

红掌佛焰苞基因qRT-PCR分析中内参基因的筛选

杨澜^{1,2}, 杨光穗¹, 李崇晖¹, 牛俊海¹, 尹俊梅^{1*}

(1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 农业部华南作物基因资源与种质创制重点实验室, 海南 儋州 571737; 2. 贵州省园艺研究所, 贵阳 550006)

摘要: 为筛选红掌(*Anthurium andraeanum* Linden)中稳定表达、可用于佛焰苞中实时荧光定量 PCR 分析(qRT-PCR)的内参基因, 对 5 个组成型表达基因 *EF1-a*、*UBQ7*、*ACTB*、*GADPH*、*His3* 进行表达稳定性分析, 并利用所筛选的内参基因研究红掌的二氢黄酮醇还原酶基因(*dfr*)的表达水平。结果表明, 5 种内参基因在不同品种间的表达稳定性不同。据内参基因标准化因子的配对差异分析($V_{n/n+1}$), 判定内参基因的最适数目为 2, *ACTB* 和 *UBQ7* 在红掌不同品种及佛焰苞发育不同阶段中表达均稳定, 是理想的内参基因。*dfr* 在不同品种的红掌佛焰苞及佛焰苞发育过程中均有表达, 且 *dfr* 表达水平的变化趋势一致, 因此, 所选内参基因是合适的。

关键词: 红掌; 佛焰苞; 实时荧光定量 PCR; 内参基因

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.01.008

Screening of Reference Genes in *Anthurium andraeanum* Spathes for qRT-PCR Analysis

YANG Lan^{1,2}, YANG Guang-sui¹, LI Chong-hui¹, NIU Jun-hai¹, YIN Jun-mei^{1*}

(1. Institute of Tropical Crops Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture, Danzhou 571737, China; 2. Horticultural Research Institute of Guizhou Province, Guiyang 550006, China)

Abstract: In order to screening stable reference genes that can be used to real-time quantitative PCR (qRT-PCR) analysis in *Anthurium andraeanum* spathes, five constitutively expressed genes, including *EF1-a*, *UBQ7*, *ACTB*, *GADPH* and *His3*, were analyzed expression stability by using qRT-PCR, and the expression of dihydroflavonol 4-reductase gene (*dfr*) was analyzed by using screened reference gene. The results showed that the expression stabilities of five reference genes were different among different cultivars. On the basis of the normalization factor $V_{n/n+1}$, the optimum number of reference gene was two. The expression of *ACTB* and *UBQ7* were the most stable in different cultivars and different development stages of *A. andraeanum* spathes, so that they were ideal reference genes. When *ACTB* and *UBQ7* were used as reference genes, the gene *dfr* expressed in different cultivars and different development stages of *A. andraeanum* spathes, and the change trend of *dfr* expression were consistent. Thus, both *ACTB* and *UBQ7* were suitable as reference genes for *A. andraeanum* spathes.

Key words: *Anthurium andraeanum*; Spathe; qRT-PCR; Reference gene

收稿日期: 2014-04-16 接受日期: 2014-09-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101578, 31201652); 海南省重大科技项目(ZDZX2013012); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1630032012017)资助

作者简介: 杨澜(1990~), 女, 硕士, 主要从事园林植物与观赏植物研究。E-mail: 281806994@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: yinjunmei2004@163.com

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)是一种准确、快速的新型核酸定量分析技术,主要是根据荧光共振能量转移原理,在 PCR 反应体系中加入特定的荧光标记基因,通过实时监测 PCR 过程积累的荧光信号分析目标基因的表达量,具有特异性强、灵敏度高、重复性好、全封闭反应等优点^[1-3]。为了消除不同样品内部及样品间在核糖核酸(RNA)产量、质量以及反转录效率上可能存在的差异,通常采用内参基因进行数据校正和标准化^[4]。理想的内参基因在各种实验环境和影响因子下,在各类组织或细胞中均能相对稳定表达^[5]。没有绝对稳定表达的理想基因,只有在特定试验环境或因素下,在一定类型的细胞或组织中“有范围”的恒定^[4,6-7]。因此,根据不同试验材料及条件,筛选相对合适的内参基因进行数据校正和标准化,才能对目的基因表达进行准确可靠的定量^[8-9]。经典的内参基因有肌动蛋白基因(*ACT*)、 α 微管蛋白基因和 β 微管蛋白基因(*TUA*, *TUB*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*)、转录延伸因子基因(*EF1-a*)和多聚泛素酶基因(*UBQ*)等,其中 *ACT*、*TUA*、*TUB* 是生物体维持生命活动所必需的细胞器骨架的基本组分, *GAPDH*、*EF1-a*、*UBQ* 则参与生物体的基本生化代谢过程。*ACT* 基因在真核细胞进化过程中高度保守,而 *TUA* 和 *TUB* 基因则具有良好的保守性。

