刺萼龙葵种子中适宜内参基因的筛选

赵丹丹， 陈景超， 黄兆峰， 姜翠兰， 黄红娟*，
张朝贤， 李香菊， 魏守辉*

（中国农业科学院植物保护研究所，中国农业科学院杂草鼠害生物学与治理重点开放实验室，北京 100193）

摘要 入侵杂草刺萼龙葵 *Solanum rostratum* Dunal 传播扩散的主要载体是种子，研究其种子休眠萌发基因的激素调控对于其防除具有重要意义，而选择合适的内参基因可以提高相关基因表达分析的准确性。本研究以赤霉素、脱落酸和水处理的刺萼龙葵种子为材料，利用 geNorm、NormFinder、BestKeeper 和 RefFinder 4 种软件对 15 个候选内参基因进行表达稳定性评价，并通过检测 *ABI*5(abscisic acid-insensitive 5)的表达验证所筛选的内参基因的适用性。结果表明，对于赤霉素、脱落酸和水处理过的种子，最稳定的内参基因分别为 *eIF*(eukaryotic initiation factor)、*SAND*(SAND protein family)和 *ACT*(β-actin)；对所有种子样本而言，*PP2Acs*(a catalytic subunit of protein phosphatase 2A)是最稳定的内参基因。研究结果将为刺萼龙葵种子休眠萌发的遗传调控研究提供重要参考。

关键词 刺萼龙葵； 内参基因； 种子； 赤霉素； 脱落酸

中图分类号： S 451.1 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2019105

Selection of suitable reference genes in *Solanum rostratum* seeds

ZHAO Dandan， CHEN Jingchao， HUANG Zhaofeng， JIANG Cuilan， HUANG Hongjuan*，
ZHANG Chaoxian， LI Xiangju， WEI Shouhui*

(*Key Laboratory of Weed and Rodent Biology and Management*, *Institute of Plant Protection*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100193, *China*)

Abstract The main transmission way of the invasive weed buffalobur (*Solanum rostratum*) is seed dispersal. It is important to understand the hormonal regulation of seed dormancy or germination related genes in buffalobur. Selection of appropriate reference genes can improve the accuracy of expression analysis of these genes. Here, 15 candidate reference genes were selected to evaluate their expression stability in hormone-treated and water-treated seeds of buffalobur using geNorm, NormFinder, BestKeeper and RefFinder statistical algorithms. Validation of recommended reference genes were achieved by assessing the relative expression levels of abscisic acid-insensitive 5 (*ABI*5). The results showed that the most stable reference genes for gibberellin, abscisic acid and water-treated seeds were eukaryotic initiation factor (*eIF*), SAND protein family (*SAND*) and β-actin (*ACT*), respectively. For total seeds, *PP2Acs*, the gene encoding a catalytic subunit of protein phosphatase 2A was the most stable reference gene. This work would provide references for further research on the genetic regulation of seed dormancy and germination in this invasive plant.

Key words *Solanum rostratum*； reference gene； seed； gibberellin； abscisic acid

外来入侵杂草刺萼龙葵 *Solanum rostratum* 原产于北美洲，是茄科茄属一年生草本植物[1]。1981年刺萼龙葵首次在我国辽宁朝阳被发现[2]，随后逐渐扩散蔓延至吉林、河北、北京、内蒙古、山西等地[3]。刺萼龙葵可以降低入侵地的生物多样性、破坏其生态系统。入侵农田的刺萼龙葵除了直接与农作物竞争之外，还是多种病虫害的中间寄主，其植株含有毒素茄碱，可以使误食的牲畜中毒死亡[1]。刺萼龙葵的入侵对生态环境和农业生产均造成了严重影响，其防控问题受到人们的广泛关注[4]。由于化学除草剂的大量使用会对生态环境造成污染，而基于竞争替代的生态调控技术也存在应用范围较窄的

收稿日期： 2019-03-05 **修订日期**： 2019-04-02
基金项目： 国家自然科学基金(31572022)；国家重点研发计划(2018YFD0200602)；北京市自然科学基金(6182033)
* 通信作者 E-mail：黄红娟 hjhuang@ippcaas.cn；魏守辉 shwei@ippcaas.cn

局限性。因此,从刺萼龙葵种子休眠与萌发的遗传调控路径入手,有望发掘更为有效的防控方法[5-6]。

刺萼龙葵主要通过种子进行传播,其单株结实量可以达 1 万～2 万粒。刺萼龙葵的种子具有复合休眠特性(物理休眠与生理休眠),在土壤中可以保持较长时间的种子活力[7]。前人研究发现赤霉素可以显著提高刺萼龙葵种子的萌发率,其种子的休眠和萌发主要受激素相关的内在遗传基因调控[5]。明确刺萼龙葵种子休眠和萌发调控的分子机理对合理调节其萌发出苗,进而制定有效的杂草防治措施具有重要价值。基因表达分析是揭示植物生命周期中基因功能和调控机制的重要手段。因此,确保相关基因表达分析的准确性十分重要。荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)因其灵敏度高、特异性强等优点,被广泛用于基因表达检测[8]。选用表达水平不随组织类型、发育阶段或浸种处理而显著变化的内参基因进行 qPCR 可以确保结果分析的准确性[9]。因此,在使用 qPCR 技术对基因表达进行检测分析之前,应筛选合适的内参基因并验证其稳定性。目前,有关刺萼龙葵种子适宜内参基因筛选的研究尚未见报道。

