

## 研究报告 Original Papers

小麦与叶锈菌互作过程中实时定量PCR内参基因的选择及*TaSGR*基因的表达分析李晖<sup>1,\*</sup>, 牛宏伟<sup>2,\*</sup>, 刘娜<sup>1</sup>, 陈琰<sup>1</sup>, 侯春燕<sup>1,\*\*</sup>, 王冬梅<sup>1,\*\*</sup><sup>1</sup>河北农业大学生命科学学院植物逆境实验室, 河北保定071001; <sup>2</sup>河北省环保产品质量监督检验院, 石家庄050000

**摘要:** 实时定量PCR (RT-qPCR)是确定基因功能的重要手段之一。为了量化基因表达水平,选择合适的内参基因是实验准确的先决条件。本文以小麦*ACTIN1*、*ACTIN2*、*GAPDH*、*GAPDH2*、*ATUB*、*BTUB*、*EF1A1*、*EF1A2*和*TA*共9个基因作为候选内参基因,在小麦(*Triticum aestivum*)与叶锈菌(*Puccinia triticina*)互作过程中,利用RT-qPCR技术,检测这9个基因的表达情况。经geNorm和NormFinder软件分析可知,在小麦接种叶锈菌后不同时间点,*GAPDH*和*TA*基因的表达稳定性较高,可以作为RT-qPCR的内参基因。在此基础上,利用筛选得到的最适内参*GAPDH*对小麦与叶锈菌互作过程中,*TaSGR*基因的相对表达量做了定量分析。结果显示,在亲和组合接种后中后期,*TaSGR*基因的相对表达量迅速增加,达到了对照的近7倍水平,而在不亲和组合接种后不同时间点,*TaSGR*基因的表达量与对照0 h相比差异均不明显。

**关键词:** 小麦; 叶锈菌; RT-qPCR; 内参基因; geNorm; NormFinder

Reference Gene Selection for RT-qPCR and Expression Analysis of *TaSGR* Gene in Defense Response of Wheat to *Puccinia triticina*LI Hui<sup>1,\*</sup>, NIU Hong-Wei<sup>2,\*</sup>, LIU Na<sup>1</sup>, CHEN Yan<sup>1</sup>, HOU Chun-Yan<sup>1,\*\*</sup>, WANG Dong-Mei<sup>1,\*\*</sup><sup>1</sup>Plant Stress Laboratory, College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; <sup>2</sup>Hebei Provincial Institute of Environmental Protection Products Quality Supervision and Inspection, Shijiazhuang 050000, China

**Abstract:** Real time quantitative PCR (RT-qPCR) has many potential applications in the determination of gene function. The quality of reference gene plays an essential role in analyzing gene expression. In this study, we took nine genes widely used in wheat (*Triticum aestivum*) as candidate reference genes and evaluated the expression stability of the nine candidate genes, in the interaction between wheat and *Puccinia triticina*, by using RT-qPCR. With the help of geNorm and NormFinder, we analyzed the data of RT-qPCR and got the expression stability of the nine candidate genes. Our results showed that *GAPDH* and *TA* were most stable two genes which can be reliably used in the stress conditions assessed. Based on this, we took *GAPDH* as the reference gene and analyzed gene expression profiles of *TaSGR* in the interaction between wheat and *Puccinia triticina*. Our data showed that the relative expression of *TaSGR* had a rapid increase in the compatible combinations at middle and later time after inoculation, nearly seven times than the level of control. While in the incompatible combinations, the relative expression of *TaSGR* did not change obviously.