红掌(*Anthurium andraeanum* Linden)为天南星科(Araceae)安祖花属多年生草本植物,其主要观赏部位佛焰苞形状独特、花期长且苞片颜色基调以红色为主,少部分有白色、橙色、紫色、绿色和粉色等。培育新奇花色是红掌育种的重要课题,日渐成熟的分子育种技术有望缩短这一进程。这就需要阐明红掌佛焰苞中花色素的生物合成途径。首先应了解类黄酮代谢途径相关基因(如二氢黄酮醇还原酶基因 *dfr*、花青素合酶基因 *ANS* 等)在红掌佛焰苞中的表达模式,有研究指出红掌佛焰苞的花色苷生物合成的控制点不同于其他植物的花器官,且认为 *dfr* 是关键调控点^[10]。因此 *dfr* 是红掌佛焰苞花色苷合成并决定佛焰苞颜色的最关键基因之一。

虽然 Gopaulchan 等^[11]研究了 18S 核糖体 RNA (18S)、*ACT*、*TUB* 等 8 个内参基因在白色、红色和橙色佛焰苞的红掌、发育不同阶段及材料不同采摘时间段的表达稳定性,认为细胞色素 P450 酶基因 *CYP* 和多聚泛素酶基因 *UBQ5* 可作为红掌内参基因。但是由于被试品种和内参基因不同且本研

究选择的佛焰苞颜色变异更加丰富,为缩小目的基因在不同植物样本中表达的差异,本研究利用实时荧光定量 PCR 方法评价 *EF1-a*、*UBQ7*、 β -肌动蛋白基因 *ACTB*、*GADPH*、组蛋白 *His3* 等 5 种内参基因在不同品种红掌佛焰苞(‘Tropical’、‘Cheers’、‘Coffee’、‘Acropolis’、‘Rapido’和‘Midor’)和佛焰苞发育过程中的表达水平,用 geNorm、NormFinder 分析其表达稳定性,并利用筛选到的内参基因研究二氢黄酮醇还原酶基因 *dfr* 在红掌不同品种的佛焰苞及佛焰苞发育不同阶段的表达水平,旨在选择合适的内参基因以研究花色基因在红掌中的表达模式,为进一步探究红掌佛焰苞颜色变异的原因和阐明红掌花色形成的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

选取红掌(*Anthurium andraeanum* Linden) ‘Tropical’(红色)‘Cheers’(浅粉红色)‘Coffee’(咖啡色)‘Acropolis’(白色)‘Rapido’(紫红色)和‘Midor’(绿色)共 6 个品种定植 2 年正常开花的健康植株,均为购自安祖公司的组培苗。依据 Collett 等^[11]的方法将佛焰苞发育过程划分为 4 个阶段:佛焰苞初现、花梗全长为成熟时的 2/3、花梗不再伸长且佛焰苞卷曲松弛待展开和佛焰苞刚展开并完全伸展。于晴天早晨 9:00–10:00 分别采集 6 个品种 4 个发育阶段的佛焰苞,液氮冷冻, -80°C 冰箱保存。重复 3 次。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

总 RNA 提取使用通用植物总 RNA 提取试剂盒(Bioteke 公司),经 DNAase (购自 Thermo 公司)处理,紫外分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 浓度和质量。使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(购自 Thermo 公司)合成 cDNA 第一条链后置 -20°C 冰箱保存。

1.3 内参基因的筛选及其表达稳定性检测

从本实验室自建的红掌 cDNA 文库中选择 *EF1-a*、*UBQ7*、*ACTB*、*GADPH*、*His3* 等 5 种内参基因及 *dfr* 的转录组测序结果(表 1)。利用 Primer Premier 5.0 软件各设计引物 2 对,由上海 Sangon 公司合成。采用引物跨内含子设计方法,对

以上基因在‘Tropical’佛焰苞 cDNA 及 DNA 中进行常规 PCR 扩增, 扩增程序为 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 63℃ 退火 30 s (每个循环降 1℃), 72℃ 延伸 2.5 min, 5 个循环; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2.5 min, 28 个循环; 72℃ 延伸 10 min。回收、纯化清晰可用的目的片段, 经 pMD18-T 载体克隆后送华大基因测序。根据测序结果设计基因的 qRT-PCR 引物, 利用常规 PCR 在模板 cDNA 及 DNA 中定性检测内参引物的扩增情况及特异性。利用 Eppendorf (Realplex4 型) RealTime-PCR 仪, 以 cDNA 第一链为模板依次稀释 6 个梯度, 每个梯度稀释 5 倍, 每个反应 2 次重复。反应程序按照 SYBR premix Ex Taq™ II 试剂盒(购自 TaKaRa 公司)说明书要求进行。扩增完毕后温度从 58℃ 缓慢递增至 95℃, 进行熔解曲线分析以确定扩增产物的特异性。通过荧光定量 PCR 仪自带软件 Realplex4 自动获得引物扩增效率、解链温度等系列参数。引物扩增效率(E)计算公式为: $E=10^{-1/(\text{slope})}$ 。利用筛选到的内参基因, 采用相同的定量 PCR 反应体系和程序, 进行二羟基黄酮醇还原酶基因(dfr)的表达水平分析。

