

桂花组织基因表达中荧光定量 PCR 内参基因的筛选

付建新¹, 张 超¹, 王艺光¹, 赵宏波^{1,2}

(1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: 为了筛选桂花 *Osmanthus fragrans* 不同组织基因表达分析中适合的内参基因, 以桂花 ‘堰虹桂’ *O. fragrans* ‘Yanhong Gui’ 花蕾、盛开花序、嫩叶、成熟叶和 1 年生茎等 5 个不同组织为材料, 利用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测 7 个候选内参基因的表达水平, 并利用 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper 软件对各候选内参基因的表达稳定性进行评价, 最后利用桂花不同组织中 *OfCRTISO1* 基因相对表达水平验证筛选的内参基因的可靠性。结果表明: 综合 3 个软件的评价排序, 确定不同组织中最佳内参基因为 *OfRAN1* 和 *OfUBC2*, 而 *Of18S* 是最差内参基因。*OfCRTISO1* 基因相对表达水平分析证实, 不同组织中 qRT-PCR 分析使用 *OfRAN1* 和 *OfUBC2* 等 2 个表达最稳定的基因组合, 即可获得更为精确的基因表达结果。旨在为桂花组织间重要基因的定量表达分析提供科学依据。图 4 表 4 参 34

关键词: 植物学; 桂花; 内参基因; geNorm; NormFinder; BestKeeper

中图分类号: S687 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2016)05-0727-07

Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) normalization in the gene expression of sweet osmanthus tissues

FU Jianxin¹, ZHANG Chao¹, WANG Yiguang¹, ZHAO Hongbo^{1,2}

(1. School of Landscape Architecture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. The Nurturing Station for State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To select the suitable reference gene (s) for gene expression analysis in different tissues of *Osmanthus fragrans*, five tissues: buds, fully-opened inflorescences, young leaves, adult leaves, and one-year-old stems, from *O. fragrans* ‘Yanhong Gui’ were used as materials to detect the expression levels of seven candidate reference genes by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Then, an aggregated analysis of gene expression stability for these candidates was conducted using three software programs: geNorm, NormFinder, and BestKeeper. Finally, the relative expression level of *OfCRTISO1* in different tissues was analyzed to verify the reference genes selected in this study. Results of the aggregated analysis showed that *OfRAN1* and *OfUBC2* were the best reference genes from the different tissues, and *Of18S* was the worst reference gene. In addition, analysis of the relative expression level for *OfCRTISO1* confirmed that *OfRAN1* and *OfUBC2* were the two most stable reference genes in the qRT-PCR analysis of the tissues, and the application of *OfRAN1* and *OfUBC2* was enough to achieve more accurate and reliable results in these tissues. Thus, the pre-

收稿日期: 2015-09-10; 修回日期: 2016-04-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31501790, 31170656); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ15C160004); 浙江农林大学科研发展基金人才启动项目(2014FR072)

作者简介: 付建新, 讲师, 博士, 从事园林植物遗传育种和分子生物学研究。E-mail: fujianxin2008@sohu.com。
通信作者: 赵宏波, 教授, 博士, 从事观赏植物遗传育种和植物繁殖生态研究。E-mail: zhao-hb@zafu.edu.cn

sent study has provided an important reference for analyzing the expression of key genes in different tissues of *O. fragrans*. [Ch, 4 fig. 4 tab. 34 ref.]

Key words: botany; *Osmanthus fragrans*; reference gene; geNorm; NormFinder; BestKeeper

