

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201702014

引文格式: 张俊平, 王英强. 黄花大苞姜花药发育 qRT-PCR 内参基因筛选 [J]. 广西植物, 2018, 38(1): 76–83

ZHANG JP, WANG YQ. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR during anther development of *Caulokaempferia coenobialis* (Zingiberaceae) [J]. *Guihaia*, 2018, 38(1): 76–83

黄花大苞姜花药发育 qRT-PCR 内参基因筛选

张俊平¹, 王英强^{1, 2*}

(1. 华南师范大学 生命科学学院 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631; 2. 华南师范大学 生命科学学院 广州市亚热带生物多样性与环境生物监测重点实验室, 广州 510631)

摘要: qRT-PCR 技术具有定量准确、灵敏度高、重复性好等特点, 被广泛用于基因表达分析。内参基因的稳定性对于准确分析实验结果非常重要。该研究以黄花大苞姜 (*Caulokaempferia coenobialis*) 花粉母细胞时期 (PMC)、四分体时期 (TET)、成熟花粉时期 (MP) 的花药组织为材料, 基于 3 个阶段花药转录组表达谱数据以及常用传统内参基因, 筛选出 *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*)、*Malate dehydrogenase* (*MDH*)、 α -*tubulin3* (*TUA3*)、 β -*tubulin7* (*TUB7*) 和 *Actin6* (*ACT6*) 作为候选内参基因, 进行 qRT-PCR 分析; 并运用 BestKeeper、geNorm 和 Normfinder 软件综合分析 5 个候选内参基因在黄花大苞姜花药发育过程中的表达稳定性。结果表明: *MDH* 和 *TUB7* 的表达最稳定, *ACT6* 的稳定性最差; 分别以 *MDH* 和 *TUB7* 作为内参, 分析 *GBE1* 在黄花大苞姜花药发育中的表达模式, 并与该基因在花药转录组中的表达模式做相关系数分析, 3 种表达模式结果一致, 进一步验证了 *MDH* 和 *TUB7* 的表达稳定性。这说明 *MDH* 和 *TUB7* 适合作为 qRT-PCR 分析黄花大苞姜花药发育过程中相关基因表达模式的内参基因。该研究结果为黄花大苞姜花药发育分子机制相关研究奠定了基础, 也为姜科花药发育相关内参基因的选择提供了参考。

关键词: 黄花大苞姜, 花药, 内参基因, qRT-PCR, BestKeeper, geNorm, Normfinder

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2018)01-0076-08

Selection of reference genes for quantitative real-time PCR during anther development of *Caulokaempferia coenobialis* (Zingiberaceae)

ZHANG Junping¹, WANG Yingqiang^{1, 2*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 2. Guangzhou Key Laboratory of Subtropical Biodiversity and Biomonitoring College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

收稿日期: 2017-03-20

基金项目: 国家自然科学基金委-广东省联合基金重点支持项目 (U1301213); 广东省自然科学基金重点项目 (7117864) [Supported by the Joint Fund of National Science Foundation of China and Guangdong Provincial Government (U1301213); the Key Program of Natural Science Foundation of Guangdong, China (7117864)].

作者简介: 张俊平 (1990-), 女, 河南许昌人, 硕士研究生, 从事生物多样性与保护生物学研究, (E-mail) 1037523597@qq.com。

*通信作者: 王英强, 博士, 教授, 主要从事植物繁殖生态与进化生物学研究, (E-mail) wangyq@scnu.edu.cn。

Abstract: Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) has been widely used in gene expression analysis with quantitative accuracy, high sensitivity and good repeat ability. The stability of the reference genes is very important to accurate analysis of the target genes expression. Anther tissues from pollen mother cells stage (PMC), tetrad stage (TET) and mature pollen stage (MP) of *Caulokaempferia coenobialis* (Zingiberaceae) were used to select reference genes. According to the developing anther transcriptome expression profile data and traditional reference genes reported, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, *Malate dehydrogenase (MDH)*, *alpha tubulin3 (TUA3)*, *beta tubulin7 (TUB7)* and *Actin6 (ACT6)* were selected as candidate reference genes for qRT-PCR analysis. The expression stability of five candidate reference genes during the anther development was comprehensive analysis by BestKeeper, geNorm and Normfinder software. The results showed that the expression of *MDH* and *TUB7* were the most stable, and the *ACT6* was the worst. The expression patterns of *GBE1* during anther development was obtained based on *MDH* and *TUB7* as reference gene respectively. And the expression stability of *MDH* and *TUB7* was further verified by correlation coefficient analysis (Pearson) with the anther transcriptome expression profile data. The results showed that *MDH* and *TUB7* could serve as qRT-PCR reference gene to analyse the gene expression pattern related to anther developing in *C. coenobialis*. The study would provide research fundamental data for molecular mechanism research of anther development in *C. coenobialis*, and reference for the selection of reference genes in other Zingiberaceae species during anther development.