本研究以外源激素(赤霉素、脱落酸)处理的刺萼龙葵种子为材料,检测了三磷酸甘油醛脱氢酶基因(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,*GAPDH*)、肌动蛋白基因(β-actin,*ACT*)、谷氧还蛋白基因(glutaredoxin protein,*GR*)、泛素蛋白基因(ubiquitin,*UBQ*)、液泡膜内在蛋白基因(tonoplast intrinsic protein/aquaporin,*TIP*41)、18S 核糖体 RNA 基因(18S rRNA,18S)、核糖体蛋白 L8 基因(ribosomal protein L8,*RPL8*)、肌动蛋白真核起始因子基因(actin eukaryotic initiation factor,*eIF*)、热休克蛋白 40 基因[DnaJ-like protein (hsp40),*DNAJ*]、β-微管蛋白基因(β-tubulin,*TUB*)、亲环蛋白基因(cyclophilin,*CYP*)、转录延伸因子(elongation factor 1-alpha,*EF*1α)、蛋白磷酸酶 2A 的催化亚单位基因(a catalytic subunit of protein phosphatase 2A,*PP*2A*cs*)、1,5-二核酸核酮糖基因(ribulose 1,5 bisphosphate,*RUBP*)和 SAND 家族蛋白基因(SAND protein family,*SAND*)共 15 个内参基因的表达情况,用 geNorm[10]、NormFinder[11]、BestKeeper[12]和 RefFinder[13] 4 种软件对其表达稳定性进行分析,并对筛选出的内参基因进行了稳定性验证。其中 geNorm 和 NormFinder 均是通过计算内参基因表达稳定值大小来评价其稳定性,前者可选择出两个或两个以上基因作为标准化指标,而后者只能选择一个合适的内参基因;BestKeeper 依据各基因间配对的相关系数、变异系数和标准偏差等值对内参基因稳定性进行评价;RefFinder 内置的算法包括以上 3 种,其对候选内参基因的综合排序结果更可靠,避免了单个软件分析的片面性。本研究结果可以为准确检测刺萼龙葵种子休眠萌发相关基因的表达提供参考。

1　材料与方法

1.1　植物材料

刺萼龙葵种子于 2018 年采于北京市密云区(40°24′4″N, 116°50′21″E)。选取成熟、饱满、大小均匀的刺萼龙葵种子摆放在垫有两层滤纸的培养皿(直径 15 cm)中,每皿摆放 300 粒。向培养皿中分别加入 12 mL 0.35 mmol/L 赤霉素(gibberellin, GA)、12 mL 0.35 mmol/L 脱落酸(abscisic acid, ABA)或 12 mL 无菌水,以未处理的干种子作为空白对照。然后将培养皿转入光照培养箱中,在 30℃±2℃、黑暗条件下培养 24、48 h 和 72 h 后分别收集种子样品。将所有的样品分为 4 组,即赤霉素、脱落酸、水及以上 3 组的混合样品(种子总体),每个样品设 3 个生物学重复,取样后立即放入液氮中冷冻并保存在－80℃冰箱中。

1.2　RNA 提取及 cDNA 合成

使用 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)进行样品 RNA 的提取,RNA 样品经 1%琼脂糖凝胶电泳检测在 28S 和 18S 处均显示清晰单一的条带,无明显降解。利用 NanoDrop TM One/OneC 超痕量 UV 分光光度计测量 RNA 的浓度和纯度,其 A_{260}/A_{280} 在 1.90～2.10 之间,RNA 的总体质量较好。采用 TransScript® All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(北京全式金生物技术有限公司)反转录试剂盒对质量合格的 RNA 进行反转录,体系为 20 μL,RNA 质量均为 800 ng。合成的 cDNA 保存在－80℃冰箱中。

1.3　候选基因的选择与引物设计

根据本实验室建立的刺萼龙葵转录组数据库以及文献中报道的常见内参基因,选择了 15 个刺萼龙葵的内参基因(*GAPDH*, *ACT*, *GR*, *UBQ*, *TIP*41,

18S，*RPL*8，*eIF*，*TUB*，*DNAJ*，*CYP*，*EF*1α，*PP2Acs*，*RUBP* 和 *SAND*）作为候选。使用 Oligo 7 软件设计用于 qPCR 的引物，具体信息如表 1。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 1 刺萼龙葵候选内参基因和靶基因的引物信息

Table 1 The primer pairs information of candidate reference genes and target gene for buffalobur

