Crop Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

<sup>2</sup>Flower Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

<sup>3</sup>Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou 350013, China)

**Abstract** To provide reference genes for the studies of gene function expression and regulation, sequence of *Ch18S rRNA*, *Ch28S rRNA*, *ChACT*, *ChTUA*, *ChTUB*, *ChUBQ*, *ChEF-1α* and *ChrhoB* genes were cloned by RT-PCR using the leaf of *Cymbidium* Golden Elf ‘Sun-dust’ as materials, Real-time quantitative PCR (qPCR) analyses were employed to determine the primer amplification efficiency and their relative quantities for each gene in leaves of ten different *Cymbidium* hybrid cultivars, geNorm, NormFinder and BestKeeper software programs were used

收稿日期: 2017-10-13

接受日期: 2017-12-18

福建省省属公益类科研院所专项(批准号: 2016R1025-5)、福建省农业科学院科技创新团队(批准号: STIT2017-2-9)和福建省农业科学院科技创新团队建设(批准号: 2016PI-39)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0591-87573019, E-mail: huangml618@163.com

Received: October 13, 2017

Accepted: December 18, 2017

This work was supported by the Youth Open Fund of Crop Research Institute by the Public Welfare Foundation of Fujian Province (Grant No.2016R1025-5), the Technology Innovation team by Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.STIT2017-2-9) and the Development of Technology Innovation Team by Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.2016PI-39)

\*Corresponding author. Tel: +86-591-87573019, E-mail: huangml618@163.com

网络出版时间: 2018-03-09 15:25:55

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180309.1525.008.html>

to analyze the expression stability of each candidate gene and the expression pattern of *ChPDS* in different parts of the flower organs was analyzed to verify the reference genes selected in this study. The RT-PCR and qPCR results showed that the length of each candidate gene fragments were 171 bp, 148 bp, 183 bp, 146 bp, 130 bp, 147 bp, 203 bp and 139 bp, while the primer efficiencies were 1.94, 2.19, 1.88, 1.99, 2.12, 2.20, 2.11 and 1.98, respectively. The evaluation results of three software programs showed that *ChACT* was the optimal reference gene from the different cultivars, *ChACT*, *ChTUB*, *ChUBQ* and *ChEF-1 $\alpha$*  were the optimal reference genes from the different parts of the flower organs, but, for all the samples in the experiment, the most stable internal gene was *ChTUB*. The results indicated that different reference gene was required in different test conditions. Analysis results of the relative expression level for *ChPDS* confirmed the reliability of the reference genes selected, the relative expression of *ChPDS* using *ChUBQ*, *ChEF-1 $\alpha$* , *ChTUB*, *ChACT*, the combination of *ChUBQ* and *ChEF-1 $\alpha$*  for normalization was petal>labellum>gynandrium.

**Keywords** *Cymbidium* hybrid; Real-time quantitative PCR; reference gene; expression stability

杂交兰(*Cymbidium* hybrid)是兰属(*Cymbidium* Sw.)中由国兰(*Chinese Cymbidium*)和大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)杂交培育而成的一类兰花的特称<sup>[1]</sup>。杂交兰兼具国兰的植株小巧、幽香和大花蕙兰的花大、色艳等优异特性<sup>[2]</sup>, 拥有较高的观赏、经济和文化价值, 近年来深受消费者的喜爱, 已成为兰花市场中新兴的具发展潜力的兰花新种类, 市场前景广阔<sup>[3]</sup>。目前, 有关杂交兰的研究主要集中在组织培养技术<sup>[4-6]</sup>、倍性鉴定<sup>[7-8]</sup>、栽培技术<sup>[9]</sup>、花期调控<sup>[10]</sup>、分子标记技术<sup>[11-12]</sup>等方面, 在功能基因组学方面的研究还很少, 这大大限制了其分子育种的进程, 分子生物学研究势必成为杂交兰研究的一大方向。

植物基因表达是植物分子生物学的研究热点, 实时荧光定量PCR(Real-time quantitative PCR, qPCR)因其精准性和敏感性已成为目前测定植物基因表达水平最常用的方法之一<sup>[13]</sup>。在qPCR检测中, 合适内参基因的选择是其获得准确可靠的实验数据的前提<sup>[14]</sup>。目前在高等植物qPCR研究中, 较为常见的内参基因有18S核糖体RNA(*18S rRNA*)、28S核糖体RNA(*28S rRNA*)、肌动蛋白基因(actin gene, *ACT*)、 $\alpha$ 微管蛋白基因(alpha-tubulin gene, *TUA*)、 $\beta$ 微管蛋白基因(beta-tubulin gene, *TUB*)、泛素蛋白基因(ubiquitin gene, *UBQ*)等<sup>[15-17]</sup>。理想的内参基因应该在各种不同的实验条件下均能够保持稳定地表达<sup>[18]</sup>。然而, 一种内参基因不可能适用于所有的反应体系<sup>[19]</sup>。比如, 在对马尾松25个候选内参基因筛选中发现, *ACT*在这项研究的所有样品中都可以作为参考基因<sup>[20]</sup>, 然而在胡椒中, 该基因的稳定性却是最低的<sup>[21]</sup>。此

外, *RPS3*<sup>[22]</sup>、*UBC*<sup>[23]</sup>、*EF-1 $\alpha$* <sup>[24]</sup>也被证明在不同的实验条件下稳定性不同。以上研究充分地证明了不同的实验条件需要不同的内参基因。因此, 对于不同的实验体系, 为了提高qPCR的准确性, 筛选合适的内参基因是非常必要的。