Key words: *Caulokaempferia coenobialis*, anther, reference gene, quantitative realtime PCR (qRT-PCR), BestKeeper, geNorm, Normfinder

黄花大苞姜 (*Caulokaempferia coenobialis*) 是中国特有的姜科大苞姜属植物, 具有独特的花粉滑动自花授粉机制 (Wang et al, 2004, 2005), 花粉呈粘液状, 与拟南芥、水稻的干性花粉显著不同。因此, 其花药发育相关的研究, 对于了解和补充精密的花药发育分子机制具有重要意义。但目前关于黄花大苞姜花药发育的相关研究却尚还未见有报道。qRT-PCR 技术具有定量准确、特异性强、灵敏度高及高通量等优点, 被广泛用于基因表达分析 (Nolan et al, 2006; Huggett et al, 2005)。但由于 RNA 提取质量、逆转录效率等因素无法完全统一, 目的基因表达准确性会受到一定影响, 因此不能真实反映基因的表达情况, 需要内参基因来矫正和标准化, 而一个好的内参可以消除这些影响 (Vanguilder et al, 2008; Derveaux et al, 2010)。因此, 筛选特定条件下最适内参基因对于准确分析目的基因的表达情况至关重要。

本研究基于黄花大苞姜花粉母细胞时期 (Pollen mother cell stage, PMC)、四分体时期 (Tetrad stage, TET) 和成熟花粉时期 (Mature pollen stage, MP) 的花药转录组数据, 结合已经报道的植物 qRT-PCR 内参基因 (胡瑞波等, 2009; 牙库甫江

等, 2011)。筛选出了表达相对稳定的 5 个基因 *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*、*Malate dehydrogenase (MDH)*、 α -*tubulin3 (TUA3)*、 β -*tubulin7 (TUB7)* 和 *Actin6 (ACT6)* 作为候选内参基因, 进行 qRT-PCR 分析。并运用 BestKeeper (Pfaffl et al, 2004)、Normfinder (Andersen et al, 2004) 和 geNorm (Vandesompele et al, 2002) 软件综合分析 5 个候选内参基因在黄花大苞姜花药发育过程中的表达稳定性, 以筛选出表达最稳定的内参基因, 为开展黄花大苞姜花药发育相关基因的研究奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本研究以黄花大苞姜不同发育阶段的花药组织为材料, 于 5—7 月采自广东惠州南昆山自然保护区。收集花粉母细胞时期、四分体时期和成熟花粉时期的花药组织, 液氮速冻后, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 直至提取 RNA。每个发育阶段取 3 个生物学重复, 共 9 个样品。花药发育阶段经醋酸洋红压片, 显微观察确定。

1.2 总 RNA 提取和反转录 cDNA 合成

用 Omega BioTek 公司的 Plant RNA Kit (America) 试剂盒,参照说明书方案二(用于次生代谢物多的植物组织)提取花药组织的总 RNA。RNase-free DNase 1 (Takara Bio, Japan) 去除 RNA 中的 DNA。1.2% 的琼脂糖凝胶电泳和 Nano-100 超微量分光光度计用于检测 RNA 的纯度和完整性。cDNA 的合成采用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaKa, Japan) 试剂盒,取 1.6 μg RNA,参照说明书反转录生成 cDNA 的第一条链,产物-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 内参基因的选择及特异性引物设计

结合已经报道的常用内参基因,以及其在本实验室 3 个阶段发育花药的转录组数据中的表达情况,以基因在 3 个花药发育阶段的表达量 (FPKM) 差异倍数均小于 2 为标准。最终确定表达量差异较小的 *GAPDH*、*MDH*、*TUA3*、*TUB7*、*ACT6* 基因作为候选内参基因。特异性引物的设计采用 NCBI 内嵌的 Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计,根据荧光定量引物设计原则,以及 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 荧光定量试剂对引物的要求选择最优引物,并将引物对转录组数据库比对,确定引物的专一性。引物信息见表 1。

1.4 候选内参基因的 qRT-PCR 反应

采用 BIO-RAD 公司的 CFX96™ Real-Time PCR Detection System 进行荧光定量 PCR 反应,定量试剂采用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒 (Takara Bio, Japan)。反应体系:cDNA 0.25 μL ; SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 10 μL ; Primer F (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.8 μL ; Primer R (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.8 μL ; 加 ddH₂O 补至 20 μL 体系。每个样品设 3 次技术重复。反应程序:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。生成溶解曲线,用于判断扩增特异性。

