

山麦冬果实花青素生物合成中内参基因的筛选与验证

干思宸, 师悦, 梁立军

(浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】为山麦冬 *Liriope spicata* 果实花青素生物合成研究筛选最佳内参基因。【方法】基于山麦冬转录数据, 通过变异系数以及变化倍数初步筛选出山麦冬 15 个候选内参基因。以幼果期和成熟期山麦冬果实为材料, 利用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 技术测定候选内参基因的表达, 采用 ΔC_t 值法、geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 等软件包分析候选基因的表达稳定性, 最后选取来自 6 个基因家族 (*C4H*、*CHS*、*MT*、*UFGT*、*MYB* 和 *bHLH*) 的 10 个目的基因 (*C4H*、*CHS-1*、*CHS-2*、*MT*、*UFGT-1*、*UFGT-2*、*MYB-1*、*MYB-2*、*MYB-3*、*bHLH*), 对所选内参基因组合进行验证。

【结果】4 种方法分析得出的候选内参排序存在一定差异, 需综合 4 种方法的几何平均值作为综合排序。根据 geNorm 软件推荐的最适内参数目为 4 个, 即 *CNNM*、*GPR107*、*EF1- α* 、*G6PD-2* 最稳定, *PDP* 最不稳定。对 10 个目的基因表达量标准化验证发现: 以 *CNNM*、*GPR107* 为内参组合与选用 4 个基因作为内参组合无显著差异, 相关系数可达 0.999 9, 且选用双内参组合比 4 个内参组合的可操作性强, 而不适合的内参基因 (*PDP*) 会对 RT-qPCR 结果产生严重偏差。【结论】以 *CNNM*、*GPR107* 作为组合是山麦冬果实花青素生物合成研究的最佳内参基因。图 6 表 5 参 39

关键词: 山麦冬; 实时定量 PCR; 花青素合成; 内参基因

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2022)02-0307-11

Selection and validation of reference genes for anthocyanin biosynthesis in *Liriope spicata* fruits

GAN Sichen, SHI Yue, LIANG Lijun

(College of Landscape and Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The objective is to screen the best reference genes (RGs) for the study of anthocyanin biosynthesis in *Liriope spicata* fruits. [Method] Based on the transcriptome sequence data (unpublished), 15 candidate RGs were selected according to the coefficient of variation and fold change value of gene expression. The expression levels of candidate RGs were determined by RT-qPCR in *L. spicata* young and mature fruits. The expression stability of these genes was evaluated using software packages and algorithms including ΔC_t , geNorm, NormFinder and Bestkeeper. Finally, 10 target genes (*C4H*, *CHS-1*, *CHS-2*, *MT*, *UFGT-1*, *UFGT-2*, *MYB-1*, *MYB-2*, *MYB-3*, *bHLH*) from 6 gene families (*C4H*, *CHS*, *MT*, *UFGT*, *MYB*, and *bHLH*) were screened to verify the selected reference gene combinations. [Result] There was difference in the ranking of candidate RGs obtained by the 4 methods, so the geometric mean of the 4 methods was used as the comprehensive ranking. Based on geNorm, there were 4 recommended optimal internal parameters, namely *CNNM*, *GPR107*, *EF1- α* and *G6PD-2*, which were the most stable, while *PDP* was the most unstable. The standardization verification of the expression levels of 10 target genes showed that there was no significant

收稿日期: 2021-04-29; 修回日期: 2021-11-30

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LQ19C160012)

作者简介: 干思宸 (ORCID: 0000-0002-8134-4811), 从事园林植物开发与应用研究。E-mail: 269754913@qq.com。

通信作者: 梁立军 (ORCID: 0000-0001-9641-5910), 副教授, 博士, 从事园林植物开发与应用研究。

E-mail: llj@zafu.edu.cn

difference between *CNNM* and *GPR107* as RGs combination and 4 genes as RGs combination, and the correlation coefficient reached 0.999 9. It was more feasible to select the dual RGs combination than 4 RGs combination, while unsuitable RGs (*PDP*) would cause serious deviation to RT-qPCR results. [Conclusion] The combination of *CNNM* and *GPR107* is the best reference gene for anthocyanin biosynthesis in *L. spicata* fruit. [Ch, 6 fig. 5 tab. 39 ref.]

Key words: *Liriope spicata*; quantitative real-time PCR (RT-qPCR); anthocyanin biosynthesis; reference gene

山麦冬 *Liriope spicata* 为百合科 Liliaceae 多年生草本植物, 在园林绿化中多栽培于林下或林缘半阴处, 掩饰裸露土壤, 起到补充绿地改善不良景观的作用。山麦冬属 *Liriope* 植物只有 8 种, 中国栽培 6 种, 其中包含 3 个特有种, 但山麦冬属植物分布广泛, 除极寒地区及高海拔地区外, 中国各省均有分布, 其地理分布受人为栽培引种因素影响很大, 没有特定的地理分布规律^[1]。山麦冬成熟时果实表皮由绿转黑, 9 月结果后观果时期可长达整个冬季, 且其花葶较长多矗立于叶子的上方, 易于观察, 具有很高的园林应用价值。目前, 针对山麦冬成熟过程中呈色物质及调控基因尚未报道, 但花青素合成途径在植物中是保守的, 合成途径中上游合成基因是决定植物组织能否积累花青素的关键^[2], 而下游修饰基因的表达常与花青素的积累一致, 是加深果色花色的关键基因^[3-5]。此外, 花青素的积累还受转录因子的调控, 其中以 MYB 转录因子与 bHLH 转录因子最为常见^[6]。

用于基因表达定量分析的方法比较多, 其中实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 由于定量准确、成本低且高通量, 被广泛应用于基因表达水平研究。但其结果常受 RNA 质量、反转录效率、引物特异性、初始样品量及扩增效率等因素的影响^[7-8], 需要引入 1 个或多个表达稳定的内参基因 (reference genes, RGs) 来评估目的基因的相对表达^[9]。在植物学研究中, 曾以肌动蛋白 (*actin*, *ACT*)^[10-12]、组蛋白 (*histone*)^[11]、蛋白磷酸酶 (*protein phosphatase*, *PP2A*)^[13]、甘油醛-3-磷酸-脱氢酶 (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *GAPDH*)^[12]、泛素结合酶 (*ubiquitin conjugating enzyme*, *UBC*)^[14-15] 以及 18S 核糖体 RNA (18S ribosomal RNA, 18S)^[16] 等基因作为内参基因。但是常见的内参基因也并非适用于任何研究, 且目前还未见山麦冬内参基因的报道。鉴于此, 本研究基于山麦冬转录组数据, 对山麦冬果实发育中稳定表达的内参基因进行研究, 为提高果色转变关键基因 RT-qPCR 分析的准确性提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