表 1 实时荧光定量 PCR 的引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
<i>EF1-a</i>	F: GCCGGTATTTCTAAGGATGGTCAG R: GGAACAAATGGAATCTTGTCAGGG
<i>UBQ7</i>	F: GAAAACCCTAACGGGGAAGACGA R: CCTCCCCTAAGCCTCAAAACCAG
<i>ACTB</i>	F: ACATTGTTCTGAGCGGTGGATCT R: CCGACTCATCGTATTCTGCCTTT
<i>GADPH</i>	F: TTTGGGTGACAGCAGGTCGAG R: AAGCCACCACTGCCAACCG
<i>His3</i>	F: CGTGAGATTGCCAGGACTTC R: TCCACAGCACCCATCAGC
<i>dfr</i>	F: CTCGCCCTCATCACAAGGAA R: ACGTCGAACTCAGGGTAGCG

1.4 数据分析

以佛焰苞的 cDNA 稀释液作为模板, 根据 $2^{-\Delta Cq}$ 计算内参基因的相对表达量。采用 geNorm 软件计算内参基因的平均表达稳定值(M)并进行排序(M

值越小, 表达就越稳定), 同时计算内参基因的标准因子配对差异度($V_{n/n+1}$)以判定内参基因最适数目。运用 NormFinder 软件计算不同试验条件下各内参基因表达稳定值(S), 用 SAS 9.0 进行数据间的统计分析, Origin 8 作图。

2 结果和分析

2.1 荧光定量 PCR 的效率

由表 2 可知, 5 种内参基因的标准曲线回归系数为 0.989~0.999, 说明 cDNA 初始模板量与相应的 C_t 值线性关系良好, 而各基因的扩增效率为 92%~101%, 表明荧光定量 PCR 反应的有效性, 且 5 个内参基因的扩增效率差异不显著($P>0.05$)。模板与 C_t 值的较好线性关系和反应的有效性确保了荧光定量结果的准确性和可靠性。

2.2 内参基因的筛选

2.2.1 内参基因的表达稳定性

geNorm 软件是基于标准差, 与默认的平均表达稳定值 $M=0.5$ 进行比较, 若内参基因的 $M<0.5$, 可考虑作为内参基因, 且 M 值越小说明基因稳定性越好。从图 1: B 可看出, 5 种内参基因的平均表达稳定值 M 为 $GADPH=His3<UBQ7<ACTB<EF1-a$ 。这与用 NormFinder 软件分析的结果($GADPH<UBQ7<ACTB<His3<EF1-a$)有出入。geNorm 程序默认的 V 值为 0.15, 若 $V_{n/n+1}<0.15$, 则不必引入新的内参基因。本研究中, $V_{2/3}=0.141$, 因此本试验最适内参基因数目为 2 个。

2.2.2 不同发育阶段内参基因表达的稳定性

在‘Tropical’佛焰苞发育的不同阶段, 5 种内参基因的相对表达量差异极显著($P<0.01$)。geNorm 软件分析不同内参基因的表达稳定值 M 均小于 0.5, 以 $His3$ 和 $EF1-a$ 的最小, 说明其表达最稳定, 其次是 $ACTB$ 、 $UBQ7$ 和 $GADPH$ (图 2: B)。标准因子配对变异度显示 $V_{2/3}=0.131$ 。NormFinder 软件的分析结果 $ACTB<His3<EF1-a<UBQ7<GADPH$ 。

5 种内参基因在‘Rapido’佛焰苞发育第 2 阶段的表达量均最高(图 3: A)。geNorm 软件分析各内参基因的 M 值为 $GADPH=ACTB<EF1-a<UBQ7<His3$, 标准因子配对变异度显示 $V_{2/3}=0.055$ 。NormFinder 软件分析的 5 种内参基因的 S 值为 $ACTB=GADPH<UBQ7<EF1-a<His3$ 。

表 2 Real-time RT-PCR 检测定量引物的扩增效率

Table 2 Amplification efficiency of qRT-PCR primers used in real-time RT-PCR analysis

引物 Primer	标准曲线方程 Standard curve equation	回归系数 Regression coefficient (R^2)	扩增效率 Amplification efficiency (%)
<i>EF1-a</i>	$y = -3.302x + 35.05$	0.989	101
<i>UBQ7</i>	$y = -3.302x + 37.25$	0.994	101
<i>ACTB</i>	$y = -3.517x + 38.16$	0.998	92
<i>GADPH</i>	$y = -3.520x + 36.35$	0.991	92
<i>His3</i>	$y = -3.334x + 34.77$	0.999	100