本研究以杂交兰‘黄金小神童’叶片为材料, 分离*Ch18S rRNA*、*Ch28S rRNA*、*ChACT*、*ChTUA*、*ChTUB*、*ChUBQ*、*ChEF-1 $\alpha$* 和*ChrhoB*基因的片段, 利用qPCR技术检测这8个候选内参基因在10个不同品种杂交兰叶片及‘黄金小神童’花器官不同部位中的表达情况, 采用geNorm、NormFinder和Best-Keeper软件评价这8个内参基因的表达稳定性, 筛选出表达最为稳定的内参基因, 并研究杂交兰八氢番茄红素脱氢酶基因(phytoene desaturase gene, *ChPDS*)在花器官不同部位中的表达模式, 以验证所筛选到的内参基因, 为杂交兰基因的功能调控和表达研究提供参考序列。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以福建省农业科学院作物研究所花卉研究中心种质资源圃保存的杂交兰品种‘黄金小神童’(K233)、“中国龙”(K20)、“玉凤”(K31)、“华韵秋香”(K10)、“福韵丹霞”(K24)、“福韵红霞”(K26)、“樱花”(K40)、“紫妍氏”(K21)、“叶艺紫妍氏-1”(K21-1)、“叶艺紫妍氏-2”(K21-2)10个品种的叶片及‘黄金小神童’的花瓣、唇瓣及蕊柱为供试材料。以‘黄金小神童’叶片作为基因克隆的材料; 取10个不同品种杂交兰叶片及‘黄金小神童’花器官不同部位, 用于内参

基因的稳定性表达分析。样本剪取后迅速投入液氮速冻后, 存入 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 杂交兰叶片总RNA的提取和cDNA合成** 采用通用植物总RNA提取试剂盒(BioTeke)进行总RNA的提取, 基因克隆及定量表达所用的cDNA的合成均采用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒(TaKaRa), 按说明书进行具体操作步骤, 采用AP接头(5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(T)17-3')作为引物进行逆转录, 产物置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

**1.2.2 引物设计及PCR扩增** 按照同源克隆引物的设计原则, 根据NCBI数据库中报道的相关兰科植物的内参基因序列, 完成18S核糖体RNA(18S rRNA)、28S核糖体RNA(28S rRNA)、肌动蛋白基因(ACT)、 $\alpha$ 微管蛋白基因(TUA)、 $\beta$ 微管蛋白基因(TUB)、泛素蛋白基因(UBQ)、延伸因子基因(elongation factor-1 $\alpha$  gene, EF-1 $\alpha$ )和DNA指导的RNA聚合酶 $\beta$ 亚基(RNA polymerase B subunit, rpoB)8个内参基因引物的设计(表1)。以‘黄金小神童’叶片逆转录的cDNA为模板, 进行PCR扩增。PCR扩增程序为:  $94^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min;  $94^{\circ}\text{C}$ 变性45 s,  $54^{\circ}\text{C}$ 退火45 s,  $72^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 共28个循环;  $72^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min; 最后 $4^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR扩增产物通过1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测。目的片段经回收、连接、克隆和转化后, 阳性克隆子送上海铂尚生物公司进行测序。

**1.2.3 标准曲线的制作** 将10个样本cDNA进行混样, 形成1倍混合样, 再分别稀释成5倍、25倍和125倍的混合样, 将这4个样品进行qPCR检测。在ABI7500荧光定量PCR仪(美国ABI公司)上进行8个内参基因扩增, 每个样本重复3次。反应体系为20.0  $\mu\text{L}$ , 包括10.0  $\mu\text{L}$  SYBR II Premix Ex Taq™(2 $\times$ )、0.8  $\mu\text{L}$ 上游引物、0.8  $\mu\text{L}$ 下游引物、0.4  $\mu\text{L}$  ROX Reference Dye、2.0  $\mu\text{L}$ 不同品种杂交兰叶片的cDNA模板以及6.0  $\mu\text{L}$  DEPC水。按照两步法的反应程序进行qPCR扩增, 即 $95^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s后, 再运行 $95^{\circ}\text{C}$  5 s,  $60^{\circ}\text{C}$  34 s, 40个循环; 最后运行熔解曲线阶段, 即 $95^{\circ}\text{C}$  15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  1 min,  $95^{\circ}\text{C}$  30 s,  $60^{\circ}\text{C}$  15 s。扩增结束后, 进行熔解曲线、标准曲线及扩增效率分析。

**1.2.4 内参基因的qPCR扩增与数据分析** 以等量各样品的cDNA为模板, 分别进行8个内参基因qPCR扩增(条件同上), 检测各内参基因的相对表达量, 并统计Ct值。采用geNorm、NormFinder和BestKeeper软件对8种候选内参基因在杂交兰不同品种叶片及花器官不同部位的表达稳定性进行统计学分析, 从而筛选杂交兰基因表达中最合适的内参基因。

**1.2.5 内参基因稳定性的验证** 通过研究杂交兰花器官不同部位中八氢番茄红素脱氢酶基因(ChPDS)的表达模式, 验证所筛选获得的内参基因

表1 杂交兰候选内参基因qPCR引物及扩增效率

Table 1 The primers and qPCR efficiencies of candidate reference genes in *Cymbidium hybrid*

| 基因<br>Gene      | 引物序列<br>Primer sequence                 | 长度(bp)<br>Size (bp) | 相关系数<br>$R^2$ | 扩增效率<br>Amplification efficiency |
|-----------------|-----------------------------------------|---------------------|---------------|----------------------------------|
| Ch18S rRNA      | 5'-CCT GAG AGA CGG CTA CCA CAT-3'       | 171                 | 0.996         | 1.94                             |
|                 | 5'-CAC CAG ACT TGC CCT CCA-3'           |                     |               |                                  |
| Ch28S rRNA      | 5'-TCG CTC CGT GCC AAC TCA ATC-3'       | 148                 | 0.997         | 2.19                             |
|                 | 5'-AGC TTT CAC CCA CCC CTC GTT GC-3'    |                     |               |                                  |
| ChACT           | 5'-GGG TGC TTA TGT TGG TGA TG-3'        | 183                 | 0.998         | 1.88                             |
|                 | 5'-TTC AGA GGG GCT TCA GTA AGG-3'       |                     |               |                                  |
| ChTUA           | 5'-AAG CCA TTT ACG ACA TCT GCC-3'       | 146                 | 0.991         | 1.99                             |
|                 | 5'-GAA CTC AGT TAC GTC CAC G-3'         |                     |               |                                  |
| ChTUB           | 5'-GGT TCT TAT GGA TCT GGA GCC TG-3'    | 130                 | 0.999         | 2.12                             |
|                 | 5'-GTA GTG TCC CTT GGC CCA GTT-3'       |                     |               |                                  |
| ChUBQ           | 5'-TCC TCC GAC ACG ATT GAC AAC-3'       | 147                 | 0.996         | 2.20                             |
|                 | 5'-AAG CGT CGA TTC CTT CTG G-3'         |                     |               |                                  |
| ChEF-1 $\alpha$ | 5'-CGA CAA TGT GGG ATT CAA CGT G-3'     | 203                 | 0.997         | 2.11                             |
|                 | 5'-CGA ACTT GAC GGC GAT GTG-3'          |                     |               |                                  |
| ChrpoB          | 5'-AAA AGG GAC AAA TTC TAG CGG ACG-3'   | 139                 | 0.999         | 1.98                             |
|                 | 5'-GAC CAG ACG TTC GCT AAT TAG TAC T-3' |                     |               |                                  |