在浙江农林大学资源圃, 选取生长环境相同, 且植株生长状况良好、长势整齐的山麦冬, 随机均匀采集 15~20 株山麦冬植株的各一簇花葶的上、中、下部分果实, 基于山麦冬果实生长特性, 采集山麦冬幼果期 (2020 年 9 月) 及成熟期 (2020 年 11 月) 2 个时期样品, 果实从花葶中取下后立即存于 -80 °C 冰箱备用。设置 3 次生物学重复。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

使用天根离心柱型 RNA 试剂盒 (天根生物科技有限公司) 从每个时期样本中提取总 RNA。采用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。总 RNA 的纯度和质量浓度采用 NanoDrop ONE 微量核酸蛋白浓度测定仪 (Therm, 美国) 测定。总 RNA 样本质量浓度均高于 $4 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上, 总 RNA 纯度 $[D(260)/D(280)]$ 为 1.9~2.1。cDNA 的合成使用 PrimerScript™ RT Master Mix cDNA (Perfect Real Time) 反转录试剂盒, 所有样本总 RNA 加入量按照 $3 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 稀释至同一质量浓度, cDNA 置于 -20 °C 冰箱保存。

1.3 候选内参基因的筛选及 RT-qPCR

基于已获得的山麦冬转录组数据及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 注释, 筛选了多条通路的基因作为内参基因参考库, 包括参与山麦冬果实运输和分解代谢的基因 (*SLC36* 等), 参与代谢过程的基因 (*PP2C*、*MGL*、*PDP*、*G6PD* 等), 参与信号传导与转运的基因 (*AUX*、*GPR107*、*CNNM* 等), 参与细胞过程的基因 (*CFL* 等), 参与植物免疫的基因 (*Trx* 等), 参与遗传信息处理的基因 (*UGT*、*PP2A*、*EF1- α* 等)

共 1 648 个，参考前人对内参基因的筛选阈值稍作修改后^[11-13]，以每千个碱基转录每百万映射读取的片段 (FPKM) 高于 5 的基因 (低表达的难以检测)、变异系数<0.1、变化倍数<0.2 为筛选条件，得到前 15 个候选内参基因 (表 1)。

表 1 山麦冬 15 个候选的内参基因

Table 1 15 candidate reference genes of <i>L. spicata</i>							
基因名	基因注释	变异系数	变化倍数	基因名	基因注释	变异系数	变化倍数
<i>SLC36</i>	solute carrier family 36	0.003	0.001	<i>CFL</i>	cofilin	0.061	0.178
<i>PP2C</i>	protein phosphatase 2C	0.007	0.019	<i>UGT</i>	UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase	0.064	0.184
<i>Trx-1</i>	thioredoxin	0.037	0.107	<i>PP2A</i>	protein phosphatase 2A	0.064	0.185
<i>MGL</i>	monoacylglycerol Lipase	0.043	0.123	<i>EF1-α</i>	elongation factor 1-alpha	0.067	0.193
<i>AUX</i>	auxin influx carrier	0.050	0.144	<i>G6PD-1</i>	glucose-6-phosphate dehydrogenase	0.068	0.197
<i>GPR107</i>	G protein-coupled receptor 107	0.056	0.161	<i>G6PD-2</i>	glucose-6-phosphate dehydrogenase	0.045	0.130
<i>PDP</i>	pyruvate dehydrogenase phosphatase	0.058	0.169	<i>Trx-2</i>	thioredoxin 1	0.065	0.186
<i>CNNM</i>	cation transport mediators	0.061	0.177				

根据转录组获得的核酸序列信息，利用 primer 5 软件设计引物，并交由杭州有康生物技术有限公司合成 (表 2)。利用 TB Green 染料 (Takara) 预反应，体积 20 μL，并使用 LightCycler® 480 II 型荧光定量 PCR 仪 (罗氏，瑞士) 进行 RT-qPCR。反应程序：95 ℃ 预变性 5 min；95 ℃ 变性 10 s；60 ℃ 退火延伸 30 s，40 个循环。实验设置 3 次生物学重复。扩增效率 (cDNA 稀释浓度梯度为 5⁻¹、5⁻²、5⁻³、5⁻⁴、5⁻⁵) 计算公式为 $E=[10^{-(1/K)}-1] \times 100\%$ ，其中： E 为扩增效率， K 为斜率。15 个候选内参基因的扩增效率为 91.7%~108.0%(表 2)。

表 2 15 个候选内参基因的引物序列和扩增子特征

Table 2 Primer sequences and amplicon characteristics of 15 candidate reference genes					
基因名	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')	产物长度/bp	扩增效率/%	相关系数
<i>SLC36</i>	GTAAGTTTCGCCGAGTGCTT	ACTGCAGTAGCAGACCAGTT	148	91.7	0.982
<i>PP2C</i>	TGGGCCATGATGTTCCAGAT	AGTACACGCAGTCTTCACCT	77	94.8	0.999
<i>Trx-1</i>	TTGTTGGCACCCACAAGTTT	CATTCGTGCCACTCCAACAT	72	102.0	0.999
<i>MGL</i>	AATGCCTTCACTGGAACAGC	GCCGCCAAGTGAGTAAACAA	138	101.0	0.994
<i>AUX</i>	TGCAGAGAAACCACCTTCT	CCGAATCCAAATCCGACCAC	99	91.7	0.949
<i>GPR107</i>	ACAGGTGATTGCGAACATCG	CTTCGACGTCTCCTTCAACG	166	105.0	0.906
<i>PDP</i>	GACGGAGGTCGGTTGGATTT	CTGCACATGCATCATCACGA	124	96.2	0.976
<i>CNNM</i>	GCTGCTAACTCCAGCTTC	GGCACAACGTGTGGTCAACAT	86	96.8	0.999
<i>CFL</i>	CGAGGAGAACTGCCAGAAGA	GTTGGATCGGTCGCTTGTAG	153	107.0	0.992
<i>UGT</i>	TGGAAGCATCCTCACTTGACT	TGTCTTCAAATTAGGGTTAGCGA	83	93.5	0.994
<i>PP2A</i>	GAGTCGGAGAGGTCGAAGAG	GCGGAGCAATTCCTACCATC	121	99.2	0.975
<i>EF1-α</i>	CAAGCGTCCCACTGACAAG	CCAGGCTTGAGGATACCAGT	111	101.0	0.998
<i>G6PD-1</i>	GATGCAACAGGCCAGAAGAG	AGTGCAAACAGTGCAGGAAA	104	97.9	0.996
<i>G6PD-2</i>	ATAACGTTGCCCTCTCCACA	ATCCAAC TGCAATCCAAGCC	107	108.0	0.999
<i>Trx-2</i>	GTGGTGCACCGTCAGTAAAC	CGCTGTGGTTGATGTCTCTG	113	96.0	0.992