**Key words:** wheat; *Puccinia triticina*; RT-qPCR; reference gene; geNorm; NormFinder

近年来,实时定量PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR)技术已被广泛应用于不同物种基因表达的绝对定量和相对定量研究(孙美莲等2010; Paolacci等2009)。该技术实现了聚合酶链式反应技术(polymerase chain reaction, PCR)从定性到定量的飞跃,具有重复性好、灵敏度高、定量准、速度快等优点,已成为分子生物学研究中分析基因表达的重要工具(Huggett等2005; Radonic等2004)。

收稿 2015-02-02 修定 2015-03-24

资助 国家自然科学基金(31171472)、高等学校博士学科点专项科研基金(优先发展领域)(20111302130001)、河北省科技厅河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(12967149D)和河北省人事厅留学人员科技活动项目(20120316)

\* 共同第一作者。

\*\* 共同通讯作者(E-mail: dongmeiwang63@126.com, Tel: 0312-7528276; E-mail: houchunyan@126.com, Tel: 0312-7528249)。

在RT-qPCR中,为了去除不同样本在RNA产量、质量和反转录效率上可能存在的差别而获得目标基因特异性表达的真正差异,通常需要选择内参基因进行校正和标准化(Bustin 2002; Ma等2013; Suzuki等2000)。一般认为组成型表达的管家基因表达比较稳定,适合作为内参基因。然而,近年来大量的研究结果表明,并没有表达绝对稳定的基因,任何一种管家基因的所谓恒定表达都只是在一定类型的细胞或实验因素作用下“有范围”的恒定(Andersen等2004; Long等2010; Vandesomepele等2002; Ma等2013)。因此,为了得到更可靠的定量结果,需要筛选在特定条件下稳定表达的内参基因进行校正。

由小麦叶锈菌引起的小麦叶锈病是影响我国小麦稳产、高产的重要病害之一,流行年份可使小麦减产40%左右,造成巨大的经济损失。本实验室对小麦抗叶锈菌侵染的生理生化机制进行了较为系统的研究。已经证明大量的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可以诱发小麦产生过敏性反应(hypersensitive reaction, HR)以抵抗叶锈菌的侵染。*SGR* (Stay Green)基因是与叶绿素降解相关的基因,已经在很多物种中被发现,它的功能缺失可以导致绿色植物出现滞绿突变(Park等2007; Sato等2007)。有研究表明超表达*SGR*基因的水稻幼苗会产生单线态氧,且叶片出现细胞坏死(Jiang等2011)。在小麦受叶锈菌侵染过程中,检测*TaSGR*基因是否被诱导表达,将为我们进一步研究参与HR诱发的特异的活性氧信号提供实验证据。随着对小麦叶锈病研究的不断深入以及对基因定量要求的不断提高,筛选小麦受叶锈菌侵染过程中稳定表达的内参基因,在抗病相关基因的表达分析中起着关键作用。

本研究选取了在小麦基因表达分析中常用的管家基因*ACTIN1*、*ACTIN2*、*GAPDH*、*GAPDH2*、*ATUB*、*BTUB*、*EF1A1*、*EF1A2*以及在小麦感染条锈菌中筛选到的稳定表达的*TA*共9个基因作为候选内参基因(Paolacci等2009),利用RT-qPCR技术对它们在小麦受叶锈菌侵染过程中的表达量进行测定,利用geNorm和NormFinder软件分析它们表达的稳定性,筛选最适于小麦感染叶锈菌过程中基因表达分析的内参基因,并利用筛选到的最适内参基因分析*TaSGR*基因的相对表达情况。

## 材料与方法

### 1 材料

供试小麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘洛夫林10’(‘Lovin 10’,以下简称‘L10’)。供试叶锈菌(*Puccinia triticina* Eriks.)生理小种为165和260(单胞菌系繁殖)。“L10”与叶锈菌小种165组成亲和组合,与小种260组成不亲和组合。

### 2 方法

#### 2.1 材料处理

小麦幼苗在培养室培养7 d后,在展开的第一片真叶上用毛笔接种叶锈菌,置于黑暗保湿箱内保湿16 h,分别于接种后的0、4、8、12、16、24、48和72 h,采集亲和组合、不亲和组合及对照组(模拟接种)叶片,共21份样品,液氮冷冻,−80 °C度冰箱保存。