的稳定性。*ChPDS*基因表达上游引物为: 5'-GAT GCT GGT CAC AAA CCT ATA TTG-3', 下游引物为: 5'-GTT CCT TCC ACT GCA GAC GAT CAT T-3', 扩增产物为184 bp, 相对表达量计算方法为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

## 2 结果

### 2.1 候选内参基因片段的获得

以逆转录合成的‘黄金小神童’叶片cDNA第一链为模板, 利用8对引物进行PCR扩增。结果显示, 8对引物均能扩增出单一条带(图1), 与预期目的条带大小一致。将测序结果在GenBank数据库中进行在线Blast, 结果表明, 这8个基因片段序列与GenBank数据库中已注册的相应内参基因均有较高

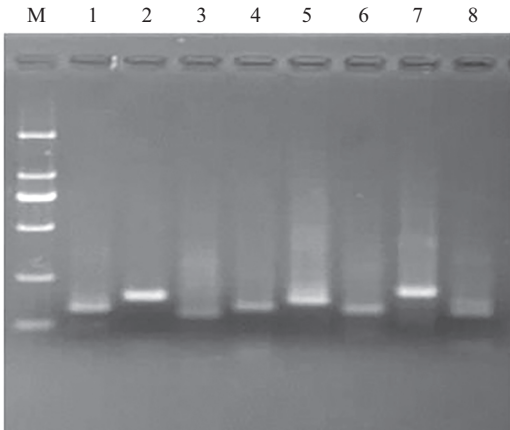
的相似性。*Ch18S rRNA*与蕙兰*18S rRNA*(*Cymbidium faberi*, JN418934.1)的相似性达99%; *Ch28S rRNA*与蕙兰*28S rRNA*(*Cymbidium faberi*, HQ263147.1)的相似性达85%; *ChACT*与蕙兰*ACT1*(*Cymbidium faberi*, JN177718.1)的相似性达100%; *ChTUA*与蕙兰*TUA1*(*Cymbidium faberi*, JN177709.1)的相似性达96%; *ChTUB*与蕙兰*TUB2*(*Cymbidium faberi*, JN177714.1)的相似性达100%; *ChUBQ*与蕙兰*UBQ1*(*Cymbidium faberi*, KC794501.1)的相似性达98%; *ChEF-1a*与蕙兰*EF-1a3*(*Cymbidium faberi*, KC794500.1)的相似性达97%; *ChrpoB*与冬凤兰*rpoB*(*Cymbidium dayanum*, HM137064.1)的相似性达99%。这说明, 本研究所获得的候选内参基因片段在品种间是高度保守的。

### 2.2 候选内参基因引物分析

对8个候选内参基因引物的熔解曲线进行分析发现, 这8对候选内参基因引物的熔解曲线均为单峰, 表明引物特异性强, 没有非特异性扩增出现, 可用于下一步分析。以10个不同品种杂交兰叶片的cDNA混合样以5倍浓度梯度稀释为模板, 进行8种内参基因标准曲线的制作。结果显示, 线性相关系数 $R^2$ 均大于0.99, 扩增效率均在1.88~2.20(表1), 达到实验要求, 可以进行后续分析。

### 2.3 候选内参基因的表达分析

对各内参基因在杂交兰不同品种叶片及花器官不同部位中的表达情况进行分析, 结果显示, 不同内参基因间的表达水平存在明显差异(图2)。*ChACT*和*ChTUA*表达量较低, 它们的Ct值平均值都大于29, 其中*ChACT*在K10品种中的表达量最低, Ct值最大的为31.859。*Ch28S rRNA*、*ChUBQ*、*ChEF-1a*、*ChTUB*



M: DL2000 marker; 1-8: 分别为*Ch18S rRNA*、*ChACT*、*ChTUB*、*ChUBQ*、*Ch28S rRNA*、*ChTUA*、*ChEF1a*和*ChrpoB*基因片段扩增产物。

M: DL2000 marker; 1-8: products of *Ch18S rRNA*, *ChACT*, *ChTUB*, *ChUBQ*, *Ch28S rRNA*, *ChTUA*, *ChEF1a* and *ChrpoB* gene fragments.