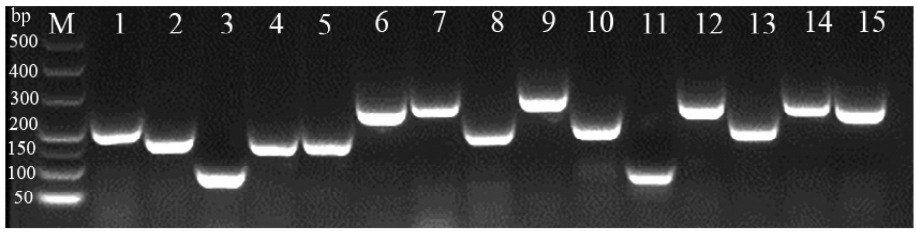
基因 Gene	登录号 GenBank accession	引物序列(5′-3′) Primer sequence	产物长度/bp Product length	扩增效率/% Efficiency	相关系数 Correlation coefficient
GAPDH	MG930815	F:GCAGTCAACGATCCATTTATCTCCAC R:TCAACAACGAACTCAGCACCAG	203	101.1	0.995
ACT	MG930814	F:GTGTTCCCTAGCATTGTTGGTCG R:GCCATATCTTCTCCATATCATCCCAGTTG	172	95.0	0.998
GR	MG930816	F:GCTACTGAGGCTTCCAACAATAACG R:ACCATAAATTAGCAAGAAAATCACAGAGGC	96	90.0	0.995
UBQ	MG930817	F:GCACTTCTTTTTCCTCTCATTCTCTCG R:ATGCCTTCCTTGTCTTGAATCTTAGC	168	91.3	0.996
*TIP*41	KT807935	F:ATCACCCCAGTTCACACCTTAGC R:GCCCCAACAACAAGCCCAGTTAG	170	91.4	0.994
18S	KT366002	F:CGCAAATTACCCAATCCTGACACG R:GCCGACAGAAGGGACGAGAC	266	100.6	0.997
*RPL*8	KT807936	F:CAAATCCCACACCCACCACC R:GCAACACATTACCAACCATAAGACTAGC	260	90.4	0.994
eIF	KT596731	F:TGGTCACATCGTCATTAAAAATCGTCCT R:GGTATCATCAGTTGGGAGCCTCAAG	277	93.1	0.994
TUB	KT807934	F:GGTGTTACTTGCTGTTTGAGATTCCCT R:ATCATCTGTTCATCTACCTCCTTTGTGC	290	104.7	0.990
DNAJ	KT596730	F:GTTTCCGCCTCTTGCTCCACA R:CCGCCGACGAATTTTGCTG	193	96.2	0.991
CYP	MK181638	F:TCAAGAAGGTGGAGGCTGTTGG R:GACAAGACCCGACCCAAGCA	211	98.6	0.998
*EF*1α	MK181640	F:CTGTGCTGTCCTGATTATTGACTCG R:GGGTGAAAGCAAGCAACGCA	98	90.6	0.995
PP2Acs	MK181639	F:GCCAGTAAAAAGCCCTGTGACTA R:CGCAAGCATTCATCATAGAACCCAT	267	97.7	0.997
RUBP	MK181641	F:GCAAAACACTGACATCACCTCCA R:ATACAAATCCGTGCTCAGTCTCG	206	94.2	0.998
SAND	MK181642	F:ACTAGAGAATCGTCAGAGAGGTTTGC R:CGGAGTAACCCAGCACAGTAGA	267	91.6	0.997
*ABI*5	MG930818	F:TCCTCTCATTCCTATTTCCAACCCGTA R:ATTCCCACAA CAGCCAACG	184	100.9	0.995

1.4 常规 PCR 与 qPCR 反应

以刺萼龙葵种子的 cDNA 为模板，分别对 15 个候选内参基因进行常规 PCR。反应体系为 25 μL，包括：12.5 μL 2×*Taq* Master Mix，1 μL cDNA，2 μL上下游引物混合物(10 μmol/L)，9.5 μL 超纯水。反应程序为：94℃ 预变性 5 min；94℃ 变性30 s，60℃ 退火 30 s，72℃延伸 15 s，35 个循环；最后 72℃延伸 10 min。反应完成后，取 5 μL 扩增产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测，每对引物均扩增出了单一正确的产物，无可见的引物二聚体，说明引物的特异性良好(图 1)。

qPCR 反应利用 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪进行数据采集。反应体系为 20 μL，包括：10 μL Bestar® SybrGreen qPCR Mastermix(DBI，德国)，1 μL cDNA，1 μL 上、下游引物混合物(10 μmol/L)，7.6 μL RNase-free H_2O 和 0.4 μL 50×ROX。每个样品设 3 次技术重复，以 RNase-free H_2O 替代 cDNA 模板作为阴性对照。反应程序为：92℃ 预变性2 min；95℃ 变性 10 s，60℃ 反应 34 s，40 个循环；扩增完毕后，温度从 58℃ 缓慢递增到 95℃ 进行熔解曲线反应，结果显示每对引物的熔解曲线均为单峰。利用 qPCR 进行了标准曲线的

制作,结果显示,15 个候选内参基因的扩增效率(E)在 90.41%～106.43%之间,相关系数(R^2)在 0.991～0.998 之间,说明设计的引物符合 qPCR 检测要求(表 1)。



M: DL500 markcr;1~15: *GAPDH*, *ACT*, *GR*, *UBQ*, *TIP*41, *RPL*8, *eIF*, *TUB*, *DNAJ*, *CYP*, *EF*1α, *PP*2*Acs*, *RUBP*, *SAND*, 18S

