

## 核桃内参基因实时荧光定量PCR表达稳定性评价

李雪, 潘学军\*, 张文娥\*, 张睿, 陈静

贵州大学/贵州省果树工程技术研究中心, 贵阳550025

**摘要:** 利用实时荧光定量PCR技术, 结合geNorm、NormFinder和BestKeeper软件研究了5个常用的植物内参基因*GAPDH*、 *$\beta$ -Actin*、*18S rRNA*、*UBQ*和*EF-1*在不同基因型、不同组织、不同发育时期核桃(*Juglans* spp.)中的表达情况, 以期筛选出在核桃中稳定表达的内参基因。结果显示: *GAPDH*和*EF-1*在核桃所有样品中均表达稳定, 由于表达丰度偏低, 所以适合作为分析较低表达丰度目标基因时的内参; *18S rRNA*在核桃所有样品中表达稳定性较好, 且*18S rRNA*表达丰度偏高, 适合作为分析较高表达丰度目标基因时的内参;  *$\beta$ -Actin*和*UBQ*在核桃样品中的表达稳定性较差, 不适合作为核桃中基因表达分析时的内参基因。

**关键词:** 核桃; 实时荧光定量PCR; 内参基因

实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)具有重复性好、灵敏度高、特异性强及高通量的优点, 能够用于植物不同组织(任锐等2016; 孙美莲等2010)、不同发育时期(杨澜等2015; 樊连梅等2014; 齐飞艳等2013)、不同基因型(蒋婷婷等2015)和不同胁迫处理(周晓慧等2014)条件下各种基因的表达差异性研究, 可快速、便捷地实时监控基因在不同样本中的表达情况。但qRT-PCR技术在检测过程中需选择合适的内参基因, 以保证其结果的准确性。

内参基因可在不同的组织和细胞中恒定表达, 维持细胞最低限度的功能。但研究表明, 在植物不同的组织、器官和细胞发育的不同阶段以及不同试验条件下, 内参基因的表达并非永远恒定(Die等2010), 如内参基因18S核糖体RNA基因(*18S rRNA*)和3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*)在珙桐(*Davidia involucrata*)不同器官中的表达稳定性差(任锐等2016), 但*18S rRNA*和*GAPDH*在苹果(*Malus pumila*)着色期(樊连梅等2014)及干旱、盐胁迫条件下的喀西茄(*Solanum aculeatissimum*)中却表达稳定(周晓慧等2014)。因此评价不同条件下内参基因的表达稳定性是获得可靠试验结果的必要前提。

核桃(*Juglans* sp.)作为一种营养密集型保健食品, 含有丰富的多不饱和脂肪酸、蛋白质和次级代谢产物, 如多酚类物质、生物碱、维生素等, 具有抗氧化、抗菌等一系列药理功能。利用分子生物学手段揭示核桃功能成分的合成与调控机理已成为研究热点。目前核桃属植物中仅有普通核桃(*J. regia*)用*18S rRNA*做内参基因(徐丽等2014; 宋晓波等2016; 何富强等2011), 对于其他经典的内参

基因如 $\beta$ -肌动蛋白基因( *$\beta$ -Actin*)、多聚泛素酶基因(*UBQ*)、转录延伸因子基因(*EF-1*)、*GAPDH*等在核桃中是否有更加稳定的表达尚不清楚。本研究选取以上5个常用的内参基因, 利用qRT-PCR技术对其在核桃属植物不同种和品种、不同组织及不同发育时期的表达稳定性进行评价, 以期筛选出在核桃中表达稳定的内参基因, 为后续的基因表达研究提供参考。

## 材料与方法

### 1 材料

以核桃属泡核桃(*Juglans sigillata* Dode)主要栽培品种‘黔核6号’、‘黔核7号’和‘黔核8号’及普通核桃(*J. regia* L.)品种‘香玲’为试材, 于2016年4~9月分别采集‘黔核7号’盛花后1周果实, 每隔15 d取一次, 直至果实成熟, 共10个时期; ‘黔核7号’一年生新梢、根、盛花期雄花、成熟期叶片和果实, 分别用于不同组织及不同发育时期的表达差异性分析。9月采集4个品种成熟期果实用于不同基因型的表达差异性分析。每个样品3次重复, 且样品量不少于2 g。在低温冷藏条件下带回实验室, 液氮速冻后, 保存于-80°C冰箱备用。

### 2 方法

#### 2.1 RNA提取及cDNA合成

用植物总RNA试剂盒(BioTeke)提取RNA。用

收稿 2017-06-05 修定 2017-08-08

资助 贵州省高层次创新型人才培养项目(黔科合人才[2016]4038号)和贵州大学研究生创新基金(研农2017019)。

\* 共同通讯作者(E-mail: pxjun2050@aliyun.com; agr.wezhang@gzu.edu.cn)。

1% (*m/V*)琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性。超微量紫外分光光度计(K5500)确定浓度后,以总RNA为模板,按照M-MMLV反转录试剂盒说明书合成cDNA第一链,置于-80°C冰箱保存备用,用于后续试验。