实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real time fluorescence polymerase chain reaction, qRT-PCR)因具有灵敏度高、特异性强、精准性高、检测范围广等优点^[1],已被广泛应用于植物基因表达的相关研究中。利用 qRT-PCR 分析基因相对定量表达时,为了消除不同组织细胞间初始模板量、核糖核酸(RNA)制备和反转录过程中的偏差,需要引入内参基因(reference gene)对表达结果进行校正^[2-3]。实际研究中常选择的内参基因^[4-8]只能在一定的试验范围内相对稳定表达,不能保证在所有试验条件下均能稳定表达^[9-11]。如果盲目以一种看家基因作为任何试验条件下的内参基因,容易得到精确度低甚至错误的结果^[12],因此,在利用 qRT-PCR 进行基因表达分析时,根据试验处理及不同实验材料的特点,优化和选择合适的内参基因就显得极其重要。桂花 *Osmanthus fragrans* 是中国十大名花之一,随着桂花分子生物学研究的不断深入和发展,基因表达分析已经广泛应用于揭示其观赏性状形成机制的研究中,因此,筛选稳定的内参基因在桂花重要基因表达分析中起着关键的作用。已有研究筛选出桂花不同品种、不同发育状态花序和不同温度处理条件中合适的内参基因^[13],却未对不同组织中适合的内参基因进行筛选。本研究将以桂花‘堰虹桂’*O. fragrans* ‘Yanhong Gui’不同组织(花蕾、盛开花序、嫩叶、成熟叶、1年生茎)为材料,利用 qRT-PCR 检测 7 个候选内参基因的表达水平,并利用软件 geNorm^[3], NormFinder^[2]和 BestKeeper^[14]对各候选内参基因的表达稳定性进行评价,筛选出最稳定表达的内参基因,并研究桂花类胡萝卜素异构酶(*OjCRTISO1*)在不同组织中的表达模式,验证筛选得到的内参基因的可靠性,希冀为后续研究不同组织重要基因的定量表达提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

浙江农林大学桂花资源圃 10 a 树龄地栽桂花‘堰虹桂’为试验材料,对其花蕾、盛开花序、嫩叶、成熟叶、1年生茎进行取样,液氮速冻后,于-80℃储藏备用。

1.2 方法

1.2.1 不同组织材料总 RNA 提取与 cDNA 的第 1 链的合成 采用 RNAprep pure Plant Kit (天根,北京)按照说明书步骤提取各样品的总 RNA。紫外分光光度计和 10.0 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 浓度和质量。采用 Reverse Transcriptase M-MLV (Takara, 大连)按照说明书合成 cDNA 的第 1 链后,于-20℃储存备用。

1.2.2 内参基因的选择及特异性引物设计 本研究从前期构建的桂花转录组数据库中取肌动蛋白基因(*OjACT*),延伸因子 1 α 蛋白基因(*OjEF1 α*), NADP-异柠檬酸脱氢酶基因(*OjIDH*), GTP 结合蛋白 RAN1 基因(*OjRAN1*), β 微管蛋白基因(*OjTUB*), 泛素结合酶 E2 基因(*OjUBC2*)和 18S 核糖体 RNA 基因(*Oj18S*)等 7 种看家基因作为候选的内参基因。根据 qRT-PCR 引物设计原则,利用 Primer Premier 5 等软件设计各候选内参基因的 qRT-PCR 引物(引物序列见表 1),其中 *Oj18S* 引物引自文献[5]。

表 1 qRT-PCR 检测中 7 个候选内参基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of seven candidate reference genes in qRT-PCR analysis

基因名	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
<i>OjACT</i>	CCCAAGGCAAAACAGAGAAAAAAT	ACCCCATCACCAGAATCAAGAA
<i>OjEF1α</i>	CGTTTGCCACTTCAGGATGTCTA	GTACCAGGTTTCAGGACTCCAGTTT
<i>OjIDH</i>	CTTGAAGCAGATGTGGAAGAGTC	CTTTGTCCATCCTGGGACCACTC
<i>OjRAN1</i>	AGAACCGACAGGTGAAGGCAA	TGGCAAGGTACAGAAAGGGCT
<i>OjTUB</i>	AGAAGGGATGGATGGAATGGA	GTCTTCTTCGTCCTCGGCAGT
<i>OjUBC2</i>	TGTTGACAAAACCGATGGAAGGA	GTGGACTGTGGAGGATAAGGGTG
<i>Oj18S</i>	AGCCTGAGAAACGGCTACCAC	ATACGCTATTGGAGCTGGAA