图 1　15 个候选内参基因的 PCR 产物

Fig. 1　PCR products for 15 candidate reference genes

1.5　表达稳定性的数据分析

将处理样品的 cDNA 进行 qPCR 检测,得到不同候选内参基因 Cq 值并用 Prism 软件绘制箱形图,在此基础上,选择软件 geNorm、NormFinder、BestKeeper 对候选内参基因的稳定性进行评估,然后利用网络工具(RefFinder)综合分析 3 种软件的结果,得出最稳定的内参基因。geNorm 和 NormFinder 的输入值为 Cq 值转换而成的相对量,转换公式为 $2^{-\Delta Cq}$(ΔCq=相应的 Cq 值－该基因的最低 Cq 值)。geNorm 通过参数 M 来评估内参基因的稳定性。M 值越小,表明基因表达越稳定,若 M 值低于 1.5,则认为该内参基因合格[10]。此外,geNorm 通过计算归一化因子(NF_n 和 NF_{n+1})之间的配对变异数($V_{n/n+1}$),可以确定 qPCR 分析所需的最佳内参基因数。当 $V_{n/n+1}<0.15$ 时,代表该条件下的理想内参基因数为 n。NormFinder 通过计算候选内参的总体变异和样品组间变异来确定最稳定的内参基因,评估的稳定性参数值越小,表明该基因表达越稳定[11]。BestKeeper 和 RefFinder 的输入值为原始 Cq 值。BestKeeper 通过该基因内所有样品的 Cq 值计算得出标准偏差(SD)和候选内参基因之间的变异系数(CV),SD 低于 1 的内参基因认为合格[12]。RefFinder 则依据自带的 4 种算法(geNorm、NormFinder、BestKeeper 和 Delta-Ct)的结果生成一个综合的排名,其中 Delta-Ct 算法通过计算每个样本的各内参基因平均 SD 值对基因进行排序,SD 值越小,内参基因表达越稳定。

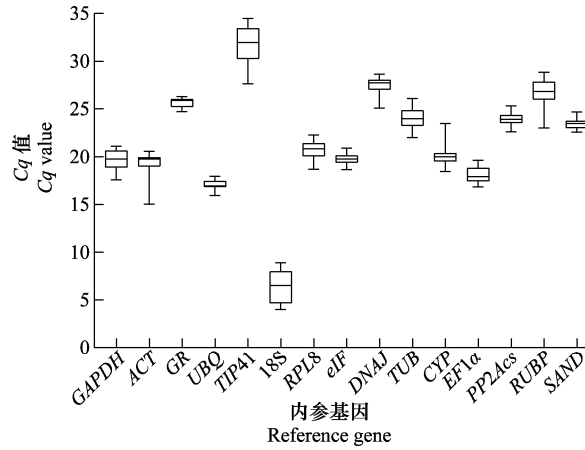
1.6　内参基因的验证

为验证筛选出的内参基因的稳定性,本研究以其中最稳定和最不稳定的基因为内参,检测了目的基因 abscisic acid-insensitive 5 ($ABI5$)在激素处理的种子中的表达。种子处理方法、RNA 的提取与反转录方法同 1.2 所述。$ABI5$ 的引物及 GenBank 登录号信息如表 1。使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法分析 $ABI5$ 的表达水平[14],并用 Excel 作图。

2　结果与分析

2.1　候选内参基因的表达特征

15 个候选内参基因在所有样品中的 Cq 值范围为 4.0～34.5,表现出较大的差异,大多数 Cq 值在 16～25 之间(图 2)。在所有样品中,18S 的 Cq 值最低(平均 Cq=6.4),表明其在种子中的表达水平很高;$TIP41$ 的 Cq 值最高(平均 Cq=31.7),表明其在种子中的表达水平很低(图 2)。



上、下边缘线代表最大值、最小值;箱体的上下边缘线代表上、下四分位数;箱体中线代表中位数

The upper and lower edge lines represent the maximum and minimum values, respectively. The upper and lower lines of box represent interquartile. The median line of box represents the median

图 2　候选内参基因的 Cq 值分布

Fig. 2　Cq values of 15 reference genes across all samples

2.2 候选内参基因的稳定性评价

2.2.1 geNorm 分析

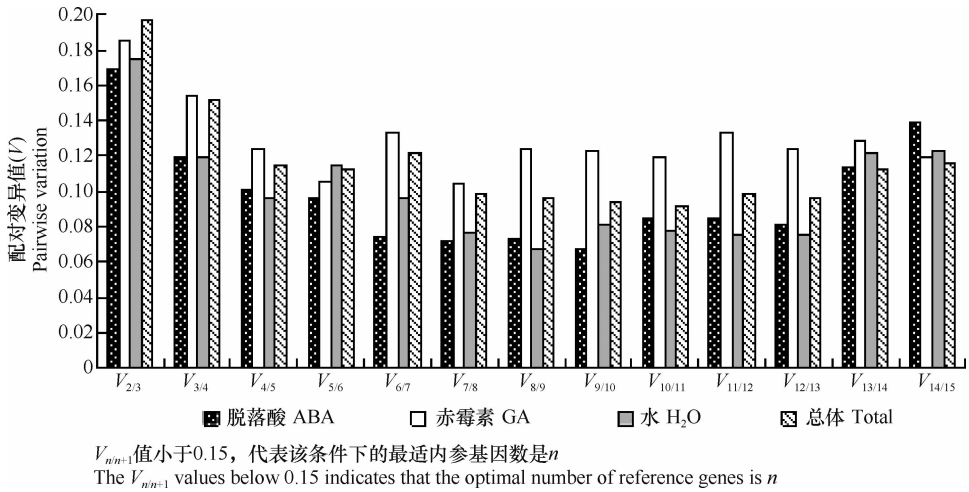
在刺萼龙葵种子的所有处理中，15 个候选内参基因的 M 值均小于 1.5，说明根据 geNorm 的标准，所有候选内参都可以用作刺萼龙葵相应条件下的参考基因。在赤霉素处理的种子中，内参基因 *UBQ* 和 *eIF* 最为稳定，M 值均为 0.379；在脱落酸和水处理的种子中，最稳定的内参基因均为 *PP2Acs* 和 *SAND*，其 M 值为 0.279；对所有样品进行分析发现，最稳定的内参基因同样是 *PP2Acs* 和 *SAND*，M 值均为 0.360，*TIP41* 和 18S 是最不稳定的内参基因（表 2）。