## 2.2 内参基因的选择

根据苹果(周兰等2012; 李君英等2016)、葡萄(*Vitis vinifera*) (查倩等2016)、毛竹(*Phyllostachys pubescens*) (齐飞艳等2013)、马铃薯(*Solanum tuberosum*) (Lopez-Pardo等2013)、茄子(*Solanum melongena*)

(Gantasala等2013)、辣椒(*Capsicum annuum*) (Wang等2012)等植物内参基因的研究结果,选择5个常用经典内参基因: *18S rRNA*、*β-Actin*、*EF-1*、*GAPDH*和*UBQ*。

## 2.3 内参引物的设计

在NCBI中寻找各候选基因的保守序列,用Primer 5.0软件设计引物(表1)。引物的退火温度在56~60°C之间,引物长度在20~26 bp之间,扩增产物长度在100~250 bp之间。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表1 qRT-PCR检测中内参基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of reference genes in qRT-PCR analysis

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp	退火温度/°C
<i>18S rRNA</i>	正向: GGTC AATCTTCTCGTTCCCTT	212	60
	反向: TCGCATTTTCGCTACGTTCTT		
<i>β-Actin</i>	正向: GCCGAACGGGAAATTGTC	183	56
	反向: AGAGATGGCTGGAAGAGG		
<i>GAPDH</i>	正向: ATTTGGAATCGTTGAGGGTCTTATG	115	58
	反向: AATGATGTTGAAGGAAGCAGCAC		
<i>UBQ</i>	正向: ATGCAGATTTTGTGAAGAC	196	60
	反向: ACCACCACGGAGACGGAGG		
<i>EF-1</i>	正向: ACCAGCATCACCACTTCTCA	98	56
	反向: ACTGCCATACTTCCCACATT		

## 2.4 反转录PCR与qRT-PCR扩增

反转录PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 反应体系(20 μL)包含: 10 μL 2×*Taq* PCR Master Mix (TIANGEN), 1 μL cDNA(大约30 ng, 作为模板), 上、下游引物(20 μmol·L<sup>-1</sup>)各0.5 μL, 8 μL双蒸水(double-distilled water, ddH<sub>2</sub>O)。RT-PCR反应条件为: 94°C预变性4 min; 94°C变性40 s, 56~60°C退火40 s, 72°C延伸50 s, 35个循环; 72°C延伸7 min。产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

qRT-PCR反应是在Applied biosystems ViiA™ 7实时荧光定量PCR仪上进行,向Axygen PCR管中加入20 μL的qRT-PCR反应体系: 10.0 μL SYBR Premix Ex Taq (2×)、上下游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)和ROX Dye II各0.4 μL, 2.0 μL模板cDNA、6.8 μL ddH<sub>2</sub>O。反应条件为: 50°C预变性2 min; 95°C变性15 s, 60°C退火/延伸1 min, 40个循环; 熔解曲线扩增95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s, 1个循环。反应过程中,每个内参基因的qRT-PCR均设置阴性对照,以检验该基因扩增反应背景,每处理重复3次。

## 2.5 内参基因表达稳定性分析

荧光定量PCR分析之后,根据仪器给出反应基因表达丰度的C<sub>t</sub>值, C<sub>t</sub>值越小,基因表达丰度越高,反之亦然。按公式 $Q = E^{\Delta C_t}$ 计算各基因的相对表达量,其中Q为相对表达量; E为基因扩增效率,默认为2;  $\Delta C_t = C_{t(\text{样品})} - C_{t(\text{min})}$  [C<sub>t(min)</sub>为所有样品中最低的C<sub>t</sub>值, C<sub>t(样品)</sub>为每个样品的C<sub>t</sub>值]。

利用geNorm和NormFinder软件分析内参基因的表达稳定性(Vandesompele等2002; Andersen等2004),利用BestKeeper软件对C<sub>t</sub>值进行统计学分析评价其表达稳定性。

## 实验结果

### 1 RNA提取及质量检测

经1%琼脂糖凝胶电泳结果显示,提取的28S rRNA和18S rRNA条带完整且完全分开,说明总RNA完整性良好(图1-A)。紫外分光光度计检测其在280和260 nm下的吸光值, OD<sub>260/280</sub>值介于1.8~2.1之间, OD<sub>260/230</sub>值介于2.0~2.3之间(图1-B),表明