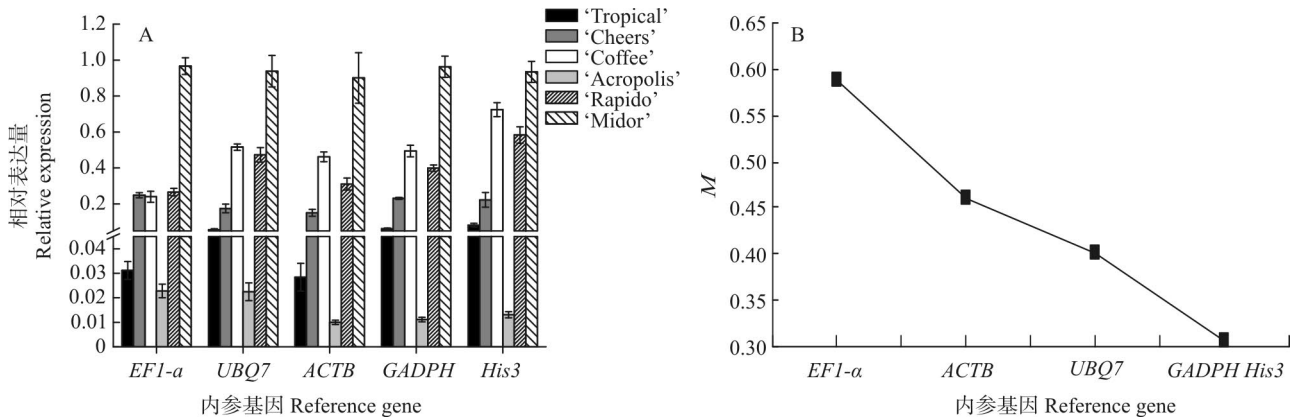


图 1 内参基因在佛焰苞第 3 发育阶段中的相对表达量(A)及平均表达稳定值 M (B)

Fig. 1 Relative expression of reference genes (A) and expression stability value M (B) in the 3th developmental stage of spathe

表 3 5 种内参基因在佛焰苞发育第 3 阶段中表达稳定度的排序

Table 3 Rank of five reference genes in the 3th development stages of spathe by stability values

内参基因 Reference gene	M	排序 Rank	S	排序 Rank	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation
<i>GADPH</i>	0.306	1	0.166	1	0.33	91.59
<i>UBQ7</i>	0.402	2	0.201	2	0.33	91.56
<i>ACTB</i>	0.461	3	0.262	3	0.33	104.47
<i>His3</i>	0.306	1	0.308	4	0.35	84.28
<i>EF1-a</i>	0.587	4	0.384	5	0.34	116.51

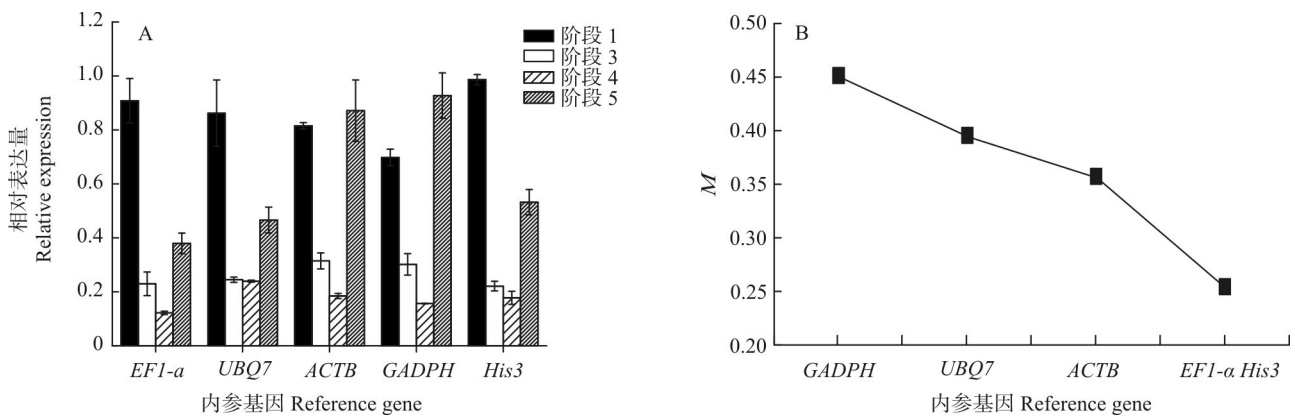


图 2 内参基因在‘Tropical’佛焰苞发育不同阶段的相对表达量(A)和平均表达稳定值 M (B)

Fig. 2 Relative expression (A) and average expression stability M (B) of reference gene at four development stages of ‘Tropical’ spathe