1.2.3 内参基因的 qRT-PCR 分析 利用两步法来进行 qRT-PCR 分析，在 7300 实时 PCR 仪 (Applied Biosystems) 运行。基于 SYBR Green 染料的 qRT-PCR 来检测内参基因的循环阈值 C_t 值，所用反应体系和程序参考 Takara 公司的 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒的说明书。PCR 反应体系为 20.0 μL ，其中 2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 10.0 μL ，上下游定量引物 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 各 0.8 μL ，模板 cDNA 2.0 μL ，50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4 μL ，用灭菌双蒸水补齐至 20.0 μL 。qRT-PCR 扩增采用两步法，即在 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s 之后，先运行 40 个循环的 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 31 s，再运行溶解曲线阶段的 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。通过观察 ABI 7300 实时 PCR 仪在 PCR 反应后生成的溶解曲线为单一峰判定所用引物无非特异扩增；实验得到定量 C_t 值用于后期内参基因稳定性分析。

1.2.4 数据处理与分析 本研究采用 geNorm^[3]，NormFinder^[2] 和 BestKeeper^[14] 软件对 7 种候选内参基因在桂花不同组织中的表达稳定性进行统计学分析，从而筛选桂花组织基因表达中最合适的内参基因。

1.2.5 桂花 *OfCRTISO1* 基因验证内参基因稳定性 利用桂花不同组织中 *OfCRTISO1* 基因表达模式验证筛选的内参基因的稳定性，其表达上游引物为 5'-GAAAAACAAGGGATTCTCGGA-3'，下游引物为 5'-GCAGATAGTAGGCAAGGGTCAA-3'。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因引物评价

以桂花嫩叶的 cDNA 为模板，利用 7 对引物均能扩增出与各候选内参基因预期大小一致的单一条带(结果未显示)，说明这 7 对引物均能特异性地扩增相应片段，可以用于 qRT-PCR 分析。qRT-PCR 溶解曲线分析表明：这 7 对引物的扩增产物单一，可用于下一步分析。将反转录的嫩叶 cDNA 样品以 5 倍浓度梯度稀释，以此为模板进行 qRT-PCR 扩增后制作 7 种内参基因的标准曲线，结果(表 2)显示：各内参基因的线性相关系数 $R^2 \geq 0.990\ 0$ ，引物的扩增效率为 97.7%~109.6%，符合 qRT-PCR 对扩增效率的要求。

表 2 7 个候选内参基因扩增特性

Table 2 Amplicon characteristics of seven candidate reference genes			
基因名	扩增长度/bp	PCR 扩增效率/%	线性相关系数
<i>OfACT</i>	143	109.6	0.998 4
<i>OfEF1α</i>	89	97.7	0.997 4
<i>OfIDH</i>	118	101.8	0.995 2
<i>OfRAN1</i>	117	100.4	0.990 3
<i>OfTUB</i>	106	103.8	0.998 1
<i>OfUBC2</i>	75	97.7	0.994 8
<i>Of18S</i>	208	104.7	0.992 6

2.2 候选内参基因的表达水平分析

7 个候选内参基因在不同组织中的 C_t 值平均为 13.395~26.259(图 1)，其中 *Of18S* 在所有样品中的转录水平最高， C_t 值最小(13.395)；而 *OfTUB* 基因的表达水平最低， C_t 值最大(26.259)。从表达量变异系数看，*OfRAN1* 最小，然后是 *OfUBC2*，而 *OfIDH* 最大。

2.3 候选内参基因的表达稳定性分析

本研究首先采用 geNorm 软件对 7 个候选内参基因的表达稳定性进行分析(图 2)，结果显示：在不同组织中，*OfRAN1* 和 *OfUBC2* 基因的基因表达稳定值(M)最小($M=0.014\ 8$)，表示这 2 个基因表达最为稳定，其次是 *OfACT*($M=0.038\ 4$)和 *OfEF1 α* ($M=0.045\ 3$)。*OfIDH*，*OfTUB* 和 *Of18S* 是稳定性排序靠后的 3 个候选内参基因，其中 *Of18S* 的 M 值最大($M=0.158\ 1$)，是最不稳定内参基因。