1.4 内参基因的稳定性分析及验证

通过 4 种方法分析内参基因的稳定性：ΔC_t 值法^[17]、geNorm^[18]、NormFinder^[19] 和 BestKeeper^[20]。利用 Excel 2010 计算 4 种方法对候选内参基因几何平均数的排名，综合筛选最适的内参基因。同时根据前期转录组数据筛选了 10 种目的基因，涵盖花青素合成通路上下游基因以及调控基因。这 10 种基因在转录组数据加权共表达分析中属于中枢基因，表达量高、与花青素相关性强，且在果实成熟过程中显著上调。目的基因包括 *C4H*、*CHS*、*MT*、*UFGT*、*MYB*、*bHLH*，上述基因引物序列及扩增子特征见表 3，最

表 3 10 个目的基因的引物序列和扩增子特征

Table 3 Primer sequences and amplicon characteristics of 10 target genes

基因名	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')	产物长度/bp	扩增效率/%	相关系数
<i>C4H</i>	TCTTTGATCACGGCTTGCAG	ATGAGATCGACACCGTCCTC	88	109.0	0.992
<i>CHS-1</i>	TGCATTGCACCAGTAGTAGC	GCCCTCCTGATCTCCTCAAC	122	104.0	0.995
<i>CHS-2</i>	TTGTTGGCACCCACAAGTTT	CATTCGTGCCACTCCAACAT	82	91.7	0.997
<i>MT</i>	CCACCGAGAGCAAGAACAAC	GGGTACACACTGGTCTCCAA	112	96.2	0.999
<i>UGFT-1</i>	AGCAAGGTGTGTAAGGAGGA	AAATTCCGAACCGAGCTTCC	110	91.7	0.935
<i>UGFT-2</i>	CGACGGATCCCATTCGACTA	CGCCGCTCCTCTATTAAC	57	92.9	0.996
<i>MYB-1</i>	GCAAGATCAGGTCCTCCTCA	CAAAGTACGTGGCGAAGGAG	162	107.0	0.975
<i>MYB-2</i>	ATGGGAAGATGGTGGCCTTT	GAAGGGTGCACAGCTTCAG	70	91.7	0.986
<i>MYB-3</i>	CGAGGAGAACTGCCAGAAGA	GGTGCTTGTTGAGAGAGCTG	172	105.0	0.996
<i>bHLH</i>	TGCTTAGCAATGGCAACAGG	GGCTGCTGACCAGAAGATTG	123	101.0	0.998