图1 杂交兰内参基因片段的克隆

Fig.1 Cloning of reference gene in *Cymbidium* hybrid

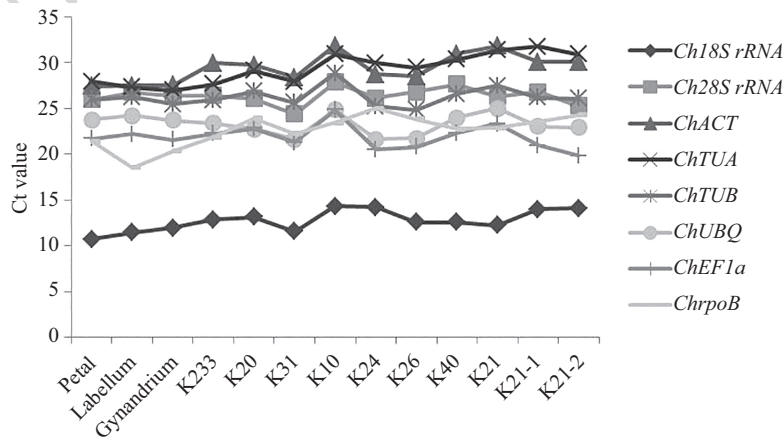


图2 内参基因在杂交兰不同品种叶片及花器官不同部位中的表达水平

Fig.2 The expression levels of reference genes in leaves of different varieties and different parts of the flower organs in *Cymbidium* hybrid

和*ChrpoB*这5个内参基因表达量较高, Ct值平均值在21~27。*Ch18S rRNA*属于高表达基因, 在‘黄金小神童’花瓣中的表达量最高, Ct值最小, 为10.698。从表达量变异系数角度来看, *Ch28S rRNA*变异系数最小, 其次是*ChTUB*, 而*ChrpoB*的变异系数最高。

## 2.4 候选内参基因的表达稳定性分析

本研究采用了geNorm、NormFinder和BestKeeper 3个不同软件对8种候选内参基因在杂交兰不同品种叶片及花器官不同部位的表达稳定性进行分析。

geNorm软件是通过将Ct值的平均值对数转换后导入软件中, 以基因配对的形式不断剔除最不稳定的基因, 最后比较表达稳定度M值的大小来进行候选内参基因稳定性的排序, 其中M值越小, 基因的表达稳定性越大。从表2可以看出, 不同实验条件下, 最佳内参基因不同。在杂交兰不同品种叶片中, 内参基因表达稳定性从高到低依次为*ChACT/ChUBQ*、*ChTUB*、*ChEF-1α*、*Ch28S rRNA*、*ChTUA*、*Ch18S rRNA*和*ChrpoB*, 说明在该条件下, *ChACT*和*ChUBQ*是最适合的内参基因。在花器官不同部位中, *ChUBQ*和*ChEF-1α*是最佳内参基因。而对于实验中所有样品来说, *ChTUB*和*ChEF-1α*才是最稳定的内参基因。对内参基因的配对差异值分析发现, 在不同品种叶片及所有样品条件下, 因 $V_{n,n+1}$ 均大于阈值0.15, 所以无法确定最适合内参基因的个数; 在花器官不同部位中,  $V_{2,3}$ 小于阈值0.15, 可以判定其最适合的内参基因数为2个。

本研究还采用了NormFinder和BestKeeper软件分析这8个内参基因的表达稳定性, NormFinder软件的计算原理与geNorm软件相似, 同样也是表达稳定

值越低的基因, 越适合作为内参基因。分析结果显示, 不同实验条件下, 最佳内参基因不同。在杂交兰不同品种叶片中, 内参基因的稳定性由低到高依次为*ChACT*、*ChTUB*、*ChUBQ*、*Ch28S rRNA*、*Ch18S rRNA*、*ChTUA*、*ChEF-1α*和*ChrpoB*, 表明*ChACT*是最适合的内参基因。在花器官不同部位中, *ChACT*同样是其最佳内参基因。而对于实验中所有样品来说, 最稳定的内参基因是*ChTUB*(表3)。

BestKeeper软件的判定原则为相关系数越大、标准偏差和变异系数越小, 则内参基因稳定性越好。分析结果显示, 在杂交兰不同品种叶片中, 候选内参基因的稳定性由高到低依次为*ChACT*、*ChTUB*、*ChUBQ*、*Ch28S rRNA*、*ChTUA*、*ChEF-1α*、*Ch18S rRNA*和*ChrpoB*, 表明最适合的内参基因是*ChACT*。在花器官不同部位中, 候选内参基因的稳定性由高到低依次为*ChTUB*、*ChEF-1α*、*ChUBQ*、*ChACT*、*ChrpoB*、*Ch18S rRNA*、*Ch28S rRNA*和*ChTUA*, 说明*ChTUB*是最佳内参基因。而对于实验中所有样品来说, 候选内参基因的稳定性由高到低依次为*ChACT*、*ChTUA*、*ChTUB*、*Ch18S rRNA*、*ChrpoB*、*Ch28S rRNA*、*ChEF-1α*和*ChUBQ*, 表明最稳定的内参基因是*ChACT*(表4)。

综合3个软件对内参基因表达稳定性的评价结果, 从表5可以看出, 在杂交兰不同品种叶片中, 3个软件计算结果所共有的最适内参基因为*ChACT*, 共有的最差内参基因为*ChrpoB*; 在花器官不同部位中, 3个软件计算出的最佳内参基因各不相同, 因此*ChACT*、*ChTUB*、*ChUBQ*和*ChEF-1α*均可作为该条件下的内参基因, 而*ChrpoB*是则最不稳定内参基因。而对于实验中所有样品来说, 重复的稳定性最高的

表2 geNorm软件分析杂交兰候选内参基因的表达稳定值

Table 2 Expression stability values (M) of candidate reference genes in *Cymbidium* hybrid as calculated by geNorm

| 排序<br>Rank | 所有样本<br>All samples |                 | 不同品种<br>Different varieties |                 | 花器官不同部位<br>Different flower parts |                 |
|------------|---------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------|
|            | Gene                | Stability value | Gene                        | Stability value | Gene                              | Stability value |
| 1          | <i>ChTUB</i>        | 0.738           | <i>ChACT</i>                | 0.313           | <i>ChUBQ</i>                      | 0.044           |
| 2          | <i>ChEF-1α</i>      | 0.738           | <i>ChUBQ</i>                | 0.313           | <i>ChEF-1α</i>                    | 0.044           |
| 3          | <i>ChUBQ</i>        | 0.953           | <i>ChTUB</i>                | 0.642           | <i>ChTUB</i>                      | 0.237           |
| 4          | <i>Ch28S rRNA</i>   | 1.160           | <i>ChEF-1α</i>              | 0.998           | <i>Ch28S rRNA</i>                 | 0.356           |
| 5          | <i>ChACT</i>        | 1.291           | <i>Ch28S rRNA</i>           | 1.231           | <i>ChACT</i>                      | 0.397           |
| 6          | <i>Ch18S rRNA</i>   | 1.496           | <i>ChTUA</i>                | 1.440           | <i>ChTUA</i>                      | 0.595           |
| 7          | <i>ChTUA</i>        | 1.574           | <i>Ch18S rRNA</i>           | 1.478           | <i>Ch18S rRNA</i>                 | 0.731           |
| 8          | <i>ChrpoB</i>       | 1.873           | <i>ChrpoB</i>               | 1.564           | <i>ChrpoB</i>                     | 1.649           |