利用 geNorm 程序对内参基因的配对差异值 $V_{n/n+1}$ 进行分析(图 3)，发现所检测的 V_{23} 低于程序默认取舍值 0.15，说明无需引入第 3 个基因进行校正，因此选择表达最为稳定的 2 个内参基因即

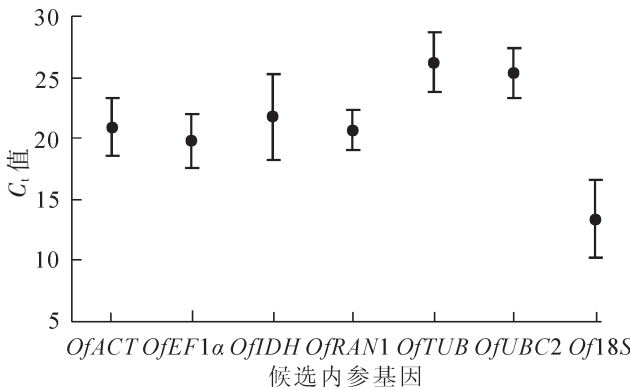


图 1 不同组织中 7 个候选内参基因的平均 C_t 值

Figure 1 Mean C_t values of seven candidate reference genes in different tissues

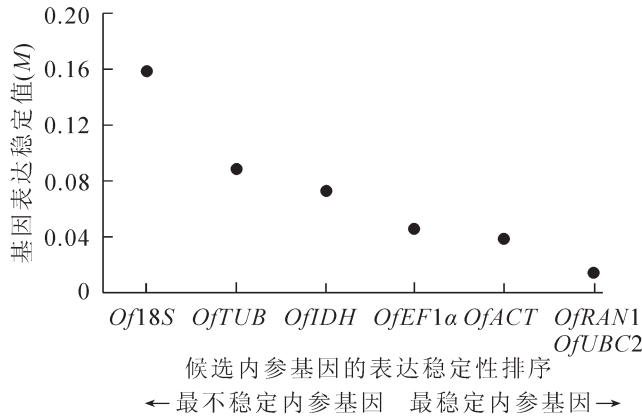


图 2 geNorm 软件分析 7 个候选内参基因的表达稳定值(M)

Figure 2 Expression stability values (M) of seven candidate reference genes as calculated by geNorm

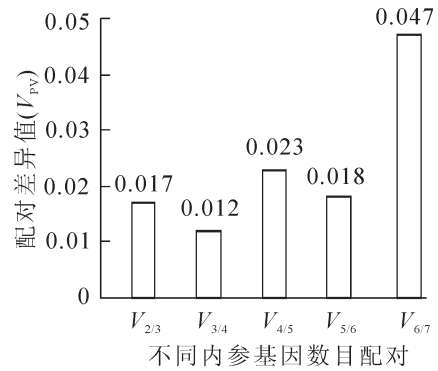


图 3 geNorm 软件分析 7 个候选内参基因的配对差异值(V_{PV})

Figure 3 Pairwise variation (V_{PV}) of seven candidate reference genes as calculated by geNorm

OfRAN1 和 *OfUBC2*, 以两者的几何平均值作为参照可更为准确地校正目的基因的表达。

此外, 为保证结果分析的准确性, 本研究还利用 NormFinder 和 BestKeeper 分析 7 个候选内参基因的表达稳定性(表 3), 结果显示: NormFinder 和 BestKeeper 的分析结果与 geNorm 分析的结果整体上一致。通过 3 个软件评价得到的稳定性排序中, *OfRAN1* 和 *OfUBC2* 均是表达稳定性最高的 2 个基因, 其次是 *OfACT* 和 *OfEF1α*, 表明这 2 个基因在不同组织中的表达较为稳定。而根据 3 个软件的分析, *OfIDH*, *OfTUB* 和 *Of18S* 是表达稳定性最差的 3 个候选内参基因。综合 3 个软件对最佳内参基因和最差内参基因的评价(表 4), 得到不同组织中最佳内参基因为 *OfRAN1* 和 *OfUBC2*, 而 *Of18S* 是最差内参基因。