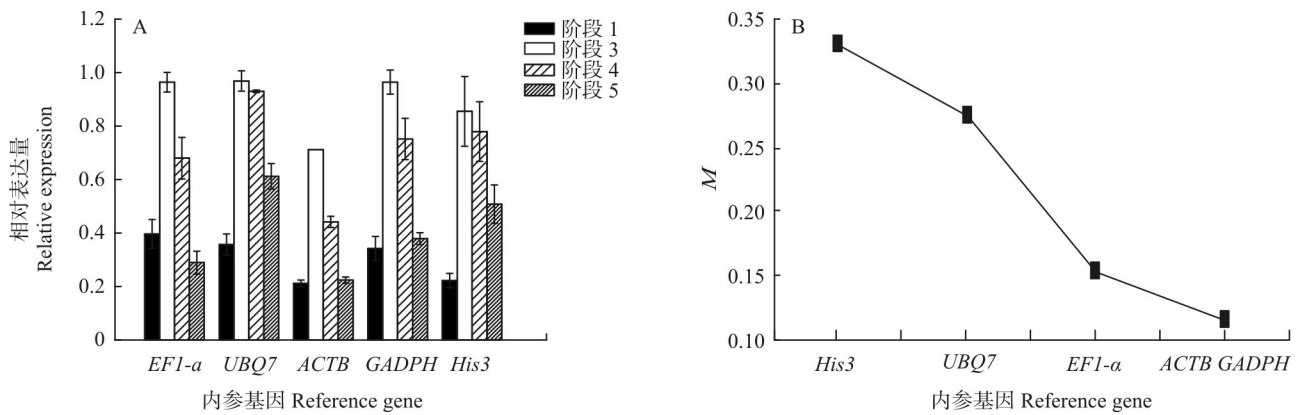


图3 内参基因在‘Rapido’佛焰苞发育不同阶段的相对表达量(A)及平均表达稳定值 M (B)

Fig. 3 Relative expression (A) and average expression stability M (B) of reference genes in four development stages of ‘Rapido’ spathe

‘Acropolis’佛焰苞发育过程中，5种内参基因的表达量同样是在第2阶段达到最高(图4:A)。运用geNorm计算各基因平均表达稳定值M,结果表明只有ACTB、UBQ7和EF1-a的M值小于0.5。图4:B所示最稳定表达的内参基因为UBQ7和ACTB。标准因子配对变异度显示 $V_{2/3}=0.130$ 。NormFinder软件分析的结果是 $EF1-a < ACTB < UBQ7 < His3 < GADPH$,与geNorm的结果相似。

综合分析，5种内参基因在不同品种红掌和不

同发育阶段的佛焰苞 mRNA 中的表达稳定性差异极显著,从表3、4可以看出GADPH在‘Acropolis’佛焰苞中表达稳定值大于0.5, His3在‘Acropolis’佛焰苞中表达稳定值同样大于0.5, EF1-a在不同品种红掌佛焰苞中表达稳定值也大于0.5,而ACTB和UBQ7不论是在不同品种红掌还是佛焰苞发育不同阶段,其表达稳定性均稳定,适合作为红掌佛焰苞中基因实时定量PCR分析中的内参基因。

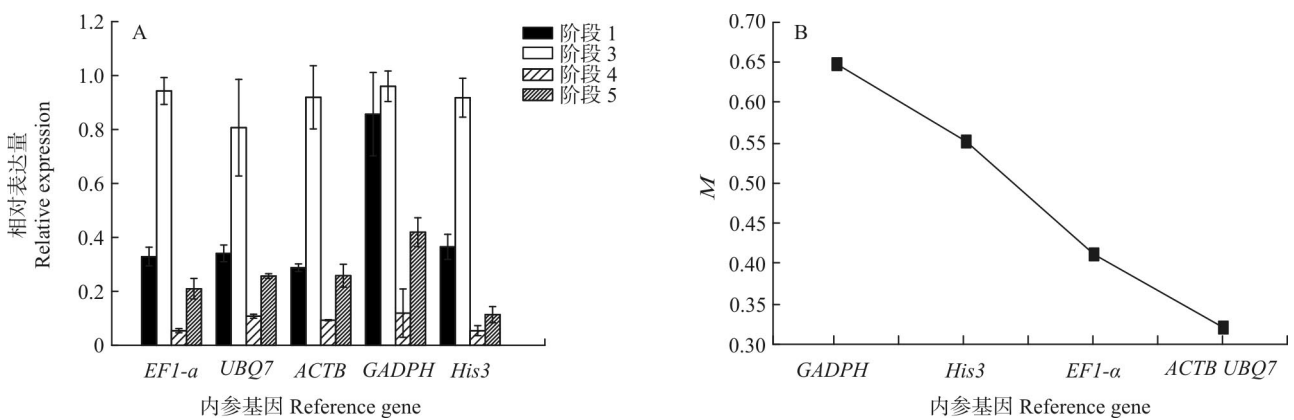


图4 内参基因在‘Acropolis’佛焰苞发育不同阶段相对表达量(A)及平均表达稳定值 M (B)

Fig. 4 Relative expression (A) and average expression stability M (B) of reference genes in four development stages of ‘Acropolis’ spathe

2.4 dfr的表达

取红掌6个品种第3发育阶段的佛焰苞,以ACTB和UBQ7为内参基因,采用相同的定量PCR反应体系,进行dfr表达水平的分析。从图5可见,2种内参基因的定量结果变化趋势一致。因此,不同品种红掌佛焰苞的定量分析中可取ACTB和