后利用 SPSS 19.0 与 Graphpad Prism 8.0 分析及作图。

2 结果与分析

2.1 山麦冬候选内参基因的表达量分析

15 个候选内参基因的溶解曲线均为单一峰(图 1)，琼脂糖凝胶电泳检测后出现与预期大小一致的单

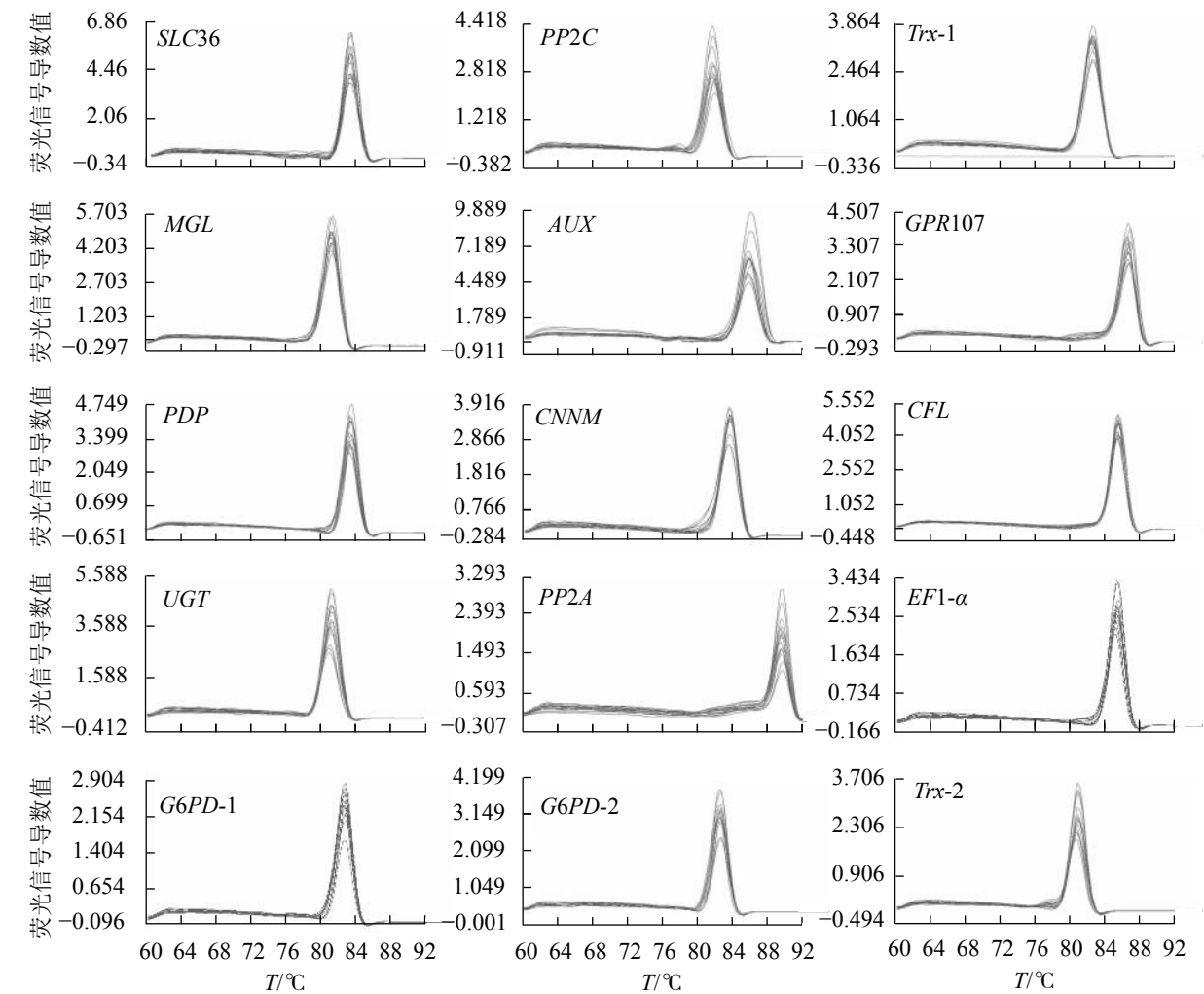


图 1 15 个候选内参基因的溶解曲线
Figure 1 Melting curves of fifteen reference genes

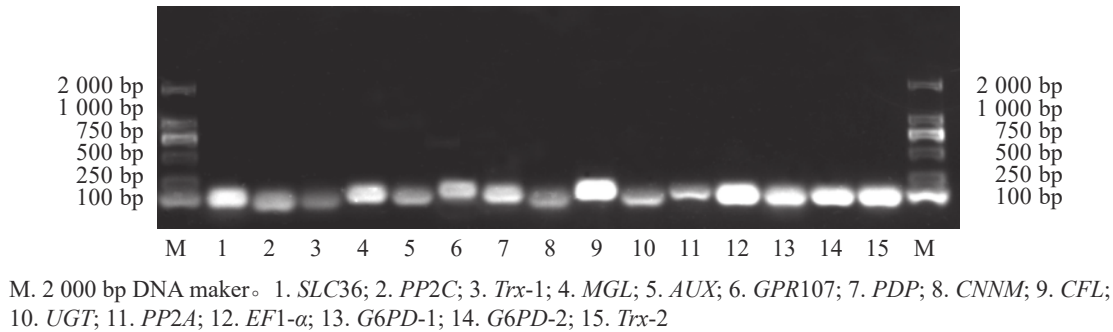


图 2 15 个候选内参基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of the PCR products of the fifteen reference genes

一条带(图 2)。该结果表明引物具有良好的特异性。

根据原始循环阈值 (C_t) 分布发现：所有候选内参基因的 C_t 为 15.53~28.81， C_t 越高，基因的表达量越低，反之表达量越高。本研究中，*EF1- α* 基因表达量最高，*PP2C* 基因表达量最低，其余基因表达量介于两者之间。此外，由箱线图(图 3)跨度可初步判定内参基因的稳定性。*PP2C*、*Trx-1*、*AUX*、*PP2A*、*PDP* 基因的 C_t 跨度广，不稳定，而 *GPR107*、*CNNM*、*EF1- α* 、*G6PD-2*、*Trx-2* 基因最为稳定，其中 *GPR107*、*CNNM*、*G6PD-2* 基因的 C_t 中位数与平均数接近，即上述基因相对表达量离散程度低，表达更稳定。然而对原始 C_t 分析内参基因稳定性的不足，还需引入其他的方法。

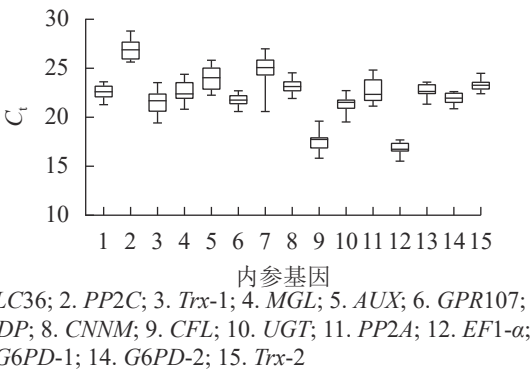


图 3 15 个候选内参基因的 C_t

Figure 3 C_t values of the 15 candidate reference genes

2.2 内参基因的稳定性分析

利用 ΔC_t 法、geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 对 15 个候选内参基因的稳定性进行分析(表 4)。

ΔC_t 法是在原始 C_t 值的基础上，计算每个基因所有样本与其他基因的 C_t 值之差，并计算其标准

表 4 4 种方法评价 15 个候选内参基因表达的稳定性

Table 4 Expression stability of 15 candidate reference genes evaluated by 4 methods

内参基因	ΔC_t	geNorm	NormFinder		Beatkeeper	
	标准差	基因平均表达值	基因稳定值	标准差	变异系数	相关系数
<i>SLC36</i>	2.632	0.854	0.173	0.569	2.523	0.671
<i>PP2C</i>	2.321	0.927	0.416	0.828	3.070	0.824
<i>Trx-1</i>	2.663	1.130	0.510	0.852	3.964	0.832
<i>MGL</i>	2.673	1.007	0.493	0.885	3.918	0.918
<i>AUX</i>	2.652	1.094	0.598	1.063	4.430	0.882
<i>GPR107</i>	2.617	0.817	0.167	0.489	2.253	0.728
<i>PDP</i>	2.737	1.390	0.831	0.642	2.571	0.462
<i>CNNM</i>	2.615	0.847	0.157	0.468	2.015	0.721
<i>CFL</i>	2.274	1.094	0.346	0.532	3.038	0.781
<i>UGT</i>	2.613	0.923	0.237	0.517	2.418	0.651
<i>PP2A</i>	2.693	1.054	0.568	1.057	4.671	0.511
<i>EF1-α</i>	2.127	0.895	0.286	0.393	2.347	0.687
<i>G6PD-1</i>	2.763	1.204	0.692	0.469	2.065	0.009
<i>G6PD-2</i>	2.636	0.880	0.334	0.290	1.323	0.750
<i>Trx-2</i>	2.663	0.989	0.465	0.417	1.790	0.487

差。一般平均标准差越低,基因稳定性越高。该方法中,*EF1- α* 、*PP2C*、*CFL*、*CNNM*是山麦冬果实发育阶段最稳定的内参基因;*PDP*、*G6PD-1*、*PP2A*是最不稳定的内参基因。

geNorm 软件通过平均表达值来描述候选内参基因的稳定性,同时还能计算归一化因子之间的两两变异 ($V_{n/n+1}$, 其中 n 为可使 RT-qPCR 结果准确的最少基因数目)。该方法中,所有基因的平均表达值都在 1.5 以下(稳定内参基因的临界值),即该方法判定下的所有基因都可作为内参基因,其中 *GPR107* (0.817) 与 *CNNM* (0.847) 基因的平均表达值最低,说明最稳定。同时 *PDP*、*G6PD-1* 基因的平均表达值最高,分别为 1.390、1.204,最不稳定,这与 ΔC_t 法判定结果一致。此外,利用 geNorm 计算 2 个归一化基因的 $V_{n/n+1}$, 确定适合量果实生长过程的最优内参基因数目。geNorm 首先计算 2 个最稳定的候选内参基因的归一化因子值,然后将剩余候选内参基因按其表达稳定性下降的顺序依次相加。如果基因之间的 $V_{n/n+1}$ 大于或等于 0.15, 则进行 RT-qPCR 分析时应该再添加 1 个基因才能达到可靠的结果,一旦 $V_{n/n+1}$ 低于 0.15, 就不需要添加额外的基因^[21]。由图 4 可见:从 $V_{4/5}$ 开始 $V_{n/n+1}$ 小于 0.15, 即需要使用 4 个内参基因才能得到可靠的 RT-qPCR 结果。