2.4 桂花 *OfCRTISO1* 基因验证内参基因稳定性

为了验证筛选的最佳内参基因稳定性是否准确, 我们利用不同内参基因或组合校正桂花不同组织中 *OfCRTISO1* 基因的相对表达(图 4)。选择 *OfRAN1*, *OfUBC2*, *OfRAN1* 和 *OfUBC2* 基因组合进行校正的 *OfCRTISO1* 基因表达模式相同, 均在盛开花序中表达量显著高于其他组织, 在花蕾、嫩叶和成熟叶中的表达量相同, 而在 1 年生茎中表达量最低。以稳定性较差的其他内参基因进行校正时, *OfCRTISO1* 基因表达模式产生变化。上述结果表明: 3 个软件对内参基因表达稳定性的排序结果可靠, 证实 *OfRAN1* 和 *OfUBC2* 为不同组织中最佳内参基因。

3 讨论

理想的内参基因应在不同的基因型、不同发育阶段、不同组织器官、不同胁迫条件下均恒定表达, 但事实上, 并没有一个基因在所有试验条件下能稳定表达^[15], 因此, 需要根据不同试验材料和不同试验处理条件下筛选合适的内参基因。本研究通过对 7 个候选内参基因在 5 个不同组织中的表达稳定性进行

表 3 NormFinder 和 BestKeeper 分析 7 个候选内参基因的表达稳定性

Table 3 Gene expression stability of seven candidate reference genes by NormFinder and BestKeeper

基因名	NormFinder 分析		BestKeeper 分析	
	稳定值	排序	稳定值	排序
<i>OfACT</i>	0.010	2	1.678	4
<i>OfEF1α</i>	0.010	2	1.546	3
<i>OfIDH</i>	0.096	4	2.651	7
<i>OfRAN1</i>	0.005	1	1.168	1
<i>OfTUB</i>	0.084	3	2.080	5
<i>OfUBC2</i>	0.005	1	1.381	2
<i>Of18S</i>	0.227	5	2.272	6

表 4 最佳内参基因和最差内参基因综合结果

Table 4 Aggregated result of the optimal and worst reference genes

分析软件	最佳内参基因	最差内参基因
geNorm	<i>OfRAN1</i> 和 <i>OfUBC2</i>	<i>Of18S</i>
NormFinder	<i>OfRAN1</i> 和 <i>OfUBC2</i>	<i>Of18S</i>
BestKeeper	<i>OfRAN1</i>	<i>OfIDH</i>
综合结果	<i>OfRAN1</i> 和 <i>OfUBC2</i>	<i>Of18S</i>