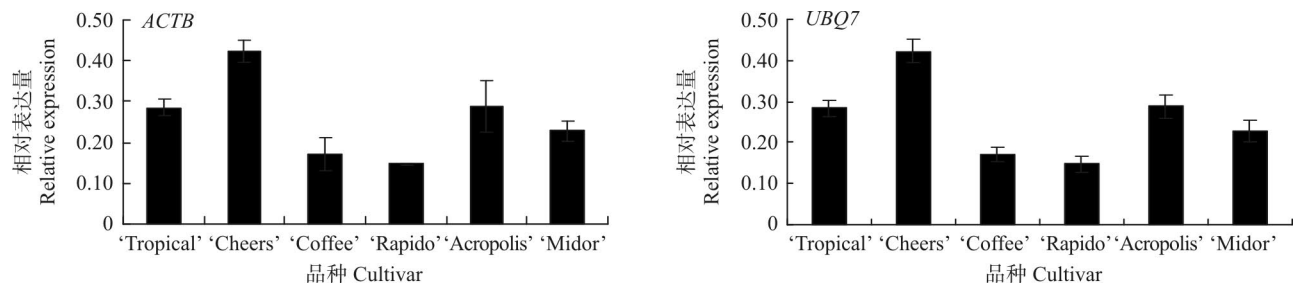
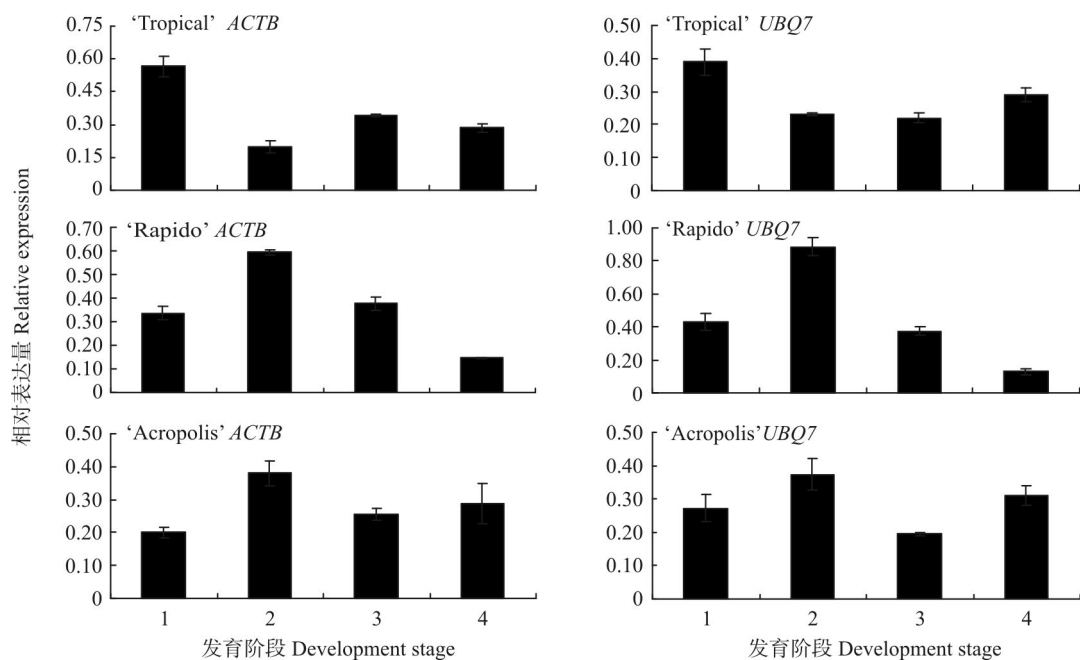
UBQ7校正基因表达量的平均值。

同样以ACTB和UBQ7为内参基因,验证‘Tropical’、‘Rapido’和‘Acropolis’佛焰苞4个发育阶段中dfr的表达水平。如图6所示,在3个品种佛焰苞的发育过程中,dfr的表达水平变化趋势一致,说明所选内参基因合适。

表 4 内参基因在红掌佛焰苞中表达稳定度的排序

Table 4 Rank of reference genes in anthurium spathe by stability values

材料 Material	内参基因 Reference gene	<i>M</i>	排序 Rank	<i>S</i>	排序 Rank	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation
'Tropical'	<i>His3</i>	0.252	1	0.147	2	0.35	71.96
	<i>ACTB</i>	0.355	2	0.110	1	0.31	59.02
	<i>EF1-a</i>	0.252	1	0.204	3	0.30	75.23
	<i>UBQ7</i>	0.394	3	0.220	4	0.24	55.74
	<i>GADPH</i>	0.451	4	0.277	5	0.34	64.99
'Rapido'	<i>GADPH</i>	0.116	1	0.142	2	0.28	46.85
	<i>ACTB</i>	0.116	1	0.122	1	0.22	53.25
	<i>EF1-a</i>	0.154	2	0.156	4	0.29	49.02
	<i>UBQ7</i>	0.275	3	0.146	3	0.28	39.34
	<i>His3</i>	0.330	4	0.227	5	0.27	46.46
'Acropolis'	<i>EF1-a</i>	0.411	2	0.187	1	0.34	88.39
	<i>ACTB</i>	0.320	1	0.268	2	0.36	88.26
	<i>UBQ7</i>	0.320	1	0.303	3	0.24	67.87
	<i>His3</i>	0.553	3	0.351	4	0.35	98.65
	<i>GADPH</i>	0.649	4	0.418	5	0.39	67.07