此外，geNorm 还可通过计算基因配对变异值（$V_{n/n+1}$）确定 qPCR 分析中所需要的内参基因最佳数量。对于脱落酸和水处理的种子，$V_{3/4}$ 值分别为 0.119 和 0.120，说明对于 qPCR 的归一化分析，使用稳定性排名前三的内参基因是足够的；对于赤霉素处理的种子和所有样品来说，其 $V_{4/5}$ 值分别为 0.124 和 0.115，应使用稳定性最高的 4 个内参基因用于 qPCR 分析（图 3）。

表 2 四种算法分析 15 个候选内参基因的表达稳定性排名（仅列出了前五名）

Table 2 Gene expression stability of 15 candidates ranked by four algorithms (only the top five genes were listed)

分组 Group	排名 Rank	geNorm		NormFinder		BestKeeper			RefFinder	
		基因 Gene	稳定性 Stability	基因 Gene	稳定性 Stability	基因 Gene	SD[±*Cq*]	*CV*(%*Cq*)	基因 Gene	稳定性 Stability
赤霉素 GA	1	*UBQ*	0.379	*eIF*	0.053	*eIF*	0.280	1.41	*eIF*	1.00
	2	*eIF*	0.379	*EF1α*	0.286	*UBQ*	0.350	2.04	*UBQ*	2.21
	3	*EF1α*	0.518	*PP2Acs*	0.312	*EF1α*	0.410	2.30	*EF1α*	2.45
	4	*PP2Acs*	0.600	*UBQ*	0.313	*GR*	0.420	1.64	*PP2Acs*	3.94
	5	*SAND*	0.637	*SAND*	0.404	*PP2Acs*	0.420	1.77	*SAND*	5.23
脱落酸 ABA	1	*PP2Acs*	0.279	*SAND*	0.097	*SAND*	0.300	1.31	*SAND*	1.00
	2	*SAND*	0.279	*PP2Acs*	0.206	*GR*	0.370	1.45	*PP2Acs*	2.30
	3	*GR*	0.439	*GR*	0.265	*eIF*	0.390	1.96	*GR*	3.22
	4	*CYP*	0.492	*ACT*	0.281	*UBQ*	0.400	2.37	*eIF*	4.36
	5	*ACT*	0.530	*eIF*	0.291	*CYP*	0.410	2.10	*UBQ*	4.92
超纯水 H_2O	1	*PP2Acs*	0.279	*ACT*	0.224	*ACT*	0.330	1.67	*ACT*	1.57
	2	*SAND*	0.279	*SAND*	0.227	*GR*	0.360	1.39	*SAND*	1.86
	3	*ACT*	0.453	*PP2Acs*	0.257	*eIF*	0.410	2.06	*PP2Acs*	3.00
	4	*CYP*	0.500	*RPL8*	0.317	*UBQ*	0.420	2.44	*GR*	3.98
	5	*GR*	0.526	*GR*	0.324	*SAND*	0.490	2.08	*UBQ*	5.09
总体 Total	1	*PP2Acs*	0.360	*PP2Acs*	0.271	*eIF*	0.380	1.91	*PP2Acs*	1.41
	2	*SAND*	0.360	*eIF*	0.315	*UBQ*	0.400	2.32	*SAND*	2.11
	3	*eIF*	0.583	*SAND*	0.331	*GR*	0.410	1.62	*eIF*	2.28
	4	*UBQ*	0.611	*GR*	0.348	*PP2Acs*	0.470	1.97	*UBQ*	3.56
	5	*GR*	0.643	*UBQ*	0.382	*SAND*	0.470	2.02	*GR*	4.16



$V_{n/n+1}$值小于0.15，代表该条件下的最适内参基因数是n

The $V_{n/n+1}$ values below 0.15 indicates that the optimal number of reference genes is n