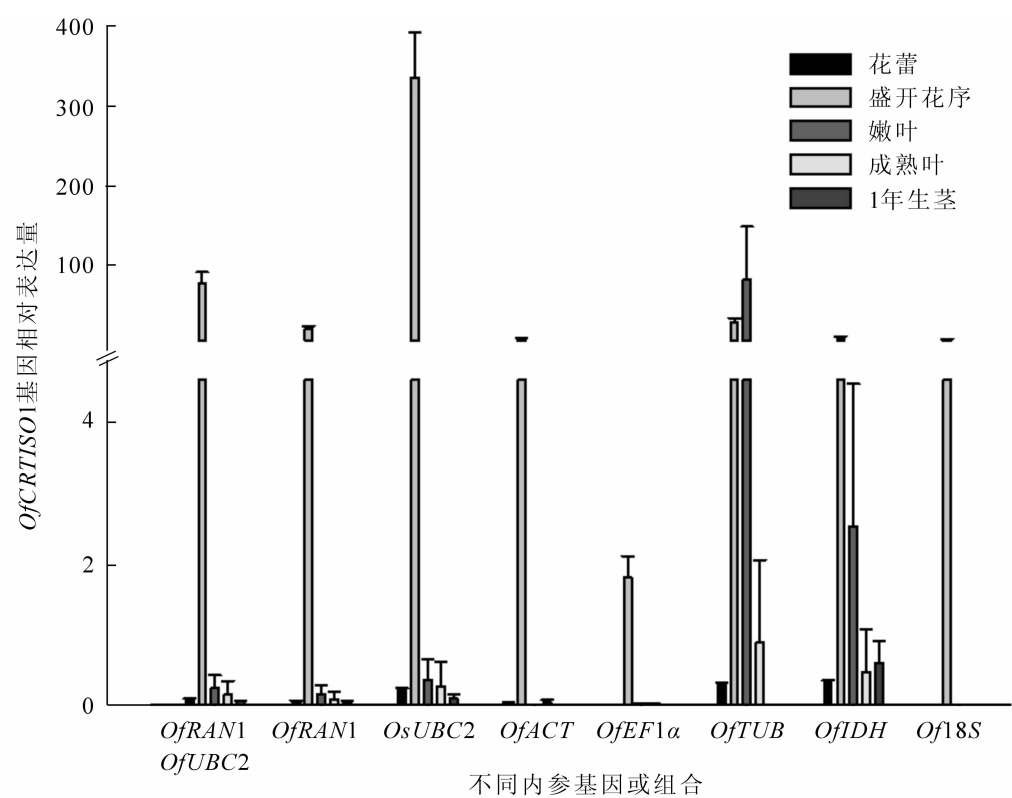


图 4 不同内参基因或组合校正桂花不同组织中 *OfCRTISO1* 基因的相对表达

Figure 4 Relative expression levels of *OfCRTISO1* in different tissues using different reference genes or reference gene combination for normalization

研究，筛选得到桂花不同组织中最佳内参基因为 *OfRAN1* 和 *OfUBC2*，为后续桂花不同组织中目标基因表达规律的研究奠定了基础。

目前，3 个统计分析软件 geNorm，NormFinder 和 BestKeeper 常用于确定不同植物材料或试验条件下最佳的内参基因^[6, 13, 16-17]。然而，3 个软件在许多物种中的分析结果存在差异，如芝麻 *Sesamum indicum*^[6]，黄花蒿 *Artemisia annua*^[18]和牛奶子 *Elaeagnus umbellata*^[19]。在本研究中，3 个软件的分析结果整体排序一致(图 2 和表 3)。*OfRAN1* 和 *OfUBC2* 基因在 geNorm 和 NormFinder 的稳定性排序中并列第一，而 BestKeeper 软件评价 *OfRAN1* 为表达最为稳定的内参基因，*OfUBC2* 基因以微弱差距排列第二。综合 3 个软件分析结果确定 *OfRAN1* 和 *OfUBC2* 基因为桂花不同组织中最佳内参基因。有研究证实：选择 2 个或 2 个以上的内参基因作参照，可以减弱单一内参变化的影响，不同内参表达的相似性有助于增加结果的可靠度及精确度^[3, 20-21]，因此确定 *OfRAN1* 和 *OfUBC2* 基因组合为桂花不同组织中表达分析的内参基因可更为准确地校正桂花不同组织中目的基因的表达结果。

RAN(ras-related nuclear protein)是小 G 蛋白家族的一类，在真核生物进化过程中比较保守，在许多细胞生理进程过程中发挥着重要的作用^[22-24]。RAN 同源基因 *RAN3*，是金鱼草 *Antirrhinum majus* 中 qRT-PCR 分析常用的内参基因^[25-26]。通过对矮牵牛 *Petunia hybrida* 开花过程中相关候选内参基因的筛选，证实 *RAN1* 是矮牵牛中稳定表达的内参基因之一^[27]。与 *ACT*，*EF1α* 和 *TUB* 等其他传统内参基因相比，将 RAN 基因作为内参基因进行研究和应用的报道较少。本研究证实 *RAN1* 在桂花不同组织中稳定表达，是最佳内参基因之一。此外，*RAN1* 被证实是桂花不同品种中表达量最为稳定的内参基因^[13]。与 *RAN* 基因相同，*OfUBC2* 在桂花不同组织中也稳定表达，是另一个最佳内参基因。作为一个传统内参基因，*UBC* 基因在拟南芥 *Arabidopsis thaliana*^[28-30]，月季 *Rosa hybrida*^[31]，侧柏 *Platycladus orientalis*^[32]等物种的内参基因筛选中均表现最佳。