图 5 佛焰苞中 *dfr* 的表达Fig. 5 Expression of *dfr* in spathe图 6 佛焰苞发育过程中 *dfr* 的表达Fig. 6 Expression of *dfr* in spathe development stages

4 讨论

红掌作为极具观赏价值的盆花和切花越来越受到人们的追捧,市场十分畅销,然而在品种选育上还存在很大差距,具有自主知识产权的新花色红掌品种仍然不多^[13]。创造新奇花色成为红掌育种的重要课题,因此需要了解红掌花色色素合成和调控的分子机制。为研究红掌佛焰苞中花色基因表达模式,本研究利用实时荧光定量 PCR 方法评价 5 种内参基因(*EF1-a*、*UBQ7*、*ACTB*、*GADPH* 和 *His3*)的平均表达稳定性,以筛选出定量分析红掌不同品种和不同发育阶段佛焰苞中花色基因表达水平的最适内参基因。

合适的内参基因是用于荧光定量 PCR 中识别目的基因准确表达模式的关键因素^[14]。理想的内参基因应具备在所有组织及细胞类型中均有表达,在细胞组成及基本功能的维持中起着重要作用;在不同环境和试验因素下稳定表达,不受任何外内源因素的影响;表达稳定且与目标基因表达水平相似^[15-16]。但任何一个内参基因的稳定表达都是相对的。因此,应根据具体试验体系筛选合适数目的内参基因。本研究挑选 6 个品种红掌的佛焰苞,分别探究 5 种内参基因在不同品种的佛焰苞及 3 个品种(红色‘Tropical’、紫色‘Rapido’、白色‘Acropolis’)佛焰苞发育过程中的表达稳定性。运用 geNorm、NormFinder 和统计软件评价各内参基因的表达稳定性。通过 geNorm 软件内参基因标准化因子的配对差异分析($V_{n/n+1}$),可选择最适数目的内参基因进行 qPCR 结果的校正。本研究中最优内参基因数目均为 2 个。5 种内参基因在不同品种的红掌佛焰苞及佛焰苞发育过程中的表达稳定性差异极显著($P < 0.01$)。不同品种的佛焰苞中, *GADPH* 和 *His3* 为表达最稳定的内参基因,但 *GADPH* 在‘Tropical’和‘Acropolis’佛焰苞的发育不同阶段中表达稳定性最差。许多研究也曾指出 *GADPH* 是表达稳定性较差的内参基因^[11,17-19]。而在红掌‘Tropical’佛焰苞发育过程中, *EF1-a* 和 *His3* 为表达最稳定的内参基因。*His3* 也是棉花(*Gossypium hirsutum*)不同发育阶段中表达水平最稳定的内参基因之一^[20],但 *His3* 在‘Rapido’佛焰苞发育过程中的表达稳定性最差。也有研究表明 *EF1-a* 在杨树(*Populus tremulas*)^[21]、黄瓜(*Cucumis hystrix* / *C. sativus*)^[14]及水稻(*Oryza sativa*)^[17]不同

组织中均是最稳定的内参基因。‘Rapido’佛焰苞发育过程中表达稳定性最好的内参基因为 *ACTB* 和 *GADPH*。‘Acropolis’佛焰苞发育过程中, *ACTB* 和 *UBQ7* 为表达稳定性最好的内参基因。有研究表明在瓜叶菊(*Pericallis hybrida*)发育不同阶段表达稳定性最好的内参基因为 *ACTB*^[22];周兰等^[23]的研究认为 *UBQ* 是苹果不同基因型和发育不同阶段表达最稳定的内参基因,而 *UBQ7* 是棉花不同组织中表达稳定性最好的内参基因之一^[20]。综合分析, *ACTB* 和 *UBQ7* 为红掌不同品种佛焰苞及佛焰苞发育过程中进行基因定量表达分析最理想的内参基因。

dfr 是花色苷生物合成中的“后期结构基因”,且能催化无色的二氢山奈酚(DHK)、二氢槲皮素(DHQ)和二氢杨梅黄素(DHM)还原成不稳定的无色花色素。本实验利用已筛选出的 *ACTB* 和 *UBQ7* 作为内参基因,分析 *dfr* 在 6 个品种红掌佛焰苞同一发育阶段及‘Tropical’、‘Rapido’、‘Acropolis’佛焰苞发育 4 个阶段的表达水平,结果表明,该基因的表达变化趋势基本一致,说明 *ACTB* 和 *UBQ7* 适合校正不同品种红掌佛焰苞和佛焰苞不同发育阶段中花色基因的表达量。