图 3 geNorm 分析内参基因的配对变异值（$V_{n/n+1}$）

Fig. 3 Pairwise variation ($V_{n/n+1}$) of reference genes by geNorm software

2.2.2 NormFinder 分析

候选内参基因经 NormFinder 分析后得到的表达稳定性值越小,表明该基因越稳定(表 2)。赤霉素处理的种子中,候选内参基因 *eIF*(0.053)最稳定,*CYP*(1.232)最不稳定;脱落酸处理的种子中,*SAND*(0.097)最稳定,*TIP*41(1.437)最不稳定;对于水处理的种子,最稳定的内参基因是 *ACT*(0.224),最不稳定的是 18S(1.269);对所有样品进行分析发现,*PP2Acs*(0.271)是最稳定的内参基因,而 *TIP*41(1.194)最不稳定。

2.2.3 BestKeeper 分析

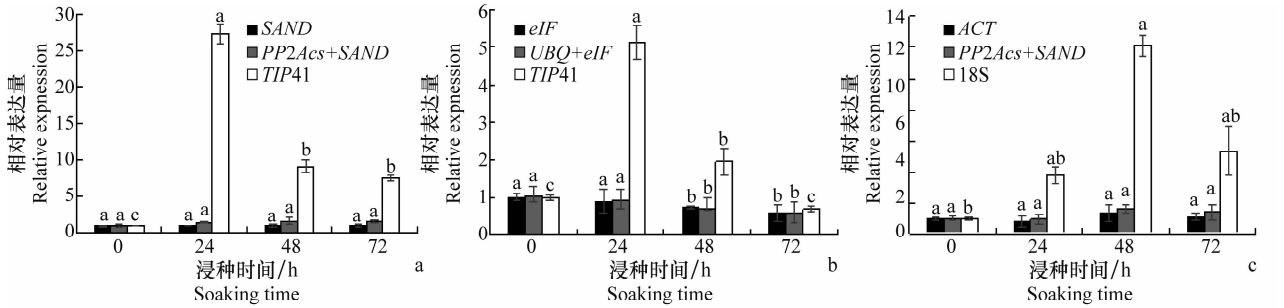
BestKeeper 通过计算参数的标准偏差值 SD(*Cq*)和变异系数 *CV*(%*Cq*)来评价内参基因的稳定性,SD 值大于 1 的基因被认为不可采用。在赤霉素处理的种子中,*eIF*(0.280)是最稳定的内参基因;脱落酸处理的种子中,*SAND*(0.300)最为稳定;对于水处理的种子,*ACT*(0.330)最稳定;对所有的样品进行分析得出,*eIF*(0.380)最为稳定,而 *TIP*41 和 18S 被列为不可采用的内参基因(表 2)。

2.2.4 RefFinder 分析

RefFinder 可以综合 geNorm、NormFinder、BestKeeper 和 Delta-*Ct* 4 种算法,列出 15 个候选内参基因的表达稳定性排名。对于赤霉素处理的种子,稳定性排名前三的内参基因是 *eIF*、*UBQ* 和 *EF*1*α*;对于脱落酸处理的种子,最稳定的前三个内参基因是 *SAND*、*PP2Acs* 和 *GR*;对于水处理的种子,最稳定的内参基因依次是 *ACT*、*SAND* 和 *PP2Acs*;对所有样品进行分析,稳定性排名前三的内参基因分别是 *PP2Acs*、*SAND* 和 *eIF*(表 2)。

2.3　内参基因稳定性的验证

用不同处理的刺萼龙葵种子为材料,分别用筛选出的最稳定和最不稳定的基因为内参,检测了基因 *ABI*5 的表达。结果显示,种子经脱落酸处理后,用最稳定的基因作为内参,发现 *ABI*5 的表达水平没有显著差异;而用最不稳定的内参时,得出的结果是 *ABI*5 表达水平在 24 h 显著升高,后又显著降低(图 4a)。对于赤霉素处理的种子,当用最稳定的内参基因时,*ABI*5 的相对表达水平在 0.5～1 倍之间;当用最不稳定的内参基因时,*ABI*5 在 24 h 时的表达量是 0 h 时的 5 倍(图 4b)。对于水处理的种子,当用最稳定的内参基因时,*ABI*5 的相对表达水平在 0.8～1.6 倍之间;当用最不稳定的内参基因时,*ABI*5 的表达水平在处理后 48 h 之内显著升高,后又显著降低(图 4c)。



a: 脱落酸处理; b: 赤霉素处理; c: 水处理。误差线代表标准误; 同一系列柱上含相同小写字母表示差异不显著 ($P<0.05$)

a: ABA treatment; b: GA treatment; c: II_2O treatment. The error bars represent standard error. The same lowercase letter among the same bar series indicates no significant difference ($P<0.05$)

图 4　不同处理下的 *ABI*5 经不同内参基因标准化后的相对表达水平

Fig. 4　Relative expression of *ABI*5 under different treatment normalized by different reference genes

3　讨论

qPCR 具有灵敏度高、定量准确、特异性强等优点,是目前研究基因表达的常用方法。为了保证基因表达分析结果的准确性,除了规范操作流程之外,选择表达稳定的内参基因作为参照标准也非常重要。国内外大量研究表明,内参基因表达的稳定性会受到试验处理的影响,因此在进行基因表达分析之前筛选适合的内参基因有利于保证结果的准确性[15]。近年来,数字 PCR(digital PCR,dPCR)技术发展迅速,虽然其较 qPCR 具有灵敏度更高、对抑制剂更耐受且不需要标准曲线与内参基因的优点,但易产生假阳性且成本较高;qPCR 凭借更广的检测动态范围和更低的成本,目前仍有很广的应用范围,不可能完全被 dPCR 取代[16]。刺萼龙葵在中国的快速传播蔓延造成了严重的经济损失,由于化学防