1.5 引物扩增效率计算

等量取所有样品的 cDNA,混合均匀后稀释 5 个梯度,每个梯度 5 倍,即模板浓度分别为初始浓度的 1、1/5、1/5²、1/5³、1/5⁴ 倍。每个反应设 3 个重

复。用 Bio Rad CFX Manager 软件分析进行数据分析。以模板浓度的对数值为横坐标,以 Ct 值为纵坐标绘制标准曲线,得到斜率 K 和相关系数 R^2 。通过公式 $E = (5^{-1/K} - 1) \times 100\%$, 计算引物扩增效率 (E)。

1.6 数据处理与分析

采用 BestKeeper、geNorm 和 Normfinder 3 个软件对 5 个候选内参基因在黄花大苞姜花药发育过程中的表达稳定性进行分析。BestKeeper 软件可直接采用基因表达 Ct 值进行分析,而 geNorm 和 Normfinder 软件需将 Ct 值经 ΔCt 方法转换后才能用于数据分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 质量检测

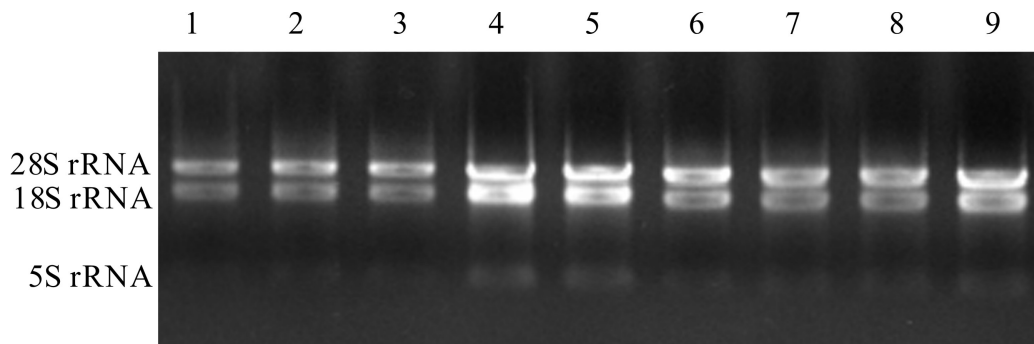
3 个发育阶段的黄花大苞姜花药组织提取总 RNA 后,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性和纯度,结果显示 RNA 电泳条带清晰,无可见污染(图 1)。Nano-100 检测 RNA 的浓度和纯度,结果表明 A260/280 均在 2.0~2.1 之间,表明 RNA 完整性好。A260/230 在 1.9~2.1 之间,表明纯度较高,可用于后续实验。

2.2 扩增效率与扩增特异性分析

以 5 倍为浓度梯度稀释 5 个梯度,qRT-PCR 获得的 *GAPDH*、*MDH*、*TUA3*、*TUB7*、*ACT6* 的标准曲线斜率、扩增效率和相关系数 (R^2) 见表 1。5 个候选内参基因中除 *ACT6* 扩增效率有点低只有 77.8%,相关系数 (R^2) 仅有 0.889 之外,*GAPDH*、*MDH*、*TUA3*、*TUB7* 的引物扩增效率 E 均大于 100%,相关系数 (R^2) 均大于 0.990,符合 qRT-PCR 对引物扩增效率的要求。溶解曲线分析结果表明,5 个候选内参基因的溶解曲线均呈现明显单一的主峰,相同样品间的曲线重复性良好(图 2),说明引物的特异性良好,可用于后续实验。

2.3 候选内参基因的表达水平分析

Ct 值与基因的表达量呈反比,Ct 值越大,基因的表达量越低;反之,Ct 值越小,代表基因的表达量越高。5 个候选内参基因在黄花大苞姜花药发育 3 个阶段的 Ct 值见图 3,5 个候选内参基因在黄花大苞姜不同花药发育阶段中表达的 Ct 值在 18~



注: 1-3. 花粉母细胞时期; 4-6. 四分体时期; 7-9. 成熟花粉时期。

Note: 1-3. Pollen mother cell stage; 4-6. Tetrad stage; 7-9. Mature pollen stage.