#### 2.2 总RNA提取、纯化及cDNA合成

利用RNAiso Plus (TaKaRa)试剂盒提取总RNA,所获得的总RNA经DNA酶处理去除基因组的污染,利用One Step SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>®</sup> RT-PCR Kit (TaKaRa)试剂盒所提供的方法对所得RNA进行反转录得到cDNA。

#### 2.3 PCR引物设计和实时定量PCR反应

根据GenBank已登录的相关序列,利用Primer 5.0软件,分别设计各基因的实时定量PCR引物(表1)。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。各基因片段PCR产物测序结果显示扩增序列正确。

RT-qPCR反应按照SYBR premix Ex Taq II试剂盒(TaKaRa)在CHROMO4型荧光定量PCR仪(Bio-Rad)上运行,采集融解曲线荧光信号。每个样品设3次重复。融解曲线为单峰时用于后续分析。

#### 2.4 标准曲线的绘制及基因扩增效率

利用标准曲线对各引物的扩增效率进行检测。将各内参基因PCR产物依次稀释到10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>倍5个梯度,每个梯度设3个重复。根据实时定量PCR结果,绘制标准曲线。并利用公式E (%)=(10<sup>-1/斜率</sup>-1)×100计算基因的扩增效率,扩增效率在90%~105%的引物符合要求。

#### 2.5 数据处理和分析

数据处理和分析采用常用的内参分析软件geNorm和NormFinder。其中geNorm软件根据RT-qP-

表1 候选基因引物序列及扩增产物长度  
Table 1 The primer sequences and length of amplified fragment

基因符号	基因名称	GenBank登录号	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
<i>ACTIN1</i>	Actin	AB181991	正向GTTCTACAACGAGCTCCGTGTC 反向GACATACATTGCTGGGCAAC	116
<i>ACTIN2</i>	Actin	AY663392	正向GTCGGGATCTCACGGACTC 反向CATAATCAAGGGCAACATAC	106
<i>ATUB</i>	Alpha tubulin	U76558	正向CACCTGAGCAGCTTATCAG 反向CAGTGCAGTTGTCTGAAAGC	115
<i>BTUB</i>	Beta tubulin 5	U76896	正向GCACCATGGACAGTGTCCGT 反向CAGCACCAGACTGCCCAAAC	80
<i>EF1A1</i>	Elongation factor-1-alpha-subunit	M90077	正向AGAAGACTCACATCAACATC 反向CGTACTTGAAAGACCTCTTG	159
<i>EF1A2</i>	Elongation factor-1-alpha	AK334915	正向ACTGTTTCAGACACCAAGCAG 反向AAGCTTACATTAGGACACAG	160
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	AY290728	正向CTGCATCATAACGATGACATC 反向TGTCACCGACAAAGTCAGTG	114
<i>GAPDH2</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	EU022331	正向GACTGTTAGACTTGCGAAGC 反向CATCAACGTAACCCAAAATG	102
<i>TA</i>	TA27922	CD900190	正向ACATGTACATACTCCTCATC 反向TGGTACCTAGTTTTTGCATC	119
<i>TaSGR</i>	Stay-Green protein	GAJL01256413	正向ACTACATCTTCCACAAGGAG 反向GTCTGTTGCAACTTCTGTAG	126