表3 NormFinder软件分析杂交兰候选内参基因的表达稳定值

Table 3 Expression stability values (M) of candidate reference genes in *Cymbidium* hybrid as calculated by NormFinder

| 排序<br>Rank | 所有样本<br>All samples |                 | 不同品种<br>Different varieties |                 | 花器官不同部位<br>Different flower parts |                 |
|------------|---------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------|
|            | Gene                | Stability value | Gene                        | Stability value | Gene                              | Stability value |
|            |                     |                 |                             |                 |                                   |                 |
| 1          | <i>ChTUB</i>        | 0.404           | <i>ChACT</i>                | 0.297           | <i>ChACT</i>                      | 0.114           |
| 2          | <i>ChACT</i>        | 0.430           | <i>ChTUB</i>                | 0.420           | <i>ChUBQ</i>                      | 0.158           |
| 3          | <i>Ch18S rRNA</i>   | 0.621           | <i>ChUBQ</i>                | 0.564           | <i>ChEF-1a</i>                    | 0.198           |
| 4          | <i>Ch28S rRNA</i>   | 0.628           | <i>Ch28S rRNA</i>           | 0.571           | <i>ChTUB</i>                      | 0.241           |
| 5          | <i>ChTUA</i>        | 0.789           | <i>Ch18S rRNA</i>           | 0.678           | <i>ChTUA</i>                      | 0.274           |
| 6          | <i>ChEF-1a</i>      | 0.855           | <i>ChTUA</i>                | 0.753           | <i>Ch28S rRNA</i>                 | 0.329           |
| 7          | <i>ChUBQ</i>        | 0.872           | <i>ChEF-1a</i>              | 0.899           | <i>Ch18S rRNA</i>                 | 0.494           |
| 8          | <i>Chrpob</i>       | 1.162           | <i>Chrpob</i>               | 0.933           | <i>Chrpob</i>                     | 1.115           |

表4 BestKeeper软件分析杂交兰候选内参基因的稳定性参数

Table 4 The stability parameters of candidate reference genes in *Cymbidium* hybrid as calculated by BestKeeper

| 排序<br>Rank | 所有样本<br>All samples |                         |                    | 不同品种<br>Different varieties |                         |                    | 花器官不同部位<br>Different flower parts |                         |                    |
|------------|---------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------------------|-------------------------|--------------------|
|            | Gene                | Correlation coefficient | Standard deviation | Gene                        | Correlation coefficient | Standard deviation | Gene                              | Correlation coefficient | Standard deviation |
|            |                     |                         |                    |                             |                         |                    |                                   |                         |                    |
| 1          | <i>ChACT</i>        | 0.925                   | 0.618              | <i>ChACT</i>                | 0.872                   | 0.656              | <i>ChTUB</i>                      | 0.972                   | 0.130              |
| 2          | <i>ChTUA</i>        | 0.826                   | 0.978              | <i>ChTUB</i>                | 0.865                   | 0.616              | <i>ChEF-1a</i>                    | 0.891                   | 0.209              |
| 3          | <i>ChTUB</i>        | 0.771                   | 0.689              | <i>ChUBQ</i>                | 0.815                   | 0.758              | <i>ChUBQ</i>                      | 0.852                   | 0.204              |
| 4          | <i>Ch18S rRNA</i>   | 0.740                   | 0.819              | <i>Ch28S rRNA</i>           | 0.725                   | 0.748              | <i>ChACT</i>                      | 0.671                   | 0.052              |
| 5          | <i>Chrpob</i>       | 0.589                   | 1.491              | <i>ChTUA</i>                | 0.709                   | 1.052              | <i>Chrpob</i>                     | 0.554                   | 1.709              |
| 6          | <i>Ch28S rRNA</i>   | 0.556                   | 0.783              | <i>ChEF-1a</i>              | 0.668                   | 1.190              | <i>Ch18S rRNA</i>                 | 0.426                   | 0.807              |
| 7          | <i>ChEF-1a</i>      | 0.525                   | 1.166              | <i>Ch18S rRNA</i>           | 0.571                   | 0.831              | <i>Ch28S rRNA</i>                 | 0.399                   | 0.509              |
| 8          | <i>ChUBQ</i>        | 0.390                   | 1.089              | <i>Chrpob</i>               | 0.182                   | 0.998              | <i>ChTUA</i>                      | 0.395                   | 0.625              |

表5 3个软件综合分析最佳内参基因和最差内参基因

Table 5 Aggregated result of optimal and worst reference genes by three softwares

| 分析软件<br>Analysis Software | 所有样本<br>All samples           |                      | 不同品种<br>Different varieties |                      | 花器官不同部位<br>Different flower parts |                      |
|---------------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|
|                           | Optimal reference gene        | Worst reference gene | Optimal reference gene      | Worst reference gene | Optimal reference gene            | Worst reference gene |
|                           |                               |                      |                             |                      |                                   |                      |
| geNorm                    | <i>ChTUB</i> , <i>ChEF-1a</i> | <i>Chrpob</i>        | <i>ChACT</i> , <i>ChUBQ</i> | <i>Chrpob</i>        | <i>ChUBQ</i> , <i>ChEF-1a</i>     | <i>Chrpob</i>        |
| Normfinder                | <i>ChTUB</i>                  | <i>Chrpob</i>        | <i>ChACT</i>                | <i>Chrpob</i>        | <i>ChACT</i>                      | <i>Chrpob</i>        |
| BestKeeper                | <i>ChACT</i>                  | <i>ChUBQ</i>         | <i>ChACT</i>                | <i>Chrpob</i>        | <i>ChTUB</i>                      | <i>ChTUA</i>         |
| Commom gene               | <i>ChTUB</i>                  | <i>Chrpob</i>        | <i>ChACT</i>                | <i>Chrpob</i>        | None                              | <i>Chrpob</i>        |