图 1 黄花大苞姜 3 个阶段花药组织总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA from three anther developmental stages of *Caulokaempferia coenobialis*

表 1 候选内参基因的基因名称、引物序列、目的片段长度及扩增效率

Table 1 Description of candidate reference genes, primer sequences, product length and PCR efficiency

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	目的片段长度 Product length (bp)	扩增效率 E PCR efficiency (%)	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	斜率 Slope (k)
<i>ACT6</i>	FP: CCGACACCAAAACCTCCAA RP: CGCATTCTCCTATCTCCGCC	290	77.8	0.889	-4.001
<i>GAPDH</i>	FP: GGCAACGAGTTCCACATCCT RP: TACTTTCCGCCTCCATTCCG	120	109.9	0.998	-3.105
<i>MDH</i>	FP: CAGCAAAACGATGAGGCGAC RP: ATTCTCCCGTCTCAATGGCG	96	107.2	0.992	-3.16
<i>TUA3</i>	FP: GTGATGTCTGCCCCAAGGA RP: CAGATGGCGGCTGCTAGTTTA	123	104.3	0.997	-3.224
<i>TUB7</i>	FP: GAGACGAGGTGGAAGGCTGA RP: TGGACTGTGATGTCTCCTGTAG	238	102	0.992	-3.275

27 之间, 其中 *ACT6* 和 *TUB7* 的表达量较低, *GAPDH* 的表达量最高。

2.4 候选内参基因表达稳定性分析

BesterKeeper 软件是基于内参基因 Ct 值的标准差 (SD) 和调节系数标准差 $SD(\pm x - \text{fold})$ 来评判基因的表达稳定性, 直接对基因表达 Ct 值进行分析。 SD 值越小, 表达越稳定, 程序默认临界值为 1, 当 SD 值大于 1 时, 认为该基因表达不稳定。分析结果显示, *ACT6* 的 SD 值大于 1, 其余均小于 1 (表 2), 表明除 *ACT6* 之外, 其余 4 个候选内参均

符合作为内参基因的标准, 表达最稳定的是 *TUB7*。5 个候选内参基因的稳定性排序依次为 *TUB7* > *MDH* > *GAPDH* > *TUA3* > *ACT6*。

geNorm V3.5 软件是基于平均表达稳定值 M 来确定候选内参基因的稳定性。qRT-PCR 实验获得的 Ct 值, 需经 ΔCt 方法转换后方可用于分析。 M 值越大, 基因的表达稳定性越低, M 值越小, 基因的表达越稳定。一般认为, M 值等于 1.5 为基因表达稳定的界限, M 值大于 1.5 的基因, 不宜作为内参基因。本研究 5 个候选内参基因的 M 值均小于

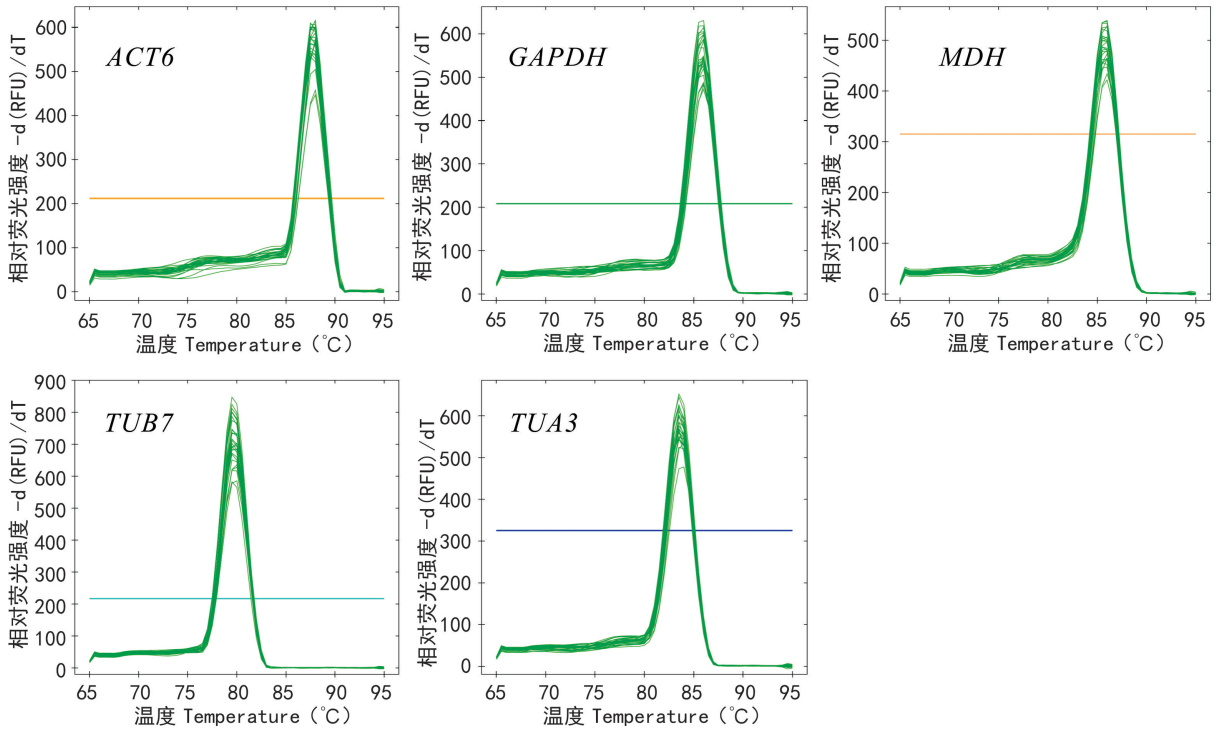
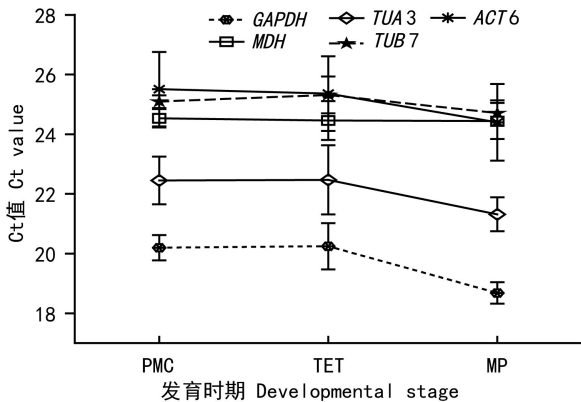