CR结果, 计算出每个样品的Ct平均值, 利用公式  $Q = E^{-\Delta Ct}$ , 计算出各基因的相对表达量Q, 其中E为基因扩增效率(一般情况下将基因扩增设为理想扩增, 扩增效率E默认为2),  $\Delta Ct = Ct_{\text{样品}} - Ct_{\text{min}}$  ( $Ct_{\text{样品}}$ 为每个样品的Ct值,  $Ct_{\text{min}}$ 为所有样品中最低的Ct值)(李钱峰等2008)。利用geNorm软件对各候选内参基因的相对表达量Q进行表达稳定性统计学分析, 以表达稳定性(M)来确定最稳定的内参基因, 该软件默认M=0.5为取舍值, 当M值小于0.5时, 被认为可以考虑作为内参基因。M值越大, 稳定性越差。软件还引入标准化因子的配对差异分析(V), 从而确定合适的内参基因数目。该程序默认V值为0.15, 若  $V_{n/n+1} < 0.15$ , 则没必要引入第n+1个内参基因(Vandesompele等2002)。与geNorm类似, Norm-Finder软件是将原始数据先经标准曲线或 $\Delta Ct$ 法将其转换成相对表达量Q, 然后运用软件通过方差分析得出基因的表达稳定值M, 直接评价基因的稳定性(Andersen等2004)。

在计算*TaSGR*基因的相对表达量时, 首先分别计算每个样品3个平行重复的平均Ct值, 然后按照如下4个公式逐步计算。(1)  $\Delta Ct(\text{test}) = Ct(\text{target, test}) - Ct(\text{ref, test})$ ; (2)  $\Delta Ct(\text{calibrator}) = Ct(\text{target, calibrator}) - Ct(\text{ref, calibrator})$ ; (3)  $\Delta \Delta Ct(\text{test}) = \Delta Ct(\text{test}) - \Delta Ct(\text{calibrator})$ ; (4) 表达量的比值  $= 2^{-\Delta \Delta Ct}$ 。式中, test: 目的基因, calibrator: 内参基因, target: 亲和或不亲和组合, ref: 模拟接种。

2.6 ‘L10’与两个叶锈菌小种亲和与不亲和互作的表型观察

不亲和组合接种后的72 h, 采集幼苗的第一片真叶, 于解剖镜下观察并摄像。亲和组合接种后的6 d, 采集幼苗的第一片真叶, 于解剖镜下观察并摄像。

2.7 寄主细胞过敏性反应的观察

不亲和组合接种后的48 h, 采集3株幼苗的第一片真叶, 除去叶尖和下部后取上、中、下各1.5 cm的叶段, 采用Rohringer荧光染色法(Rohringer等1977)进行染色, 荧光显微镜下观察过敏性反应及菌的发育状态。

## 实验结果

### 1 引物特异性和PCR扩增效率分析

对RT-qPCR数据进行精确分析, 要求所有引物必须有相同的扩增效率。扩增效率接近100%是试验条件得到优化且试验结果重复性好的标志,

实际操作时PCR反应的扩增效率应该在95%~115%之间。如表2所示, 经计算9个候选内参基因扩增效率的变化范围为96.16%~103.38%, 并且标准曲线 $R^2$ 值变化范围为0.994~0.999。

表2 候选内参基因的扩增效率及回归系数

Table 2 PCR efficiency and regression coefficient of nine candidate reference genes

基因	斜率	扩增效率/%	回归系数( $R^2$ )
<i>ACTIN1</i>	-0.3064	102.49	0.998
<i>ACTIN2</i>	-0.3072	102.86	0.997
<i>ATUB</i>	-0.3083	103.38	0.998
<i>BTUB</i>	-0.0926	96.16	0.999
<i>EF1A1</i>	-0.3046	101.65	0.997
<i>EF1A2</i>	-0.2984	98.80	0.999
<i>GAPDH</i>	-0.2960	97.78	0.999
<i>GAPDH2</i>	-0.3006	99.80	0.998
<i>TA</i>	-0.3075	103.00	0.994

## 2 候选内参基因的表达水平

对于每一个基因, 我们可以通过计算Ct值来比较基因表达的丰度, Ct值代表的是PCR产物出现有效增长的循环数(Bustin 2000; Scharlaken等2008)。内参基因的Ct值在不同处理条件下是不同的, Ct值之间的差异值(变异系数)反应了内参基因的稳定性, 变异系数越大表明基因越不稳定。内参基因Ct值在不同样品中表达稳定性是选择内参的重要标准。Ct值越高, 表明基因表达的mRNA含量越低; Ct值越低, 表明基因表达的mRNA含量越高。试验结果表明, 试验涉及的21个样品共9个内参基因中, 除*BTUB*外其他基因的平均Ct值在18到25之间(图1), 并且大部分在19到22之间, 可用于后续试验。*BTUB*表达量较低, Ct值为28左右。