参考文献

- [1] Dallas P B, Gottardo N G, Firth M J, et al. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR: How well do they correlate? [J] BMC Gen, 2005, 6(1): 50-59.
- [2] Yang F L, Yue H, Xie X L, et al. Development of real-time PCR assay for duck *GADPH* gene [J]. J SW Univ Nationalities (Nat Sci), 2007, 33(1): 92-95.
杨发龙, 岳华, 谢秀兰, 等. 鸭*GADPH*基因实时荧光定量PCR方法的建立 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2007, 33(1): 92-95.
- [3] Ma L, Xie X L, Yue H. Establishment of real-time PCR for β -actin gene of chicken [J]. Chin Anim Husb Veter Med, 2007, 34(2): 73-75.
马莉, 谢秀兰, 岳华. 鸡 β -actin基因实时荧光定量PCR方法的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(2): 73-75.
- [4] Zhang Y J, Zhu Z F, Lu R, et al. Selection of control genes in transcription analysis of gene expression [J]. Prog Biochem Biophy, 2007, 34(5): 546-550.
张艳君, 朱志峰, 陆融, 等. 基因表达转录分析中内参基因的选择 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(5): 546-550.
- [5] Suzuki T, Higgins P J, Crawford D R. Control selection for RNA quantitation [J]. Biotechnology, 2000, 29(2): 332-337.
- [6] Selvey S, Thompson E W, Matthaek K, et al. β -Actin: An unsuitable internal control for RT-PCR [J]. Mol Cell Probes, 2001, 15(5): 307-311.

- [7] Liu D W, Chen S T, Liu H P. Choice of endogenous control for gene expression in nonsmall cell lung cancer [J]. *Eur Respir J*, 2005, 26(6): 1002–1008.
- [8] Hu R B, Fan C M, Fu Y F. Reference gene selection in plant real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) [J]. *J Agri Sci Techn*, 2009, 11(6): 30–36.
胡瑞波, 范成明, 傅永福. 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*, 2009, 11(6): 30–36.
- [9] Wang Z W. Selection of reference genes from different development periods and tissues in Zi Geese [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2011: 1–53.
王忠伟. 籽鹅不同发育时期和不同组织内参基因选择的研究 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2011: 1–53.
- [10] Vern E C, Paula E J, Kathy E S, et al. Temporal and spatial expression of flavonoid biosynthetic genes in flowers of *Anthurium andraeanum* [J]. *Physiol Plant*, 2004, 122(3): 297–304.
- [11] Gopaulchan D, Lennon A M, Umaharan P. Identification of reference genes for expression studies using quantitative RT-PCR in spathe tissue of *Anthurium andraeanum* (Hort.) [J]. *Sci Hort*, 2013, 153(1): 1–7.
- [12] Collette V E. A molecular analysis of flower colour development in an ornamental monocot (*Anthurium andraeanum*) [D]. Palmerston North, New Zealand: Massey University, 2002: 37–110.
- [13] Du P, Shao X B. Research progress of *Anthurium* in China [J]. *Jiangsu Agri Sci*, 2011, 39(6): 325–327.
杜平, 邵小斌. 我国红掌的研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(6): 325–327.
- [14] Wan H, Zhao Z, Qian C, et al. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber [J]. *Anal Biochem*, 2010, 399(2): 257–261.
- [15] 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.
- [16] Tong Z G, Gao Z H, Wang F, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR [J]. *BMC Mol Biol*, 2009, 10(1): 1–13.
- [17] Jain M, Nijhawan A, 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.
- [18] 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]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8(1): 131–142.
- [19] Long X Y, Wang J R, Ouellet T, et al. Genome-wide identification and evaluation of novel internal control genes for Q-PCR based transcript normalization in wheat [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 74(3): 307–311.
- [20] Tu L L, Zhang X L, Liu D, et al. Screening of reference genes for real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) in cotton fiber development and the process of somatic embryogenesis [J]. *Chin Sci Bull*, 2007, 52(20): 2379–2385.
涂礼莉, 张献龙, 刘迪, 等. 棉花纤维发育和体细胞胚发生过程中实时定量PCR内对照基因的筛选 [J]. *科学通报*, 2007, 52(20): 2379–2385.
- [21] Xu M, Zhang B, Su X, et al. Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Populus* [J]. *Anal Biochem*, 2011, 408(2): 337–339.
- [22] Jin X H, Fu J X, Dai S L, et al. Reference gene selection for qPCR analysis in cineraria developing flowers [J]. *Sci Hort*, 2013, 153(1): 64–70.
- [23] Zhou L, Zhang L Y, Zhang C X, et al. Screening of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in apple (*Malus × domestica*) [J]. *J Fruit Sci*, 2012, 29(6): 965–970.
周兰, 张利义, 张彩霞, 等. 苹果实时荧光定量PCR分析中内参基因的筛选 [J]. *果树学报*, 2012, 29(6): 965–970.