控与生物防控技术都存在一定的局限性，有学者利用刺萼龙葵种子具有复合休眠的特性，研究了其在不同胁迫处理下的萌发行为以及休眠相关基因的表达，力求找到更为高效的基于休眠萌发调控的防控措施[5-6]。为了筛选刺萼龙葵种子在激素处理下的最适内参基因，本研究使用 4 种算法对 15 个候选内参基因的表达稳定性进行了评估，不同软件得出的内参基因的稳定性排序有一定差异，这可能是因为每种软件的算法不同。geNorm 的缺点在于其倾向选择具有相似表达谱的基因，例如最稳定基因可能具有同一类功能[10]；NormFinder 在计算标准化因子时考虑了组内和组间差异，但并不能排除样品制备过程中产生的系统误差[11]；BestKeeper 通过考虑单个样本的内在方差（*InVar*）克服了这一缺点，但是该软件至少需要 3 个内参基因的数据才能进行分析[12]；RefFinder 可以综合 4 种统计算法（geNorm、NormFinder、BestKeeper 和 Delta-*Ct*）来得出基因表达稳定性的综合排名。因此，使用多种评价软件来分析筛选内参基因，可以确保结果的可靠性。

在本研究中，*eIF* 在赤霉素处理的种子中表达稳定；同样的，*eIF*4*A* 在亚麻 *Linum usitatissimum*[17] 以及干旱胁迫下的多花黑麦草 *Lolium multiflorum*[18] 中也表现出良好的稳定性。对于脱落酸处理的刺萼龙葵种子，内参基因 *SAND* 的表达最稳定；在不同组织的番茄[19] 以及脱落酸胁迫处理下的狼毒 *Stellera chamaejasme*[20] 中，*SAND* 同样稳定表达。在水处理过的刺萼龙葵种子中，稳定表达的基因为 *ACT*，相似的结果也在成熟的花生 *Arachis hypogaea* 种子中发现[21]；而在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 以及狗尾草 *Setaria viridis* 种子中，*ACT* 的表达并不稳定[22-23]。*PP2Acs* 在刺萼龙葵所有种子样品中的表达最稳定；相似的结果在不同非生物胁迫下的西伯利亚剪股颖 *Agrostis stolonifera*[24] 以及不同激素作用下的御谷 *Pennisetum glaucum*[25] 中也被发现。候选内参基因 *TIP*41 和 18S 在试验中稳定性差，原因可能是其在刺萼龙葵种子中的表达水平过高或过低。由此可见，过高或过低的转录丰度不利于内参基因在样品中的稳定表达。理想的内参基因应具有高度或中度的表达水平，*Cq* 值范围在 15～30 之间为宜。

*ABI*5 主要参与种子成熟和萌发过程中 ABA 信号的传导过程[26]。在本研究中，用最佳内参基因组合与用单个最稳定内参基因标准化后得出的 *ABI*5 的表达水平相似，而这两者与用最不稳定内参基因得出的结果有显著差异，说明本研究所筛选出的内参基因是可靠的。

本研究评估了刺萼龙葵 15 个候选内参基因在赤霉素、脱落酸以及水处理的种子中的表达稳定性。在这些候选基因中，*eIF* 在赤霉素处理的种子中表达最稳定，*SAND* 在脱落酸处理的种子中最稳定，*ACT* 在水处理的种子中最稳定，在所有样品中，*PP2Acs* 是最稳定的内参基因。研究结果将为刺萼龙葵种子中相关功能基因的表达分析提供依据。

参考文献

[1] BASSETT I J, MUNRO D B. The biology of Canadian weeds. 78. *Solanum carolinense* L. and *Solanum rostratum* Dunal. [J]. Canadian Journal of Plant Science, 1986, 66(4): 977-991.

[2] 关广清，高东昌，李文耀，等. 刺萼龙葵——一种检疫性杂草[J]. 植物检疫，1984，4(11)：25-28.

[3] 车晋滇，刘全儒，胡彬. 外来入侵杂草刺萼龙葵[J]. 杂草科学，2006(3)：58-60.

[4] 张少逸，张朝贤，杨连喜，等. 茎叶除草剂对刺萼龙葵的防治效果评价[J]. 植物保护，2012，38(5)：170-173.

[5] WEI Shouhui, ZHANG Chaoxian, CHEN Xuezheng, et al. Rapid and effective methods for breaking seed dormancy in buffalobur (*Solanum rostratum*) [J]. Weed Science, 2010, 58(2): 141-146.

[6] WEI Shouhui, ZHANG Chaoxian, LI Xiangju, et al. Factors affecting buffalobur (*Solanum rostratum*) seed germination and seedling emergence [J]. Weed Science, 2009, 57(5): 521-525.

[7] 张少逸，魏守辉，张朝贤，等. 刺萼龙葵种子休眠和萌发特性研究进展[J]. 杂草科学，2011，29(2)：5-9.