图 2 5个候选基因的溶解曲线

Fig. 2 Melting curves of five candidate reference genes



注: PMC. 花粉母细胞时期; TET. 四分体时期; MP. 成熟花粉时期。

Note: PMC. Pollen mother cell stage; TET. Tetrad stage;
MP. Mature pollen stage.

图 3 5个候选内参基因在花药不同发育时期的 Ct 值

Fig. 3 Ct value of five candidate reference genes
in different anther developmental stages

1.5,表明 5 个候选内参基因均符合作为内参的要求。其中表达最稳定的基因是MDH和TUB7,最

表 2 BestKeeper 分析 5 个候选内参的表达稳定性

Table 2 Expression stability of five candidate reference genes according to BestKeeper

基因名称 Gene name	TUB7	MDH	GAPDH	TUA3	ACT6
几何平均值 Geo Mean [Ct]	25.03	24.47	19.48	22.08	25.24
算术平均值 Ar Mean [Ct]	25.04	24.48	19.50	22.10	25.28
最小值 Min. [Ct]	24.15	23.76	18.44	20.80	23.56
最大值 Max. [Ct]	26.11	25.31	20.64	24.00	27.57
标准差 SD [± Ct]	0.31	0.42	0.70	0.75	1.17
稳定性排名 Stability rank	1	2	3	4	5

不稳定的是ACT6。5个候选内参基因的表达稳定性依次为MDH/TUB7>GAPDH>TUA3>ACT6(图4:A)。此外,geNorm软件还可以通过计算候选内参基因的配对变异值 $V_{n/n+1}$ 来分析最适内参基因数。

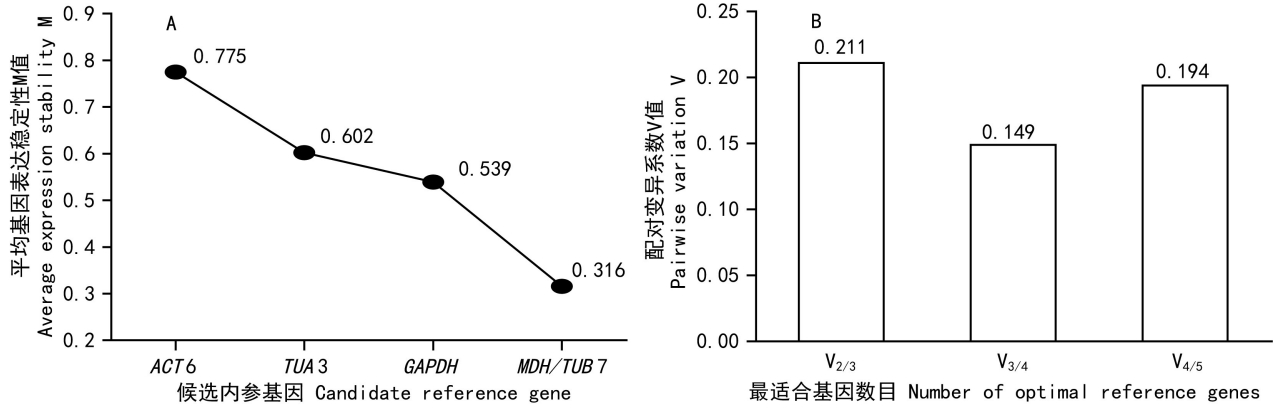


图 4 geNorm 分析 5 个候选内参基因的平均表达稳定性和最适内参基因数目

Fig. 4 Average expression stability and optimal number evaluation on reference genes of five candidate reference genes according to geNorm