内参基因为*ChTUB*, 稳定性最低的为*Chrpob*。

2.5 内参基因稳定性的验证

为了验证所筛选获得的内参基因的稳定性 and 可靠性, 以*ChACT*、*ChTUB*、*ChUBQ*、*ChEF-1a*及*Chrpob*作为内参基因, 研究杂交兰花器官不同部位中八氢番茄红素脱氢酶基因(*ChPDS*)的表达模式(图3)。以*ChUBQ*、*ChEF-1a*、*ChTUB*、*ChACT*及*ChUBQ*和*ChEF-1a*基因组合进行校正的*ChPDS*基因

表达模式均为花瓣中的相对表达量最高, 唇瓣中的相对表达量次之, 蕊柱中的相对表达量最低。而以稳定性最差的*Chrpob*基因进行校正时, *ChPDS*基因的表达模式发生了改变, 蕊柱中的相对表达量超过了唇瓣中的相对表达量。

3 讨论

选择合适的内参基因是提高实qPCR分析准确

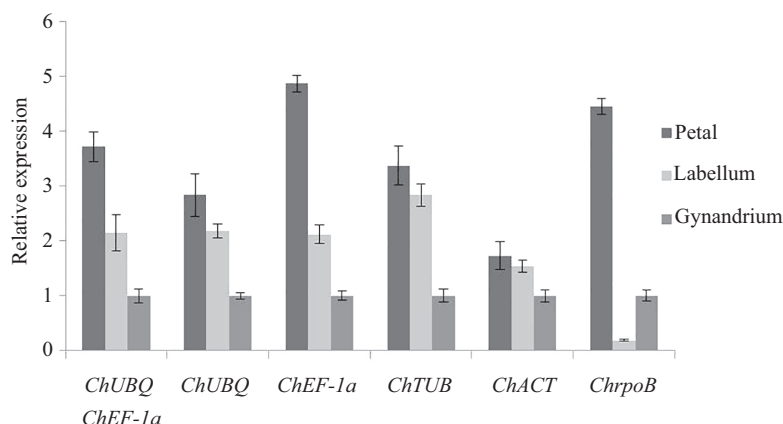


图3 不同内参基因或组合校正杂交兰花器官不同部位中 $ChPDS$ 的相对表达水平

Fig.3 The relative expression levels of  $ChPDS$  in different parts of the flower organs using different reference genes or reference gene combination for normalization in *Cymbidium* hybrid

性的重要条件,本研究克隆了 $Ch18S\ rRNA$ 、 $Ch28S\ rRNA$ 、 $ChACT$ 、 $ChTUA$ 、 $ChTUB$ 、 $ChUBQ$ 、 $ChEF-1a$ 和 $ChrhoB$ 这8个基因的片段,并将获得的序列通过Blast比对,发现这些基因均呈现高度的保守性。这些基因片段的获得补充了NCBI数据库中杂交兰的基因数据,丰富了杂交兰内参基因的选择,为研究杂交兰基因表达提供更多参照序列和参考依据。

理想的内参基因应在不同的物种、不同生长阶段、不同组织器官、不同处理条件下均恒定表达,但事实上,并不存在这样的一种理想化的内参基因。在不同物种间,内参基因没有绝对的通用性,在一种植物中稳定性好的内参基因在另一种植物中不一定适用。比如, $18S\ rRNA$ 作为传统的内参基因应用于许多植物中,但在小麦、苜蓿和杜鹃中, $18S\ rRNA$ 并不适合作为这3种植物的内参基因<sup>[25]</sup>。本研究结果发现, $18S\ rRNA$ 在杂交兰中的表达丰度很高,但稳定性较差,不适宜选择其作为杂交兰的内参基因。即使在同一个物种中,内参基因也受到不同的生理状态的影响,并不能保持恒定不变的表达。在以6个籼粳稻品种胚乳为研究材料的管家基因筛选中, $ACT1$ 表达稳定性很好<sup>[26]</sup>;但在水稻2个品种的颖花开放过程中, $ACT1$ 的表达均最不稳定<sup>[27]</sup>。本研究中, $ChEF-1a$ 在杂交兰不同花器官部位中稳定性好,但对于不同品种杂交兰叶片来说,其稳定性却并不理想。因此,针对不同实验材料和不同实验处理条件,筛选适宜的内参基因显得尤为必要。

内参基因稳定性的验证和分析是筛选合适内参基因的前提条件,有关内参基因稳定性评价的软件也层出不穷,目前较为常用的有geNorm、

NormFinder、BestKeeper等。每个软件的计算方法不同,以至于哪个软件更具有权威性,目前还没有定论。本研究采用了这3个软件进行分析评价,在对不同品种杂交兰叶片中8个候选内参基因的稳定性比较时发现,geNorm计算结果显示 $ChACT$ 和 $ChUBQ$ 是最适合的内参基因;NormFinder软件分析发现 $ChACT$ 是最适合的内参基因;BestKeeper的评价结果依然显示最适合的内参基因是 $ChACT$ 。说明3个软件的评价结果大致相同, $ChACT$ 在这3种算法下均保持了最高的稳定性。魏永赞等<sup>[28]</sup>对荔枝6个内参基因的稳定性分析结果也发现了 $\beta-actin$ 基因在3种不同算法下均有较好的表达稳定性。