本研究发现 *Of18S* 在桂花不同组织中表达最不稳定，不适合作为内参基因在桂花中应用。同样，在丹参 *Salvia miltiorrhiza*^[33]，牡丹 *Paeonia suffruticosa*^[34]，大白菜 *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*^[8]和西瓜 *Citrullus lanatus*^[16]中，*Of18S* 基因也被证实是表达最不稳定的内参基因。这可能与 18S 基因在样品中高丰度

表达有关。

4 参考文献

- [1] BUSTIN S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems [J]. *J Mol Endocrinol*, 2002, **29**(1): 23 – 39.
- [2] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ØRNTTOFT T F. 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 [J]. *Cancer Res*, 2004, **64**(15): 5245 – 5250.
- [3] VANDESOMPELE J, de PRETER K, PATTYN F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genome Biol*, 2002, **3**(7): research0034. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research 0034.
- [4] ZHANG Chao, FU Jianxin, WANG Yanjie, *et al.* Glucose supply improves petal coloration and anthocyanin biosynthesis in *Paeonia suffruticosa* ‘Luoyang Hong’ cut flowers [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2015, **101**: 73 – 81.
- [5] BALDERMANN S, KATO M, KUROSAWA M, *et al.* Functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the floral development of *Osmanthus fragrans* Lour. [J]. *British J Pharmacol*, 2010, **61**(11): 2967 – 2977.
- [6] WEI Libin, MIAO Hongmei, ZHAO Ruihong, *et al.* Identification and testing of reference genes for Sesame gene expression analysis by quantitative real-time PCR [J]. *Planta*, 2013, **237**(3): 873 – 889.
- [7] WANG Tao, HAO Ruijie, PAN Huitang, *et al.* Selection of suitable reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Prunus mume* during flowering stages and under different abiotic stress conditions [J]. *J Am Soc Hortic Sci*, 2014, **139**(2): 113 – 122.
- [8] XU Xiaoyong, YANG Zeping, SUN Xilu, *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR during flower bud development in CMS7311 of heading Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) [J]. *Acta Physiol Plant*, 2014, **36**(3): 809 – 814.
- [9] THELLIN O, ZORZI W, LAKAYE B, *et al.* Housekeeping genes as internal standards: use and limits [J]. *J Biotechnol*, 1999, **75**(2/3): 291 – 295.
- [10] THELLIN O, ELMOUALIJ B, HEINEN E, *et al.* A decade of improvements in quantification of gene expression and internal standard selection [J]. *Biotechnol Adv*, 2009, **27**(4): 323 – 333.
- [11] GUÉNIN S, MAURIAT M, PELLOUX J, *et al.* Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references [J]. *J Exp Bot*, 2009, **60**(2): 487 – 493.
- [12] MUKESH J, AASHIMA N, TYAGI A K, *et al.* Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **345**(2): 646 – 651.
- [13] ZHANG Chao, FU Jianxin, WANG Yiguang, *et al.* Identification of suitable reference genes for gene expression normalization in the quantitative real-time PCR analysis of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans* Lour.) [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(8): e0136355. doi: 10.1371/journal.pone.0136355.
- [14] PFAFFL M W, TICHOPAD A, PRGOMET C, *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**(6): 509 – 515.
- [15] ARTICO S, NARDELI S M, BRILHANTE O, *et al.* Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, **10**(1): 1 – 12.
- [16] KONG Qiusheng, YUAN Jingxian, GAO Lingyun, *et al.* Identification of suitable reference genes for gene expression normalization in qRT-PCR analysis in watermelon [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(2): e90612. doi: 10.1371/journal.pone.0090612.
- [17] ZHONG Haiying, CHEN Jianwen, LI Caiqin, *et al.* Selection of reliable reference genes for expression studies by reverse transcription quantitative real-time PCR in litchi under different experimental conditions [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, **30**(4): 641 – 653.
- [18] 周良云, 莫歌, 王升, 等. 基于实时荧光定量 PCR 对镉处理下黄花蒿内参基因稳定性的分析[J]. 中国中药杂志, 2014, **39**(5): 777 – 784.