NormFinder 软件可分析候选内参基因的两两变异性,其中稳定值越小,候选内参基因越稳定。*CNNM* 与 *GPR107* 基因的稳定性最小,分别为 0.157、0.167, 即 *CNNM* 与 *GPR107* 基因最稳定,这与 geNorm 分析结果一致;此外,对最差的内参基因评价也与上述 2 种方法一致:*PDP*、*G6PD-1*、*AUX* 是量果实发育阶段最不适合的内参基因。

Bestkeeper 与 geNorm、NormFinder 软件不同,需导入原始 C_t 值平均数,计算候选内参基因在所有样品中的标准差、变异系数、相关系数。一般地,稳定的内参基因拥有低的标准差、变异系数及高的相关系数。在 Bestkeeper 评价中,与 geNorm、NormFinder 分析结果一致,*CNNM* 与 *PDP* 基因分别还是最稳定与最不稳定的内参基因。除此之外,还发现 *G6PD-2* 为该方法中最稳定的内参基因,其标准差与变异系数最低,分别为 0.290、1.323,相关系数为 0.750。

最后通过几何平均数对这 4 种方法的分析结果进行综合性排序(表 5)。根据表 5 的排名与 geNorm 推荐的内参基因数目,筛选 *CNNM*、*GPR107*、*EF1- α* 、*G6PD-2* 作为标准化山麦冬果实 RT-qPCR 的最优内参组合,*PDP* 为最差内参基因,通过 4 种算法得出的结果也与最初候选内参基因原始 C_t 值分布箱线图分析结果一致。

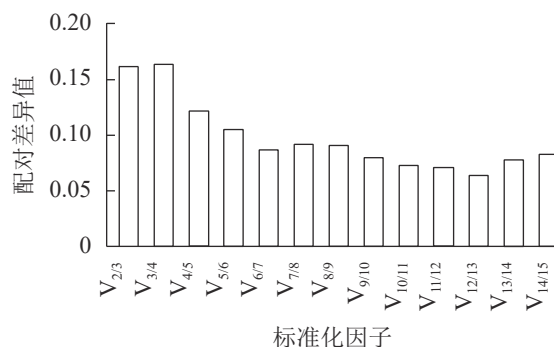


图 4 精确归一化的最佳内参基因数量

Figure 4 Optimal number of control genes for accurate normalization

表 5 15 个候选内参基因的综合排名

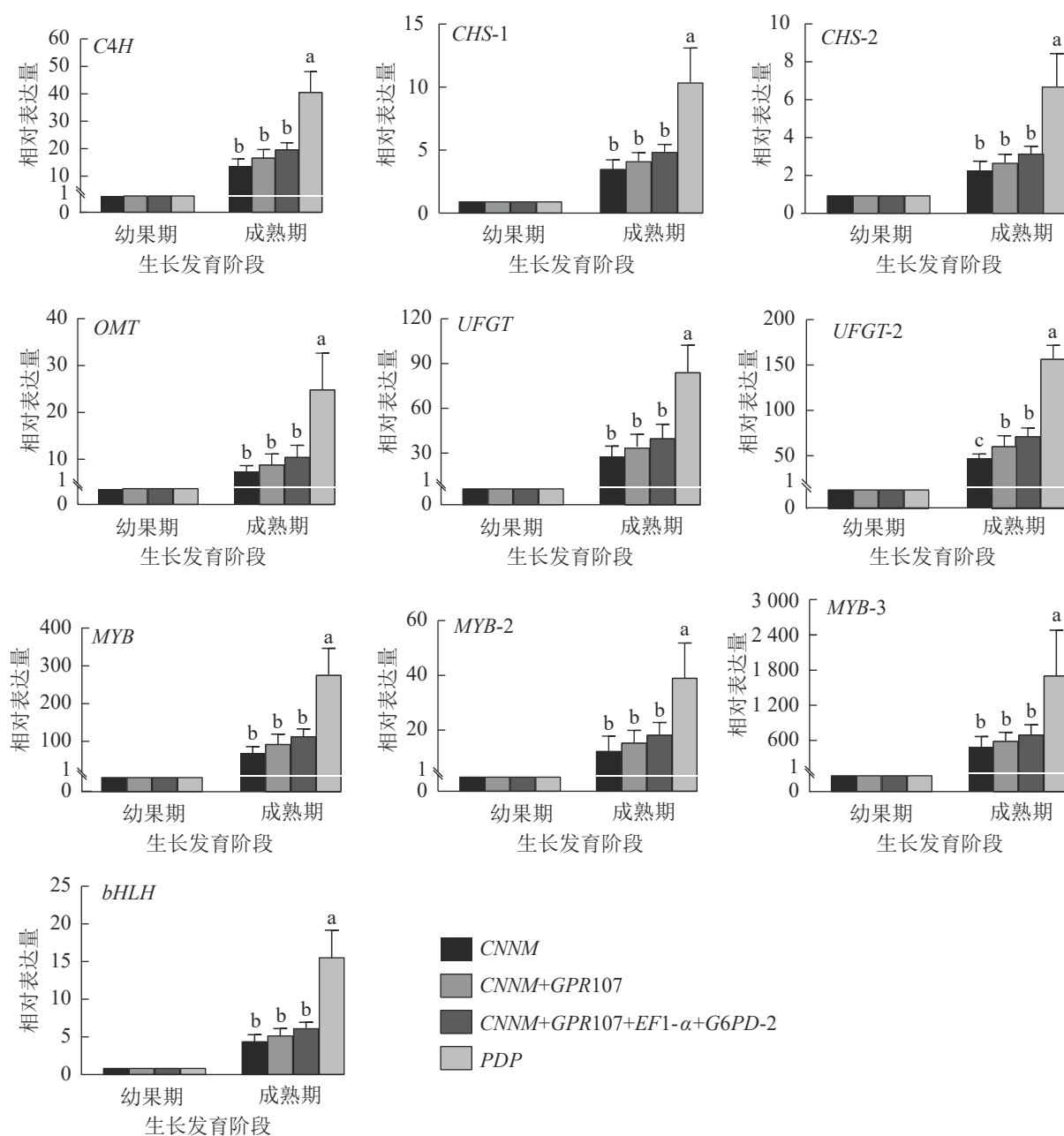
Table 5 Comprehensive ranking of reference genes for normalization

基因名	几何平均数	排名	基因名	几何平均数	排名
<i>CNNM</i>	2.340	1	<i>PP2C</i>	6.557	9
<i>GPR107</i>	2.913	2	<i>MGL</i>	8.572	10
<i>EF1-α</i>	3.162	3	<i>AUX</i>	10.602	11
<i>G6PD-2</i>	3.722	4	<i>Trx-1</i>	11.199	12
<i>SLC36</i>	5.350	5	<i>G6PD-1</i>	11.977	13
<i>UGT</i>	5.826	6	<i>PP2A</i>	12.368	14
<i>CFL</i>	5.925	7	<i>PDP</i>	14.491	15
<i>Trx-2</i>	6.160	8			