由于各个软件的算法和分析程序的不同,采用不同的软件进行同一实验条件中内参基因稳定性分析时往往会得到不同的分析结果,这一观点在芝麻<sup>[29]</sup>、黄瓜<sup>[24]</sup>等的内参基因研究报告中均有报道。本研究对杂交兰花器官不同部位中各内参基因稳定性分析发现,geNorm计算结果显示 $ChUBQ$ 和 $ChEF-1a$ 是最佳的内参基因;NormFinder软件分析发现 $ChACT$ 是最适合的内参基因;BestKeeper的评价结果显示最适合的内参基因是 $ChTUB$ ,说明这3个软件的分析结果存在差异。因此,应根据具体的实验目的和实验设计选择具有针对性的筛选工具,从而选择最适合的内参基因,以达到更准确地校正目标基因的目的。

为了验证所筛选获得的内参基因的可靠性,本研究以筛选的内参基因作为标准,研究杂交兰花器官不同部位中八氢番茄红素脱氢酶基因( $ChPDS$ )的表达模式。以 $ChUBQ$ 、 $ChEF-1a$ 、 $ChTUB$ 、 $ChACT$ 及 $ChUBQ$ 和 $ChEF-1a$ 基因组合进行校正的 $ChPDS$ 基

因表达模式均为花瓣>唇瓣>蕊柱,而以稳定性最差的*Chrpob*基因进行校正时,*ChPDS*基因的表达模式产生变化,其相对表达量为花瓣>蕊柱>唇瓣。*PDS*基因是类胡萝卜素生物合成途径中的一个限速酶基因,其表达量的增多与类胡萝卜素含量呈正相关<sup>[30]</sup>。类胡萝卜素是很多花中的主要色素,在文心兰<sup>[31]</sup>、鹤望兰<sup>[30]</sup>中,黄色花的形成受到类胡萝卜素途径的调控。本研究所用的花朵为黄色花,研究结果说明了所筛选的内参基因的可靠性,也为杂交兰后续的基因功能研究提供参考。

### 参考文献 (References)

- 曾瑞珍, 谢利, 郭和蓉, 黎扬辉, 易懋升, 杜宝贵, 等. 杂交兰新品种‘玉女兰’. 园艺学报(Zeng Ruizhen, Xie Li, Guo Herong, Li Yanghui, Yi Maosheng, Du Baogui, et al. A new hybrid *Cymbidium* cultivar ‘Yuniilan’. Acta Horticulturae Sinica) 2014; 41(2): 401-2.
- 范晓芬, 苏振洪, 朱建军, 李秀芬, 易水根. 施肥浓度与周期对杂交兰组培苗叶片生长的影响. 上海农业学报(Fan Xiaofen, Su Zhenhong, Zhu Jianjun, Li Xiufen, Yi Shuigen. Effects of fertilization concentrations and cycles on the growth of tissue-cultured plantlet leaves of hybrid *Cymbidium*. Acta Agriculturae Shanghai) 2013; 29(4): 9-13.
- 陆然. 杂交兰: 生产渐成规模产销优势明显. 中国花卉园艺(Lu Ran. *Cymbidium* hybrid: the production of the scale production and marketing advantages are obvious. China Flowers & Horticulture) 2013; 1: 23-4.
- 谢利, 马晓娟, 郭和蓉, 曾瑞珍, 张志胜. 杂交兰类原球茎增殖中芽分化的控制和快速繁殖. 植物生理学报(Xie Li, Ma Xiaojuan, Guo Herong, Zeng Ruizhen, Zhang Zhisheng. Control of bud differentiation of protocorm-like bodies during proliferation and micropropagation of hybrid *Cymbidium*. Plant Physiology Communications) 2014; 50(2): 209-13.
- 曾碧玉, 常强, 许传俊. 杂交兰品种‘韩国小姐’与墨兰品种‘企剑黑墨’杂交坐果及无菌播种研究. 热带作物学报(Zeng Biyu, Chang Qiang, Xu Chuanjun. Study on fruit set and aseptic seeding between hybrid *Cymbidium* ‘Miss Korea’ and *Cymbidium sinense* ‘Qijian Heimo’. Chinese Journal of Tropical Crops) 2015; 36(3): 510-5.
- Teixeira da Silva JA. Impact of paper bridges, activated charcoal, and antioxidants on growth and development of protocorm-like bodies of hybrid *Cymbidium*. In Vitro Cell Dev-pl 2013; 49(4): 414-20.
- 尹翠翠, 张燕, 张景华, 陈瑶瑶, 王广东. 秋水仙素诱导杂交兰四倍体及倍性鉴定. 核农学报(Yin Cuicui, Zhang Yan, Zhang Jinghua, Chen Yaoyao, Wang Guangdong. Tetraploid induction by colchicine and identification in *Cymbidium* interspecific hybrids. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica) 2010; 24(3): 518-21.
- 谢佩吾, 李早文, 伍爱萍, 朱根发, 江南. 17个杂交兰及3个大花蕙兰品种的染色体研究. 广东农业科学(Xie Peiwu, Li Zaowen, Wu Aiping, Zhu Genfa, Jiang Nan. Study on chromosome of 17 cultivars of hybrid *Cymbidium* and three cultivars of *Cymbidium hybridum*. Guangdong Agricultural Sciences) 2015; 42(8): 26-8.
- 吴春雷, 程岩, 李玉萍. 杂交兰黄金小神童栽培基质的筛选. 天津农业科学(Wu Chunlei, Cheng Yani, Li Yuping. Screening the cultivation matrix of *Cymbidium* Golden Elf ‘Sundust’. Tianjin Agricultural Sciences) 2016; 22(10): 42-6.
- 张晓艳, 张志胜, 郭和蓉, 吴艳飞, 林青, 谢利. 杂交兰花期调控技术研究. 安徽农业科学(Zhang Xiaoyan, Zhang Zhisheng, Guo Herong, Wu Yanfei, Lin Qing, Xie Li. Study on the regulation of florescence of hybrid *Cymbidium*. Journal of Anhui Agricultural Sciences) 2014; 42(17): 5400-2.
- 肖文芳, 李佐, 尤毅, 陈和明, 吕复兵. 兰属杂交兰绿翡翠组培变异的RAPD检测与鉴定. 广东农业科学(Xiao Wenfang, Li Zuo, You Yi, Chen Heruing, Lyu Fubing. Detection and identification of high-tillering and dwarf mutants from *Cymbidium* hybrids ‘Lv Fei Cui’ by RAPD. Guangdong Agricultural Sciences) 2014; 41(21): 135-9.
- 钟淮钦, 林榕燕, 黄敏玲, 林兵, 陈南川. 杂交兰种质资源遗传多样性的SRAP分析. 福建农业学报(Zhong Huaiqin, Lin Rongyan, Huang Minling, Lin Bing, Chen Nanchuan. SRAP-marker based genetic diversity of germplasm of *Cymbidium* Hybrids, Fujian Journal of Agricultural Sciences) 2016; 31(11): 1193-7.
- Guenin S, Mauriat M, Pelloux J, van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions specific, validation of references. J Exp Bot 2009; 60(2): 487-93.
- Maroufi A. Selection of reference genes for real-time quantitative PCR analysis of gene expression in *Glycyrrhiza glabra* under drought stress. Biol Plant Arum 2016; 60(4): 645-54.
- Liu WH, Zhao TF, Wang HY, Zeng JL, Xiang LE, Zhu SQ, et al. Reference gene selection in *Artemisia annua* L., a plant species producing anti-malarial artemisinin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 2015; 121(1): 141-52.
- Lekshmy S, Jha SK. Selection of reference genes suitable for qRT-PCR expression profiling of biotic stress, nutrient deficiency and plant hormone responsive genes in bread wheat. Indian J Plant Physiol 2017; 22(1): 101-6.
- Migocka M, Papierniak A. Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. Mol Breeding 2011; 28(30): 343-57.
- Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. J Appl Genet 2013; 54(4): 391-406.
- Wu Q, Ma XY, Zhang KF, Feng XH. Identification of reference genes for tissue-specific gene expression in *Panax notoginseng* using quantitative real-time PCR. Biotechnol Lett 2015; 37(1): 197-204.
- Chen H, Yang ZQ, Hu Y, Tan JH, Jia J, Xu HL, Chen XH. Reference genes selection for quantitative gene expression studies in *Pinus massoniana* L.. Trees 2016; 30(3): 685-96.
- Yao Z, Zhao J, Liu S, Ruan M, Ye Q, Wang R, Li Z, Zhou G, Yang Y, Wan H, Yuan W. Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.). Biochem Biophys Res Commun 2011; 416(1/2): 24-30.
- 罗克灿. 寒兰内参基因的筛选和DREB转录因子的表达分析. 南昌大学(硕士论文)(Luo Kechan. Study on the selection of reliable reference genes and expression analysis of transcription factors DREB in *Cymbidium kanran* Mak.. Nanchang University), 2013.