## 3 geNorm软件分析

geNorm软件是常用的内参分析软件, 其通过分析候选内参基因在不同样品中的表达稳定性(M)来确定最稳定的内参基因。利用geNorm软件对各候选内参基因的相对表达量Q进行表达稳定性统计学分析, 结果如图2所示。*ACTIN1*、*ATUB*、*EF1A1*、*EF1A2*、*GAPDH*、*GAPDH2*、*TA*的M值都小于0.5, 其中稳定性最高的两个内参基因分别为*GAPDH*和*TA*, 而*ACTIN2*及*BTUB*的M值均大于0.5, 稳定性较差。

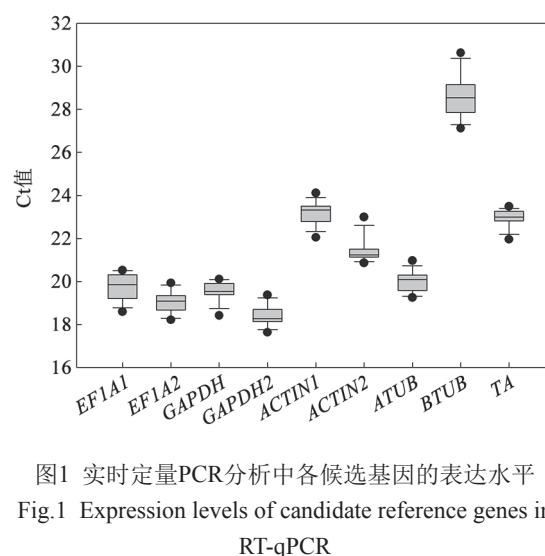


图1 实时定量PCR分析中各候选基因的表达水平  
Fig.1 Expression levels of candidate reference genes in RT-qPCR

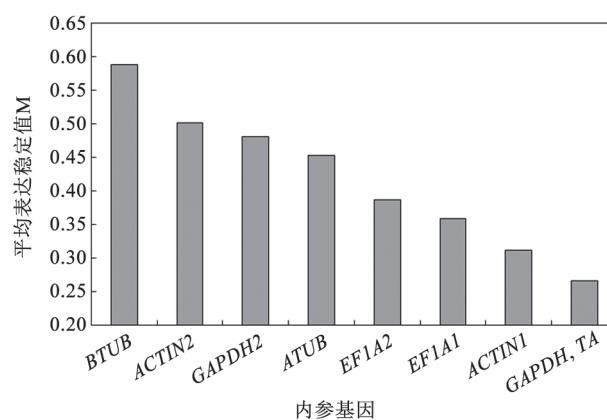


图2 以geNorm软件分析候选内参基因在病程中的表达稳定性

Fig.2 Expression stability of candidate reference genes during pathogenic stages by geNorm

为了从RT-qPCR获得更可靠的结果, 一般推荐使用两个或更多内参基因。因此我们通过geNorm软件进行标准化因子的配对差异分析(V)(Andersen等2004), 从而确定合适的内参基因数目, 从图3结果可见,  $V2/3 < 0.15$ , 说明第3个内参基因未能明显表示出标准化因子差异, 选用两个最稳定的内参基因*GAPDH*与*TA*就足以准确标准化了。

## 4 NormFinder软件分析

我们也用NormFinder软件对候选基因的RT-qPCR数据进行了分析。类似geNorm软件, M值越低稳定性越高, 高M值则表示低稳定性。从图4中可以看出, 最稳定的2个基因为*EF1A2*和*GAPDH*。