2.3 内参基因稳定性的验证

为验证内参基因的有效性,选择 10 种花青素合成结构基因与调控基因作为目的基因。用单一内参基因:最优内参(*CNNM*)、最差内参(*PDP*),及 2 种内参组合:排名前 2 位的内参基因(*CNNM*、*GPR107*)和排名前 4 位的内参基因(*CNNM*、*GPR107*、*EF1- α* 、*G6PD-2*)进行归一化。从图 5 可见:在山

麦冬果实花青素合成过程中,使用 4 种内参方式归一化时,所有的目的基因都上调表达,但变化倍数稍有不同。在山麦冬果实成熟期,使用 *PDP* 基因作为内参时,所有目的基因相对表达量均显著高于其他 3 类,特别是对转录因子 *bHLH* 基因的量化时产生严重偏差,使用 *PDP* 基因与 *CNNM*+*GPR107*+*EF1- α* +*G6PD-2* 基因组合作为内参, *bHLH* 基因的相对表达量分别为 6.28 与 15.70,两者差异高达 2.5 倍。然而,当使用最优内参基因 *CNNM* 进行标准化时,除 *UFGT* 基因外, *CNNM*、*GPR107*、*EF1- α* 、*G6PD-2* 内参组合无显著差异,使用 *CNNM* 基因标准化时, *UFGT* 相较幼果期上调表达 50.71 倍,使用 4 种内参组合时, *UFGT* 上调 72.49 倍。此外,本研究还分析了候选内参排名前 2 位的基因 (*CNNM*、*GPR107*) 作为目的基因的表达式,发现选用 2 种内参基因与 *geNorm* 软件推荐使用 4 种内参基因,在 10 个目的基因中均无显著差异。



不同小写字母表示同一时期不同组合差异显著 ($P < 0.05$)

图 5 不同内参基因归一化后 10 个目的基因的相对表达量

Figure 5 Relative expression levels of ten target genes after normalized by different reference genes

从图 6 可见:利用最差内参 *PDP* 得到的目的基因表达量与 4 种内参基因组合得到的目的基因表达量相关系数为 0.868 6 ($P < 0.01$),当使用最优基因 *CNNM* 作为内参时,与 4 种内参组合相关系数可达

0.991 6 ($P < 0.01$)。对 2 种内参组合与 geNorm 推荐的 4 个数目内参组合比较发现：通过这 2 种方法标准化得到的目的基因相关性可达 0.999 9 ($P < 0.01$)，即仅使用 *CNNM*、*GPR107* 基因作为双内参也可达到 geNorm 软件推荐的 4 个内参数目组合的效果。

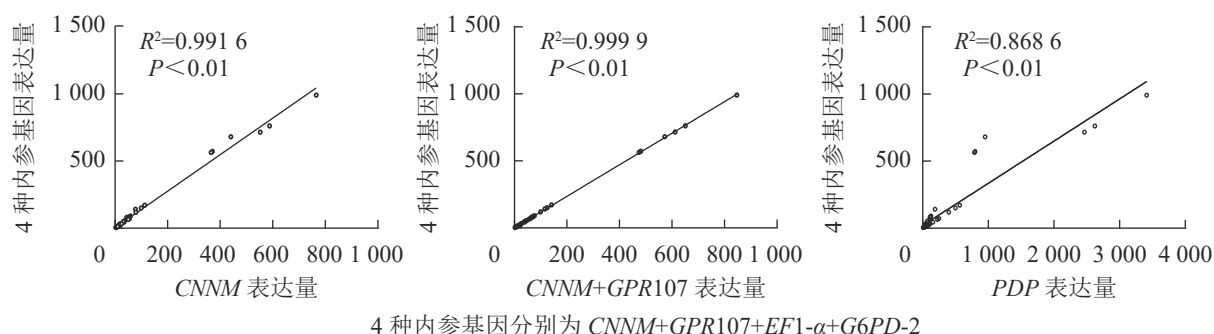


图 6 不同内参基因标准化后 10 种目的基因表达量的相关性分析

Figure 6 Correlation analysis for relative expression levels of ten target genes after normalized by different reference genes

3 讨论

山麦冬作为一种优良的地被园林植物及药用植物，研究多集中于提高栽培技术及块茎产量，而针对园林观赏应用的研究较少。在本研究之前没有山麦冬内参的研究报道，作为沿阶草族植物，其近源种也仅有麦冬 *Ophiopogon japonicus* 抗逆性研究中曾以微管蛋白基因 (*tubulin*)^[22] 及 *Actin*^[23] 作为参考基因。但这 2 类基因在前期转录组筛选中由于变异系数及变化倍数在候选内参中就已经被排除。本研究根据几何平均数的综合排名，推荐使用内参基因 *CNNM*、*GPR107*、*EF1-α*、*G6PD-2* 作为研究山麦冬花青素合成的最优内参组合。*EF1-α*、*G6PD-2* 属于常见的内参基因，在植物生长发育、抗逆反应、代谢合成中已被广泛应用^[24-25]。基于前期转录组数据，新型内参基因 *CNNM*、*GPR107* 也可作为 RT-qPCR 分析的内参基因，*CNNM* 编码过渡金属转运蛋白，可参与多种金属吸收、排除及区分化^[26]，*GPR107* 编码 G 蛋白偶联受体 107，广泛存在于细胞表面的膜蛋白，可参与植物体多种细胞信号转导及调控机制保守^[27]。上述 2 种基因在山麦冬果实中表达稳定，其相对表达量平均值与中位数相近，离散程度低，且表达量适中，符合内参基因的标准。在观赏植物中，由于新型内参基因稳定性强于传统内参基因，常被选用标准化目的基因的表达。例如，在异型花柱连翘 *Forsythia suspensa* 中，转录组中变化微小的未知基因是研究花开最合适的内参基因^[28]；太行花 *Taihangia rupestris* 花器官有复杂的性别决定机制，鉴定两性花与雄性花的内参基因是编码铁硫簇组装蛋白、3-巯基丙酮酸硫转移酶与跨膜蛋白 50 的新型内参基因^[11]。*SmDnaJ* 基因在旱柳 *Salix matsudana* 各种非生物胁迫下表达最为稳定^[29]。*bHLH* 在观赏百合 *Lilium oriental* × *Trumpet hybrid* 体胚诱导、体胚发育中表达最稳定^[30]，但 *bHLH* 是植物颜色育种中的重要靶基因，并不适合作为本研究的内参基因候选，这也证实了不同目标性状需采用不同的内参基因，没有一种内参基因是普适的。