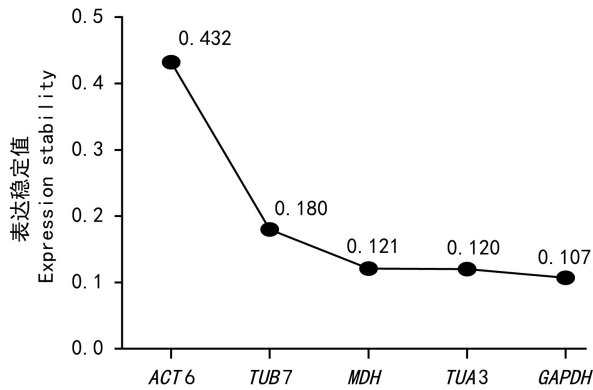


图 5 NormFinder 分析 5 个候选内参基因的表达稳定值

Fig. 5 Expression stability of five candidate reference genes according to NormFinder

软件默认 $V_{n/n+1}$ 临界值为 0.15, 即当 $V_{n/n+1} < 0.15$ 时, n 个内参基因即可满足内参基因的要求。图 4:B 结果显示 $V_{3/4} < 0.15$, 即需要 3 个内参基因 *MDH*、*TUB7* 和 *GAPDH* 组合来作为内参基因。

NormFinder 是基于组内方差和组间方差来计算基因表达稳定性的, 基因表达的 Ct 值也需要经 ΔCt 方法转换后方可用于分析。稳定值越大, 代表基因的表达稳定性越差, 反之, 稳定性值越小代表, 基因表达越稳定。图 5 结果表明 *ACT6* 的表达稳定性最差, *GAPDH* 的表达稳定性最高。5 个候选内参基因的表达稳定性依次为 $GAPDH > TUA3 >$

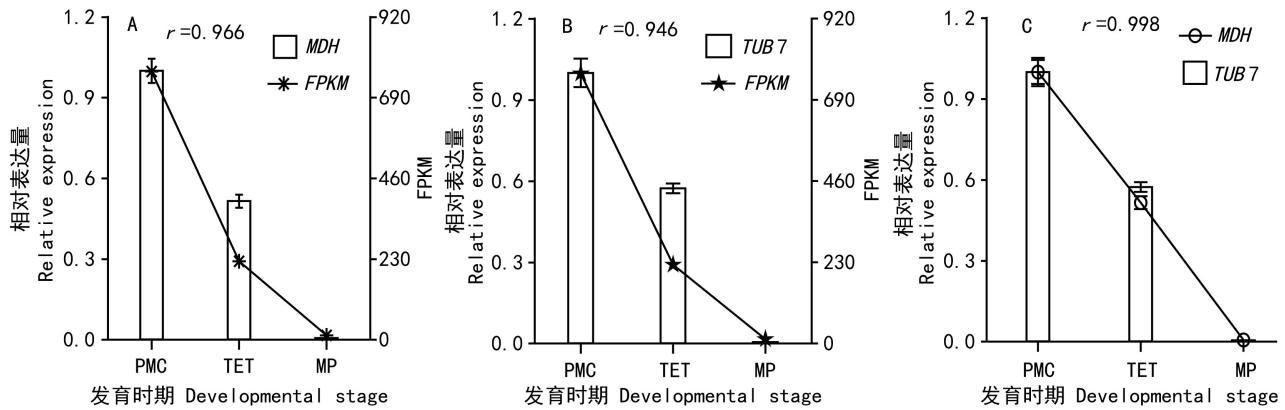
$MDH > TUB7 > ACT6$ 。

2.5 内参基因稳定性的验证

综合考虑 BestKeeper、geNorm 和 Normfinder 3 个软件的分析结果, 认为 *MDH* 和 *TUB7* 在黄花大苞姜花药发育中表达相对最稳定。分别以 *MDH* 和 *TUB7* 作为内参基因, 以 PMC 时期作为对照, 采用 $\Delta\Delta Ct$ 法, 对黄花大苞姜花药发育过程中与淀粉和蔗糖代谢相关的 1,4- α -葡聚糖支链酶基因 (1,4- α -glucan branching enzyme, *GBE1*) 在花药发育过程中的相对表达模式进行分析。并与花药转录组中该基因的表达模式 (FPKM) 两两做相关系数分析 (Pearson), 来验证筛选出的表达相对较稳定的内参基因的可靠性。结果表明, 以 *MDH* 或 *TUB7* 作为内参基因获得的 *GBE1* 在花药发育中的表达模式, 与该基因在转录组中的表达模式相关系数 r 分别为 0.966 和 0.946, 它们两个之间的相关系数 r 为 0.998, 表明 3 种途径获得的 *GBE1* 在黄花大苞姜花药发育中的表达模式一致, 因此认为 *MDH* 和 *TUB7* 可作为分析黄花大苞姜花药发育过程中相关基因表达模式的内参基因。