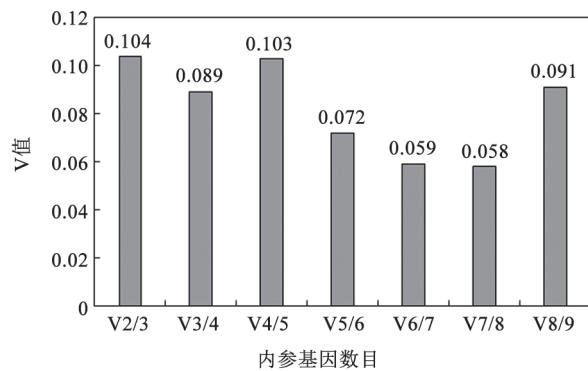


图3 内参基因最适数目的确定

Fig.3 Determination of the optimal number of reference genes for normalization

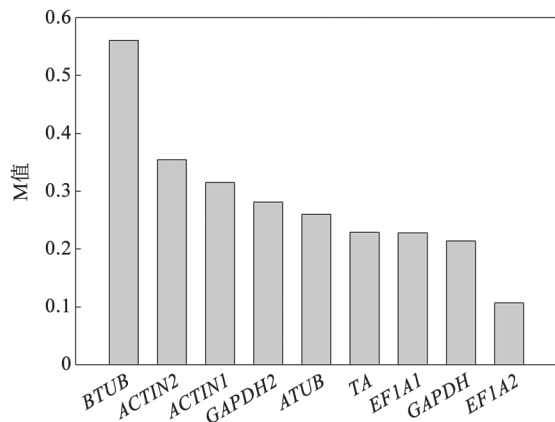


图4 以NormFinder软件分析候选内参基因在病程中的表达稳定性

Fig.4 Expression stability of candidate reference genes during pathogenic stages by NormFinder

所以在两种软件分析中, *GAPDH*均表现稳定, 而经 *geNorm*软件分析最稳定的 *TA*在本软件分析排序中列第4位, 也相对较稳定。NormFinder分析结果显示, 不稳定的内参基因为 *BTUB*和 *ACTIN2*, 与 *geNorm*软件分析结果一致。

### 5 小麦与叶锈菌互作过程中 *TaSGR*的相对表达分析

在小麦受叶锈菌侵染过程中, 不亲和组合叶片侵染点处细胞会发生过敏反应, 而亲和组合小麦叶片在侵染中后期, 孢子堆周围出现明显的褪绿斑, 即细胞发生坏死(图5)。其中不亲和组合中的HR是一种主动性细胞死亡, 与亲和组合中由于叶锈菌掠夺营养导致的叶肉细胞死亡明显不同。在这两种细胞死亡过程中, *TaSGR*基因是否被诱导表达, 将为我们进一步研究参与HR诱发的特

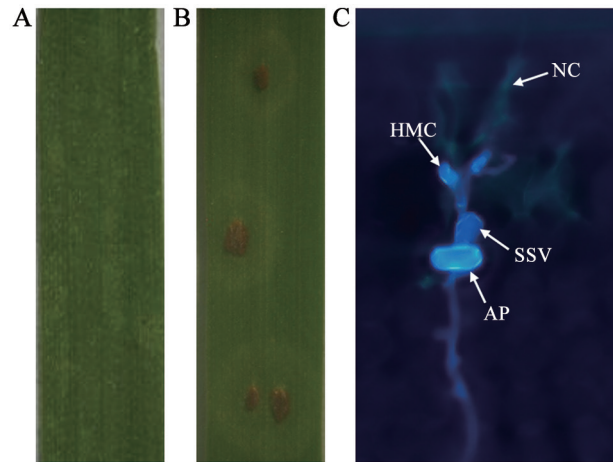
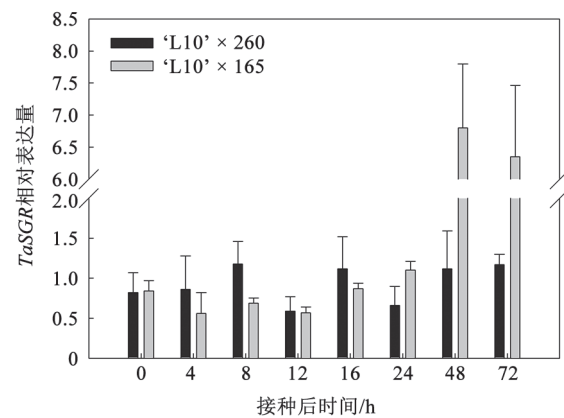