- ZHOU Liangyun, MO Ge, WANG Sheng, *et al.* Stability analysis of reference gene based on real-time PCR in *Artemisia annua* under cadmium treatment [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 2014, **39**(5): 777 – 784.
- [19] 成龙平, 胡海涛, 郭卫东, 等. 牛奶子实时定量 PCR 分析中内参基因的评价与验证[J]. 林业科学, 2015, **51**(5): 135 – 144.
- CHENG Longping, HU Haitao, GUO Weidong, *et al.* Evaluation and validation of potential reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Elaeagnus umbellata* [J]. *Sci Silv Sin*, 2015, **51**(5): 135 – 144.
- [20] REID K E, OLSSON N, SCHLOSSER J, *et al.* An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development [J]. *BMC Plant Biol*, 2006, **6**(1): 27. doi: 10.1186/1471-2229-6-27.
- [21] MIGOCKA M, PAPIERNIAK A. Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators [J]. *Mol Breed*, 2011, **28**(3): 343 – 357.
- [22] CICIARELLO M, MANGIACASALE R, LAVIA P. Spatial control of mitosis by the GTPase Ran [J]. *Cell Mol Life Sci Cmls*, 2007, **64**(15): 1891 – 1914.
- [23] DI FIORE B, CICIARELLO M, LAVIA P. Mitotic functions of the Ran GTPase network: the importance of being in the right place at the right time [J]. *Cell Cycle*, 2004, **3**(3): 303 – 311.
- [24] XU Peipei, CAI Weiming. *RAN1* is involved in plant cold resistance and development in rice (*Oryza sativa*) [J]. *J Exp Bot*, 2014, **65**(12): 3277 – 3287.
- [25] DELGADO-BENARROCH L, CAUSIER B, WEISS J, *et al.* FORMOSA controls cell division and expansion during floral development in *Antirrhinum majus* [J]. *Planta*, 2009, **229**(6): 1219 – 1229.
- [26] MELANIE B, HURT S, KURT F, *et al.* Characterization of *Antirrhinum* petal development and identification of target genes of the class B MADS box gene DEFICIENS [J]. *Plant Cell*, 2004, **16**(12): 3197 – 3215.
- [27] MALLONA I, LISCHESKI S, WEISS J, *et al.* Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida* [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, **10**(1): 200 – 203.
- [28] REMANS T, SMEETS K K, MATHIJSEN D, *et al.* Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations [J]. *Planta*, 2008, **227**(6): 1343 – 1349.
- [29] SWIEZEWSKI S, LIU Fuqian, MAGUSIN A, *et al.* Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* polycomb target [J]. *Nature*, 2009, **462**(7274): 799 – 802.
- [30] DEKKERS B J W, LEO W, BASSEL G W, *et al.* Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Arabidopsis* and tomato seeds [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, **53**(1): 28 – 37.
- [31] KLIE M, DEBENER T. Identification of superior reference genes for data normalisation of expression studies via quantitative PCR in hybrid roses (*Rosa hybrida*) [J]. *BMC Res Not*, 2011, **4**(1): 518. doi:10.1186/1756-0500-4-518.
- [32] CHANG Ermei, SHI Shengqing, LIU Jianfeng, *et al.* Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) using real-time PCR [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(3): e33278. doi: 10.1371/journal.pone.0033278.
- [33] YANG Yanfang, HOU Shuang, CUI Guanghong, *et al.* Characterization of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in various tissues of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, **37**(1): 507 – 513.
- [34] 王彦杰, 董丽, 张超, 等. 牡丹实时定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. 农业生物技术学报, 2012, **20**(5): 521 – 528.
- WANG Yanjie, DONG Li, ZHANG Chao, *et al.* Reference gene selection for real-time quantitative PCR normalization in tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. *J Agric Biotechnol*, 2012, **20**(5): 521 – 528.