3 讨论与结论

qRT-PCR 技术已被广泛用于研究基因表达的研究, 但是定量结果的准确性与内参基因的稳定



注: A. 以 *MDH* 为内参基因获得的 *GBE1* 表达模式及其与转录组表达模式的相关系数; B. 以 *TUB7* 为内参基因获得的 *GBE1* 表达模式及其与转录组表达模式的相关系数; C. 分别以 *MDH* 和 *TUB7* 为内参基因获得的 *GBE1* 表达模式之间的相关系数。PMC. 花粉母细胞时期; TET. 四分体时期; MP. 成熟花粉时期。

Note: A. Expression patterns of *GBE1* based on *MDH* as reference gene and correlation coefficient compared with the expression pattern of transcriptome; B. Expression pattern of *GBE1* based on *TUB7* as reference gene and correlation coefficient compared with the expression pattern of transcriptome; C. Correlation coefficient between the expression patterns based on *MDH* and *TUB7* as reference gene respectively. PMC. Pollen mother cell stage; TET. Tetrad stage; MP. Mature pollen stage.

图 6 *GBE1* 在花药发育时期的表达模式以及表达模式之间的相关系数

Fig. 6 Expression patterns of *GBE1* in different anther development stages and correlation coefficients among the expression patterns

性表达密切相关,而并不存在所谓恒定表达的内参基因(牙库甫江等,2011;Huis et al, 2010; Chen et al, 2011)。Mallona et al(2010)筛选矮牵牛叶和花发育中表达稳定的内参基因, NormFinder、BestKeeper、geNorm 和 qBasePlus 4 种软件综合分析结果显示, *EF1a* 在 Mitchell 品系中最稳定, *CYP* 在 V30 品系中最稳定, *GAPDH* 在两个品系中都最不稳定。Xu et al(2014)对中国白菜花蕾发育中 qRT-PCR 内参基因进行筛选, geNorm 分析结果显示可育系与不育系花蕾发育过程中表达最稳定的是 *TUB* 和 *GAPDH*。Jin et al(2013)分析了不同色系瓜叶菊花发育过程中的 8 个候选内参基因的表达稳定性,结果表明在所有样本中 *SAND* 和 *ACT* 最稳定,但是在不同色系中的结果有所不同,蓝色和粉红色品系中 *SAND* 和 *ACT* 最稳定, *TIP41* 和 *ACT* 在白色系中最稳定, *PP2A* 和 *ACT* 在洋红色系中最稳定。而本研究发现传统常用内参基因 *GAPDH*、*MDH*、*TUA3*、*TUB7*、*ACT6*, 在黄花大苞姜花药发育过程中表达最稳定的基因是 *MDH* 和 *TUB7*, 最不稳定的基因是 *ACT6*。因此筛选特定条件下,

稳定表达的内参基因对于准确分析目的基因的表达非常重要(Bustin et al, 2010)。

NormFinder、BestKeeper 和 geNorm 软件是目前最常用于评估内参稳定的软件,但是由于采用不同的算法(Pfaffl et al, 2004; Andersen et al, 2004; Vandesompele et al, 2002),对内参基因稳定性的分析结果会有一些差异,目前已经有基于这些软件的研究与分析,并得到了稳定表达的内参基因(李晗等,2016;刘文哲等,2016;苏晓娟等,2013;刘艳霞等,2016)。本研究也采用了这 3 个软件对 *GAPDH*、*MDH*、*TUA3*、*TUB7*、*ACT6* 在黄花大苞姜花药发育中的表达稳定性进行了分析。BestKeeper 分析结果显示,除了 *ACT6* 以外,其余 4 个基因均符合作为内参的要求, *MDH* 和 *TUB7* 的表达最稳定, *ACT6* 的表达稳定性最差。geNorm 分析认为 5 个候选内参基因都符合作为内参的标准, *MDH* 和 *TUB7* 的表达最稳定, *ACT6* 的表达稳定性最差。而 NormFinder 则分析认为表达最稳定的基因是 *GAPDH* 和 *TUA3*, *ACT6* 表达稳定性最差,但是 *MDH* 与 *TUB7* 的稳定性值与最稳定的 *GAPDH* 的

差异不大。本研究选择了表达较为稳定的 *MDH* 和 *TUB7* 分别作为内参基因分析 *GBE1* 在黄花大苞姜花药发育中的表达模式, 并与该基因在花药发育转录组中的表达模式做相关系数分析, 该基因的 3 种表达模式结果一致。因此, 认为 *MDH* 和 *TUB7* 可作为 qRT-PCR 分析黄花大苞姜花药发育相关基因表达情况的内参基因。

参考文献:

ANDERSEN CL, JENSEN JL, ØNTOFT TF, 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets [J]. *Cancer Res*, 64: 5245–5250.