图5 小麦与叶锈菌互作过程中不同亲和性组合的表型及不亲和组合侵染点处HR

Fig.5 The phenotype of wheat leaves in the combinations of different physiological compatibility and the HR of penetration sites in the incompatible combinations during the interaction between wheat and *P. triticina*

A: 不亲和组合叶片表型; B: 亲和组合叶片表型; C: 不亲和组合叶片侵染点处发生HR的细胞及菌的结构。NC: 坏死细胞, HMC: 吸器母细胞, SSV: 气孔下泡囊, AP: 附着胞。

异的活性氧信号提供实验证据。因此, 我们选定 *SGR*基因为目的基因, 以筛选到的在小麦与叶锈菌互作过程中稳定的 *GAPDH*基因为内参, 利用 RT-qPCR检测了 *TaSGR*的相对表达量。同时也以最不稳定的 *BTUB*为内参, 以比较内参的稳定性对小麦与叶锈菌互作过程中基因相对表达量的影响。如图6所示, 以 *GAPDH*为内参时, 在不亲和组合中接种后不同时间点, *TaSGR*基因的表达量与对

图6 以 *GAPDH*为内参时 *TaSGR*的相对表达量Fig.6 The relative expression of *TaSGR* taking *GAPDH* as the reference gene

照(接种后0 h)相比差异均不明显。而在亲和组合中, 接种后4至24 h表达量无明显变化, 但在接种后中后期, 即48和72 h表达量迅速增加, 达对照的近7倍。*SGR*基因在亲和组合侵染中后期被特异诱导表达, 说明*TaSGR*可能参与亲和组合中寄主细胞的坏死过程, 而与不亲和组合HR的诱发无关。当以最不稳定的*BTUB*基因为内参时, 如图7所示, 在不亲和组合及亲和组合中, *TaSGR*在接种后12 h表达

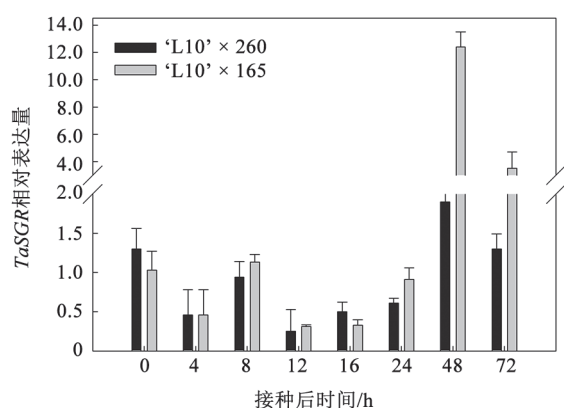


图7 以*BTUB*为内参时*TaSGR*的相对表达量

Fig.7 The relative expression of *TaSGR* taking *BTUB* as the reference gene

均下调近5倍, 而后逐渐增加, 接种后24 h恢复到对照水平, 之后不亲和组合稍有增加, 而亲和组合在接种后48 h又增加至对照的12倍。所以选取不合适的内参基因时, 对*TaSGR*相对表达量的计算有很大的影响。