花青素合成路径在植物中是保守的，其中 MYB 转录因子与 bHLH 转录因子可形成二元复合体，激活花青素合成酶基因^[31-32]。大量研究表明：*MYB*、*bHLH* 转录因子基因与花青素合成酶基因在紫色系植物组织发育过程中协同上调^[3, 33-34]。为验证内参基因的结果，挑选了 10 个在山麦冬花青素合成调控网络的中枢基因 (相关性强且表达量高) 作为验证，其中包括转录因子与结构基因 (*C4H*、*CHS*、*MT*、*UFGT*、*MYB*、*bHLH*)，这 10 种基因在 4 种归一化方法下表达模式均显著上调，但趋势稍有不同，选用较差内参 *PDP* 标准化结果偏差最大，在山麦冬成熟黑果中所有基因都显著高于其他基因。尽管最优内参基因 *CNNM* 对目的基因的归一化可以达到与 4 种内参组合很高的相关系数，但对 *UFGT* 基因的量化存在显著差异，而 *UFGT* 基因作为花青素合成通路的下游修饰，对花青素积累至关重要，特别是在山麦冬这类组织颜色深即富含花青素的类型^[2, 35]，例如在葡萄 *Vitis vinifera* 果皮^[36]、玫瑰 *Rosa rugosa*^[37]、紫皮石刁柏 *Asparagus officinalis*^[33] 中 *UFGT* 都被验证为关键基因，因此仅选用单一基因作为研究山麦冬果皮花青素积累的内参是不合适的，继而在 *CNNM* 基因基础上又引入 *GPR107* 来规避单内参基因的误差，该内参组合与 geNorm 推荐的内参组合相关系数最高，在 10 种目的基因的验证结果中与 4 种内参组合均无显著差

异, 且选用双内参组合比 4 种内参组合可操作性强, 因此判定使用 *CNNM*、*GPR107* 作为双内参即可得到可靠的 RT-qPCR 结果。双内参组合联合使用可以减少实验因素对基因表达的影响, 且结果更为准确。暴露于 UV-B 辐射下的番茄 *Lycopersicon esculentum* 幼苗不同组织都应选用特定的内参组合, 例如叶中选用肌动蛋白基因与微管蛋白基因, 而根中选用微管蛋白与 UV-B 抗性位点基因更加适合^[38]; *UBQ* 和 *EF1- α* 基因由于表达稳定, 可作为内参基因用于鹅掌草 *Anemone flaccida* 各器官的不同发育阶段^[39]。

4 结论

本研究基于转录组数据筛选了 15 个候选内参基因, 分析其在山麦冬果实不同时期的表达稳定性。经过 10 种目的基因验证后, 表明以 *CNNM*、*GPR107* 基因作为组合是山麦冬果实花青素生物合成研究的最佳内参基因, 而常用的内参基因却并不适用于本研究, 这为筛选新型内参基因提供了新思路。

5 参考文献

- [1] 王广艳, 杨永平. 天门冬科沿阶草族植物的系统学研究进展[J]. 植物分类与资源学报, 2015, 37(4): 365–375.
WANG Guangyan, YANG Yongping. Advances in the study of the systematics of Ophiopogoneae in Asparagaceae [J]. *Plant Diversity Resour*, 2015, 37(4): 365–375.
- [2] LIU Ying, TIKUNOV Y, SCHOUTEN R E, *et al.* Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in solanaceous vegetables: a review [J/OL]. *Front Chem*, 2018, 6: 52 [2021-02-18]. doi: 10.3389/fchem.2018.00052.
- [3] DEGUCHI A, TATSUZAWA F, MIYOSHI K. A blackish-flowered cultivar of *Catharanthus roseus* accumulates high concentrations of a novel anthocyanin with a unique feature of aggregation in weak acid solutions[J/OL]. *Dyes Pigm*, 2020, 173: 108001 [2021-03-01]. doi: 10.1016/j.dyepig.2019.108001.
- [4] CACERES-MELLA A, TALAVERANO M I, VILLALOBOS-GONZALEZ L, *et al.* Controlled water deficit during ripening affects proanthocyanidin synthesis, concentration and composition in Cabernet Sauvignon grape skins [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2017, 117: 34–41.
- [5] WANG Yuwei, LUAN Guangxiang, ZHOU Wu, *et al.* Subcritical water extraction, UPLC-Triple-TOF/MS analysis and antioxidant activity of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. [J]. *Food Chem*, 2018, 249: 119–126.
- [6] TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A J P J. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. *Plant J*, 2008, 54(4): 733–749.
- [7] HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S A, *et al.* Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations [J]. *Genes Immun*, 2005, 6(4): 279–284.
- [8] DERVEAUX S, VANDESOMPELE J, HELLEMANS J J M. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR [J]. *Methods*, 2010, 50(4): 227–230.
- [9] 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.
- [10] 马璐琳, 崔光芬, 王祥宁, 等. 西南鸢尾花色变异实时定量 PCR 内参基因的筛选与验证[J]. 核农学报, 2019, 33(9): 1707–1716.
MA Lulin, CUI Guangfen, WANG Xiangning, *et al.* Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Iris bulleyana* during flower color variation [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2019, 33(9): 1707–1716.
- [11] LI Weiguo, ZHANG Lihui, ZHANG Yandi, *et al.* Selection and validation of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR normalization in staminate and perfect flowers of *Andromonoecious taihangia rupestris* [J/OL]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 729 [2021-03-19]. doi: 10.3389/fpls.2017.00729.
- [12] WANG Xiaowei, WU Zhijun, BAO Wenqi, *et al.* Identification and evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Polygonum cuspidatum* based on transcriptome data[J/OL]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 498 [2021-04-01]. doi: 10.1186/s12870-019-2108-0.
- [13] LIANG Lijun, HE Zhigui, YU Haizheng, *et al.* Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Codonopsis pilosula* based on transcriptome sequence data [J/OL]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 1362 [2021-03-19]. doi: 10.1038/s41598-020-58328-5.