BUSTIN SA, BEAULIEU JF, HUGGETT J, et al, 2010. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments [J]. *BMC Mol Biol*, 11(1): 1–5.

CHEN K, FESSEHAIE A, ARORA R, 2011. Selection of reference genes for normalizing gene expression during seed priming and germination using qPCR in *Zea mays* and *Spinacia oleracea* [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 30(2): 478–487.

DERVEAUX S, VANDESOMPELE J, HELLEMANS J, 2010. How to do successful gene expression analysis using Real-time PCR [J]. *Methods*, 50(4): 227–230.

HU RB, FAN CM, FU YF, 2009. Reference gene selection in plant real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) [J]. *J Agric Sci Technol*, 11(6): 30–36. [胡瑞波, 范成明, 傅永福, 2009. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择 [J]. 中国农业科技导报, 11(6): 30–36.]

HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S, et al, 2005. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations [J]. *Genes Imm*, 6(4): 279–284.

HUIS R, HAWKINS S, NEUTELINGS G, 2010. Selection of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.) [J]. *BMC Plant Biol*, 10(1): 1–14.

JIN X, FU J, DAI S, et al, 2013. Reference gene selection for qPCR analysis in cineraria developing flowers [J]. *Sci Hortic*, 153(153): 64–70.

LI H, LI ZL, LI XY, et al, 2016. Selection of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in different tissues and stigma development from ornamental kale [J]. *Bull Bot Res*, 36(4): 565–572. [李晗, 李治龙, 李晓屿, 等, 2016. 羽衣甘蓝不同组织及柱头发育实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 植物研究, 36(4): 565–572.]

LIU YX, LAN XX, CAO J, et al, 2016. Screening of qRT-PCR

reference genes for *Chenopodium album* and *C. glaucum* of Chenopodiaceae [J]. *Guihaia*, 36(12): 1511–1518. [刘艳霞, 兰欣欣, 曹婧, 等, 2016. 藜科植物藜和灰绿藜实时荧光定量 PCR 内参基因的选择 [J]. 广西植物, 36(12): 1511–1518.]

LIU WZ, NIU MY, LI XY, et al, 2016. The selection of reference genes for quantitative PCR in *Betula luminifera* [J]. *Sci Silv Sin*, 52(8): 29–37. [刘文哲, 牛明月, 李秀云, 等, 2016. 光皮桦实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 林业科学, 52(8): 29–37.]

MALLONA I, LISCHEWSKI S, WEISS J, et al, 2010. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida* [J]. *BMC Plant Biol*, 10(1): 4.

NOLAN T, HANDS RE, BUSTIN SA, 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR [J]. *Nat Protocols*, 1(3): 1559–1582.

PFAFFL MW, TICHOPAD A, PRGOMET C, et al, 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations [J]. *Biotechnol Lett*, 26: 509–515.

SU XJ, FAN BG, YUAN LC, et al, 2013. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of gene expression in *Populus trichocarpa* [J]. *Chin Bull Bot*, 48(5): 507–518. [苏晓娟, 樊保国, 袁丽钗, 等, 2013. 实时荧光定量 PCR 分析中毛果杨内参基因的筛选和验证 [J]. 植物学报, 48(5): 507–518.]

VANDESOMPELE J, PRETER KD, PATTYN F, et al, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genome Biol*, 3(7): 1–11.

VANGUILDER HD, VRANA KE, FREEMAN WM, 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis [J]. *Biotechniques*, 44(5): 619–626.

WANG YQ, ZHANG DX, RENNER SS, et al, 2004. A new self-pollination mechanism [J]. *Nature*, 431(7004): 39–40.

WANG YQ, ZHANG DX, RENNER SS, et al, 2005. Self-pollination by sliding pollen in *Caulokaempferia coenobialis* (Zingiberaceae) [J]. *Int J Plant Sci*, 166(5): 753–759.

XU X, YANG Z, SUN X, et al, 2014. 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*, 36(3): 809–814.

YAKUPJAN, HAXM, GUAN B, et al, 2011. Research progress in plant reference genes [J]. *Biotechnol Bull*, (7): 7–11. [牙库甫江, 阿西木, 关波, 等, 2011. 植物基因表达转录分析中内参基因的选择与应用 [J]. 生物技术通报, (7): 7–11.]