## 讨 论

在分子生物学研究中, 研究基因表达模式可以帮助我们了解生物的生长和发育过程。而RT-qPCR是量化基因表达水平最常用的一种方法, 也是确定基因功能至关重要的一步。选择合适的内参基因是利用RT-qPCR准确分析基因相对表达量的先决条件。如果实验选用了不合适的内参基因, 将直接导致对目的基因相对表达量的误判。理想的内参基因在不同的组织器官和发育阶段中表达稳定(Hong等2008), 受生物或者非生物胁迫影响小, 并且其稳定的表达水平与目标基因表达水平相近(Luo等2010)。

geNorm软件和NormFinder软件都是目前最常用的内参基因筛选软件, 主要用于候选基因表达研究中内参基因稳定度排序及找出合适的内参基因。综合这两款软件的分析可知, 在小麦与叶锈菌互作过程中, *GAPDH*和*TA*是所候选的9个内参基因中表达较稳定的, 而表达稳定性较低的是*BTUB*和*ACTIN2*。从此结果可看出同一家族的基因如*ATUB*和*BTUB*, 在不同的逆境中, 其表达量也是存在差异的。另外在叶锈菌侵染小麦过程中, 通过检测*TaSGR*的相对表达量, 也可看出选用不同的内参基因会使基因相对表达量产生很大的差异。因此在进行基因表达的研究时, 研究者必须结合各自的实验条件和样品类型来选择合适的内参基因。

## 参考文献

- 李钱峰, 蒋美艳, 于恒秀, 辛世文, 顾铭洪, 刘巧泉(2008). 水稻胚乳RNA定量RT-PCR分析中参照基因选择. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 29 (2): 61~66
- 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 韦朝领, 高丽萍, 夏涛, 单育, 骆洋(2010). 茶树实时荧光定量PCR分析中内参基因的选择. 植物学报, 45 (5): 579~587
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft 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. *Cancer Res*, 64 (15): 5245~5250
- Bustin SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25 (2): 169~193
- Bustin SA (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29 (1): 23~39
- Hong S, Seo P, Yang M, Xiang F, Park C (2008). Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biol*, 8 (1): 112
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*, 6 (4): 279~284
- Jiang H, Chen Y, Li M, Xu X, Wu G (2011). Overexpression of *SGR* results in oxidative stress and nei lesion-mimic cell death in rice seedlings. *J Integr Plant Biol*, 53 (5): 375~387
- Long XY, Wang JR, Ouellet T, Rocheleau H, Wei YM, Pu ZE, Jiang QT, Lan XJ, Zheng YL (2010). Genome-wide identification and evaluation of novel internal control genes for Q-PCR based transcript normalization in wheat. *Plant Mol Biol*, 74 (3): 307~311
- Luo H, Chen S, Wan H, Chen F, Gu C, Liu Z (2010). Candidate reference genes for gene expression studies in water lily. *Anal Biochem*, 404 (1): 100~102
- Ma S, Niu H, Liu C, Zhang J, Hou C, Wang D (2013). Expression stabilities of candidate reference genes for RT-qPCR under different

- stress conditions in soybean. PLoS ONE, 8 (10): e75271
- Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. BMC Mol Biol, 10: 11
- Park SY, Yu JW, Park JS, Li J, Yoo SC, Lee NY, Lee SK, Jeong SW, Seo HS, Koh HJ et al (2007). The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. Plant Cell, 19 (5): 1649~1664
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochem Biophys Res Commun, 313 (4): 856~862
- Rohringer R, Kim WK, Samborski DJ, How NK (1977). Calcofluor: an optical brightener for fluorescence microscopy of fungal plant parasites in leaves. Phytopathology, 67 (6): 808~810
- Sato Y, Morita R, Nishimura M, Yamaguchi H, Kusaba M (2007). Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 104 (35): 14169~14174
- Scharlaken B, de Graaf DC, Goossens K, Brunain M, Peelman LJ, Jacobs FJ (2008). Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. J Insect Sci, 8: 33
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR (2000). Control selection for RNA quantitation. Biotechniques, 29 (2): 332~337
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol, 3 (7): Research0034