- [14] LIU Wei, YU Jie, WANG Yifan, *et al.* Selection of suitable internal controls for gene expression normalization in rats with spinal cord injury [J]. *Neural Regen Res*, 2022, **17**(6): 1387 – 1392.
- [15] 马璐琳, 段青, 崔光芬, 等. 钝裂银莲花花色素合成相关基因 qRT-PCR 内参基因的筛选[J]. 园艺学报, 2021, **48**(2): 377 – 388.
- MA Lulin, DUAN Qing, CUI Guangfen, *et al.* Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of the correlated genes in flower pigments biosynthesis pathway of *Anemone obtusiloba* [J]. *Acta Horti Sin*, 2021, **48**(2): 377 – 388.
- [16] 杨坤, 黄超, 卢山, 等. 铜胁迫下紫鸭跖草根组织实时定量 PCR 内参基因的选择[J]. 植物生理学报, 2021, **57**(1): 195 – 204.
- YANG Kun, HUANG Chao, LU Shan, *et al.* Reference gene selection for quantitative real-time PCR in purple setcreasea (*Setcreasea purpurea*) root tissue under copper stress [J]. *Plant Physiol J*, 2021, **57**(1): 195 – 204.
- [17] SILVER N, BEST S, JIANG Jie, *et al.* Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR[J]. *BMC Mol Biol*, 2006, **7**: 33 [2021-04-02]. doi: [10.1186/1471-2199-7-33](https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33).
- [18] 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/OL]. *Genome Biol*, 2002, **3**(7): 34 [2021-03-18]. doi: [10.1186/gb-2002-3-7-research0034](https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034).
- [19] ANDERSEN C L. 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.
- [20] 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.
- [21] STANTON K A, EDGER P P, PUZEY J R, *et al.* A whole-transcriptome approach to evaluating reference genes for quantitative gene expression studies: a case study in *Mimulus* [J]. *G3 Bethesda Md*, 2017, **7**(4): 1085 – 1095.
- [22] 郭天麒. 麦冬 Rubisco 活化酶基因 *OjRCA* 的克隆及功能初步分析[D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- GUO Tianqi. *Cloning and Preliminary Functional Analysis of Rubisco Activase Gene OjRCA of Ophiopogon japonicas* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2011.
- [23] 李聪. 麦冬 *OjERF* 基因的克隆与功能研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
- LI Cong. *Identification and Characterization of Transcription Factor OjERF Gene from Ophiopogon japonicas* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2013.
- [24] ZHENG Tangchun, CHEN Zhilin, JU Yiqian, *et al.* Reference gene selection for qRT-PCR analysis of flower development in *Lagerstroemia indica* and *L. speciosa* [J/OL]. *PLoS One*, 2018, **13**(3): e0195004 [2021-03-20]. doi: [10.1371/journal.pone.0195004](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195004).
- [25] JOSEPH J T, POOLAKKALODY N J, SHAH J M, *et al.* Plant reference genes for development and stress response studies [J]. *J Biosci*, 2018, **43**(1): 173 – 187.
- [26] CHEN Y S, KOZLOV G, FAKIH R, *et al.* Mg²⁺-ATP sensing in CNM, a putative magnesium transporter [J]. *Structure*, 2020, **28**(3): 324 – 335.
- [27] 张哲, 刘方, 宋水山. 植物生长发育过程中 G 蛋白偶联受体的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2014, **30**(18): 23 – 28.
- ZHANG Zhe, LIU Fang, SONG Shuishan, *et al.* The progress of G protein-coupled receptors in plant development [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2014, **30**(18): 23 – 28.
- [28] 曹亚萍, 王勇飞, 贾孟君, 等. 连翘花器官生长阶段内参基因筛选与评估[J]. 山西农业科学, 2020, **48**(3): 298 – 303.
- CAO Yaping, WANG Yongfei, JIA Mengjun, *et al.* Selecting and evaluation of reference genes during flower organ growth phase in *Forsythia suspensa*(Thunb.) Vahl [J]. *J Shanxi Agric Sci*, 2020, **48**(3): 298 – 303.
- [29] ZHANG Yunxing, HAN Xiaojiao, CHEN Shuangshuang, *et al.* Selection of suitable reference genes for quantitative real-time PCR gene expression analysis in *Salix matsudana* under different abiotic stresses [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, **7**: 40290 [2021-04-02]. doi: [10.1038/srep40290](https://doi.org/10.1038/srep40290).
- [30] 陈敏敏, 张茹佳, 查倩, 等. 百合体胚诱导、发育及不同组织实时定量 PCR 内参基因筛选[J]. 分子植物育种, 2018,

- 16(15): 4982 – 4990.
- CHEN Minmin, ZHANG Ruijia, ZHA Qian, *et al.* Induction and development of lily somatic embryo and internal reference genes screening for RT-PCR in different tissues [J]. *Mol Plant Breed*, 2018, **16**(15): 4982 – 4990.
- [31] GU Kaidi, WANG Chukun, HU Dagang, *et al.* How do anthocyanins paint our horticultural products? [J]. *Sci Hort*, 2019, **249**: 257 – 262.
- [32] LI Hanli, YANG Zhen, ZENG Qiwei, *et al.* Abnormal expression of *bHLH3* disrupts a flavonoid homeostasis network, causing differences in pigment composition among mulberry fruits[J/OL]. *Hortic Res*, 2020, **7**: 83[2021-03-25]. doi: [10.1038/s41438-020-0302-8](https://doi.org/10.1038/s41438-020-0302-8).
- [33] DONG Tingting, HAN Rongpeng, YU Jiawen, *et al.* Anthocyanins accumulation and molecular analysis of correlated genes by metabolome and transcriptome in green and purple asparagus (*Asparagus officinalis* L.) [J]. *Food Chem*, 2019, **271**: 18 – 28.
- [34] WANG Ziran, CUI Yuanyuan, VAINSTEIN A, *et al.* Regulation of fig (*Ficus carica* L.)fruit color: metabolomic and transcriptomic analyses of the flavonoid biosynthetic pathway[J/OL]. *Front Plant Sci*, 2017, **271**: 01990[2021-03-26]. doi: [10.3389/fpls.2017.01990](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01990).
- [35] LIU Yuhua, LÜ Junheng, LIU Zhoubin, *et al.* Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals the mechanism of color formation in pepper fruit (*Capsicum annuum* L.) [J/OL]. *Food Chem*, 2020, **306**: 125629[2021-04-10]. doi: [10.1016/j.foodchem.2019.125629](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125629).
- [36] YANG Bohan, HE Shuang, LIU Yuan, *et al.* Transcriptomics integrated with metabolomics reveals the effect of regulated deficit irrigation on anthocyanin biosynthesis in Cabernet Sauvignon grape berries[J/OL]. *Food Chem*, 2020, **314**: 126170[2021-03-25]. doi: [10.1016/j.foodchem.2020.126170](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126170).
- [37] SUI Xiaoming, ZHAO Mingyuan, HAN Xu, *et al.* *RrGT1*, a key gene associated with anthocyanin biosynthesis, was isolated from *Rosa rugosa* and identified via overexpression and VIGS [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2019, **135**: 19 – 29.
- [38] FERNÁNDEZ M B, LUKASZEWICZ G, LAMATTINA L, *et al.* Selection and optimization of reference genes for RT-qPCR normalization: a case study in *Solanum lycopersicum* exposed to UV-B [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2021, **160**: 269 – 280.
- [39] ZHAO Zeyang, ZHOU Hanwen, NIE Zhongnan, *et al.* Appropriate reference genes for RT-qPCR normalization in various organs of *Anemone flaccida* Fr. schmidt at different growing stages[J/OL]. *Genes*, 2021, **12**(3): 459[2021-03-18]. doi: [10.3390/genes12030459](https://doi.org/10.3390/genes12030459).