[8] BUSTIN S, BENES V, NOLAN T, et al. Quantitative real-time RT-PCR——a perspective [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2005, 34(3): 597-601.

[9] BUSTIN S A, BEAULIEU J F, HUGGETT J, et al. MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments [J/OL]. BMC Molecular Biology, 2010, 11:74.

[10] 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 Biology, 2002, 3: research0034.1.

[11] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ØRNTOFT 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 Research, 2004, 64(15): 5245-5250.

（下转 51 页）

[5] BURT P J A, RUTTER J, RAMIREZ F. Airborne spore loads and mesoscale dispersal of the fungal pathogens causing Sigatoka diseases in banana and plantain [J]. Aerobiologia, 1998, 14(2):209-214.

[6] GUO X W, FERNANDO W G D. Seasonal and diurnal patterns of spore dispersal by *Leptosphaeria maculans* from canola stubble in relation to environmental conditions [J]. Plant Disease, 2005, 89(1):97-104.

[7] CAO Xueren, DUAN Xiayu, ZHOU Yilin, et al. Dynamics in concentrations of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* conidia and its relationship to local weather conditions and disease index in wheat [J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 132(4): 525-535.

[8] 刘伟, 姚冬明, 范洁茹, 等. 田间空气中小麦白粉菌分生孢子的动态监测研究[J]. 植物病理学报, 2016, 46(1):112-118.

[9] 闫征远, 范洁茹, 刘伟, 等. 基于田间空气中病菌孢子浓度的小麦白粉病病情估计模型研究[J]. 植物病理学报, 2017, 47(2):253-261.

[10] 盛宝钦, 段霞瑜. 对记载小麦成株白粉病"0～9 级法"的改进[J]. 北京农业科学, 1991(1):38-39.

[11] SADY'S M, KENNEDY R, SKØTH C A. An analysis of local wind and air mass directions and their impact on *Cladosporium* distribution using HYSPLIT and circular statistics [J]. Fungal Ecology, 2015, 18: 56-66.

[12] AYLOR D E, LUKENS R J. Liberation of *Helminthosporium maydis* spores by wind in field [J]. Phytopathology, 1974, 64(8): 1136-1138.

(责任编辑:田　喆)

(上接 46 页)

[12] 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]. Biotechnology Letters, 2004, 26(6): 509-515.

[13] XIE Fuliang, XIAO Peng, CHEN Dongliang, et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs [J]. Plant Molecular Biology, 2012, 80(1): 75-84.

[14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[15] BRUNNER A M, YAKOVLEV I A, STRAUSS S H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies [J/OL]. BMC Plant Biology, 2004, 4(1): 14. DOI: 10.1186/1471-2229-4-14.

[16] 冯兆民,舒跃龙. 数字 PCR 技术及其应用进展[J]. 病毒学报, 2017, 33(1): 103-107.

[17] HUIS R, HAWKINS S, NEUTELINGS G. Selection of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.)[J/OL]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1): 71. DOI:10.1186/1471-2229-10-71.

[18] LIU Qiuxu, QI Xiao, YAN Haidong, et al. Reference gene selection for quantitative real-time reverse-transcriptase PCR in annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) subjected to various abiotic stresses [J/OL]. Molecules, 2018, 23(1): 172. DOI: 10.3390/molecule.s23010172.

[19] EXPÓSITO-RODRÍGUEZ M, BORGES A A, BORGES-PÉREZ A, et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process [J/OL]. BMC Plant Biology, 2008, 8(1): 131. DOI: 10.1186/1471-2229-8-131.

[20] LIU Xin, GUAN Huirui, SONG Min, et al. Reference gene selection for qRT-PCR assays in *Stellera chamaejasme* subjected to abiotic stresses and hormone treatments based on transcriptome datasets [J/OL]. PeerJ, 2018, 6: e4535. DOI:10.7717/peerj.4535. eCollection 2018.

[21] JIANG Shengjuan, SUN Yujun, WANG Songhua. Selection of reference genes in peanut seed by real-time quantitative polymerase chain reaction [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(10): 2191-2196.

[22] DEKKERS B J, WILLEMS L, BASSEL G W, et al. Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in Arabidopsis and tomato seeds [J]. Plant and Cell Physiology, 2012, 53(1): 28-37.

[23] MARTINS P K, MAFRA V, DE SOUZA W R, et al. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in *Setaria viridis* [J/OL]. Scientific Reports, 2016, 6: 28348. DOI: 10.1038/srep28348.

[24] CHEN Yu, HU Baoyun, TAN Zhiqun, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in creeping bentgrass involved in four abiotic stresses [J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(10): 1825-1834.

[25] SAHA P, BLUMWALD E. Assessing reference genes for accurate transcript normalization using quantitative real-time PCR in pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] [J/OL]. PLoS ONE, 2014, 9(8): e106308. DOI:10.1371/journal.pone.0106308. eCollection 2014.

[26] DEKKERS B J, HE H, HANSON J, et al. The *Arabidopsis* delay of germination 1 gene affects *ABSCISIC* acid insensitive 5 (*ABI*5) expression and genetically interacts with *ABI*3 during *Arabidopsis* seed development [J]. The Plant Journal, 2016, 85(4): 451-465.

(责任编辑:杨明丽)