- 23 Dombrowski JE, Martin RC. Evaluation of reference genes for quantitative RT-PCR in *Lolium temulentum* under abiotic stress. *Plant Sci* 2009;176(3): 390-6.
- 24 Wan HJ, Zhao ZG, Qian CT, Sui YH, Malik AA, Chen JF. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Anal Biochem* 2010; 399(2): 257-61.
- 25 周晓馥, 王 晶, 史宏伟, 徐洪伟. *18S rRNA*作为植物实时荧光定量PCR内参基因的探究. *吉林师范大学学报(自然科学版)*(Zhou Xiaofu, Wang Jing, Shi Hongwei, Xu Hongwei. The exploration of *18S rRNA* for quantitative RT-PCR as reference gene in plant. *Jilin Normal University Journal: Natural Science Edition*) 2016; 37(2): 115-9.
- 26 李钱峰, 蒋美艳, 于恒秀, 辛世文, 顾铭洪, 刘巧泉. 水稻胚乳RNA定量RT-PCR分析中参照基因选择. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*(Li Qianfeng, Jiang Meiyan, Yu Hengxiu, Samuel Saiming Sun, Gu Minghong, Liu Qiaoquan. Selection of internal reference genes for quantitative RT-PCR analysis of total RNA from endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Yangzhou University: Agricultural and Life Science Edition*) 2008; 29(2): 61-6.
- 27 何永明, 曾晓春. 开花期水稻颖花实时定量RT-PCR分析中内参基因的选择. *江西农业大学学报*(He Yongming, Zeng Xiaochun. Reference gene selection for quantitative Real-time RT-PCR normalization in rice florets during anthesis. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*) 2012; 34(6): 1086-92.
- 28 魏永赞, 赖 彪, 胡福初, 李晓静, 胡桂兵, 王惠聪. 用于荔枝qPCR分析的内参基因克隆及稳定性分析. *华南农业大学学报*(Wei Yongzan, Lai Biao, Hu Fuchu, Li Xiaojing, Hu Guibing. Cloning and stability analysis of reference genes for expression studies by quantitative real-time PCR in *Litchi*. *Journal of South China Agricultural University*) 2012; 33(3): 301-6.
- 29 Wei LB, Miao HM, Zhao RH, Han XH, Zhang TD, Zhang HY. Identification and testing of reference genes for sesame gene expression analysis by quantitative real-time PCR. *Planta* 2013; 237(3): 873-89.
- 30 黄敏玲, 樊荣辉. 鹤望兰八氢番茄红素脱氢酶基因*SrPDS*的克隆及表达分析. *园艺学报*(Huang Minling, Fan Ronghui. Cloning and expression analysis of phytoene desaturase in *Strelitzia reginae* banks. *Acta Horticulturae Sinica*) 2013; 40(2): 373-9.
- 31 Chiou CY, Pan HA, Chuang YN. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in floral issues of *Oncidium* cultivars. *Planta* 2010; 232: 937-48.