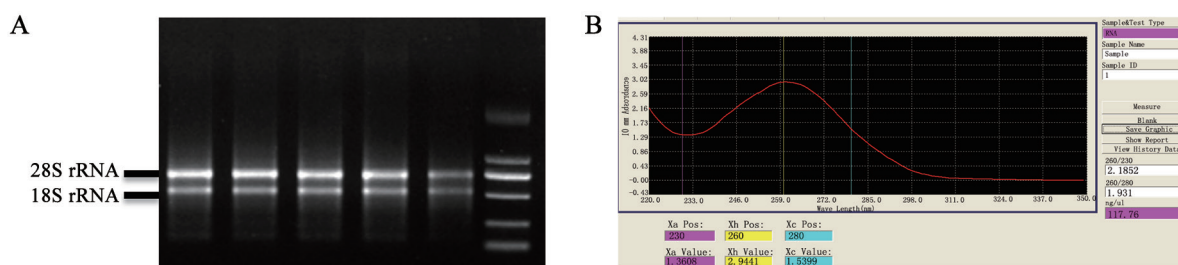


图1 核桃RNA琼脂糖凝胶电泳(A)及吸光比值测定(B)

Fig.1 RNA agarose gel electrophoresis (A) and light absorption ratio (B) of walnut

Absorbance: 吸光度; Wave Length: 波长。

RNA无污染, 无降解, 纯度高, 满足后续实验的要求。

## 2 内参基因引物扩增特异性检测

各内参基因的PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图2所示, 在100~250 bp间均扩增出单一条带, 说明没有扩增杂带和引物二聚体, 引物的特异性和准确性好, 扩增反应专一性高, 可用于qRT-PCR分析。

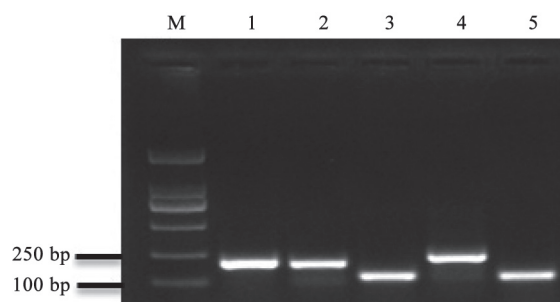


图2 核桃内参基因PCR产物的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig.2 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products of reference genes in walnut

M: DL2000 DNA marker; 1: *18S rRNA*; 2: *β-Actin*; 3: *GAPDH*; 4: *UBQ*; 5: *EF-1*。

## 3 内参基因的qRT-PCR溶解及扩增曲线分析

以核桃不同样品的cDNA第一链为模板, 进行qRT-PCR分析。结果表明, 5个内参基因的溶解曲线都有很明显的单一峰, 不存在引物二聚体(图3-左), 每个待测样品的扩增曲线重复性均较好(图3-右)。说明每个内参基因的引物设计合理, 特异性好, 反应的专一性高, 结果准确、可靠且符合qRT-PCR的标准, 可进行后续实验。

## 4 内参基因 $C_t$ 值分析

$C_t$ 值与基因的表达丰度成反比, 即 $C_t$ 值越小, 基因的表达丰度越高, 反之亦然。本研究中, 5个候

选内参基因的 $C_t$ 值在17~33之间, 表达丰度分布范围广。其中*18S rRNA*的 $C_t$ 值较小, 在17~25之间, 表达丰度较高; *EF-1*和*GAPDH*的 $C_t$ 值较大且数值集中, 在29~33之间, 表达丰度较低; *β-Actin*和*UBQ*的 $C_t$ 值变化范围大, 数据较为分散, 主要集中在18~32之间, 表达丰度居中(图4)。由此可初步判断, *EF-1*和*GAPDH*表达较为稳定, *β-Actin*和*UBQ*表达差异较大, 为进一步准确判断内参基因的表达稳定性, 须借助内参基因分析软件进行分析评价。

## 5 内参基因表达稳定性评价

### 5.1 geNorm软件分析

geNorm软件根据平均表达稳定值(average expression stability value,  $M$ )的高低进行排序,  $M$ 值越低, 表明基因的稳定性越好, 反之稳定性越差。软件默认 $M$ 的取舍值为1.5, 即 $M < 1.5$ 时的内参基因表达相对稳定。由图5-A~D可以看出, *EF-1*和*GAPDH*的 $M$ 值均小于0.8; 此外, *18S rRNA*的 $M$ 值也均小于1.7, 表达稳定性也较高, 三者均可作核桃基因型、组织型及发育时期基因表达的内参基因。而*β-Actin*和*UBQ*的 $M$ 值均大于1.5, 表达稳定性较差, 不适合作为分析核桃基因表达时的内参基因。

为消除使用单一内参基因引起的偏差和波动, geNorm软件还可以通过分析配对差异值 $V_{n(n+1)}$ 来确定所需内参基因的最适数目。软件默认 $V_{n(n+1)}$ 阈值为0.15, 即当 $V_{n(n+1)} < 0.15$ 时, 则无需引入第 $(n+1)$ 个内参基因。由图5-E可以看出, 在核桃各样品中,  $V_{n(n+1)}$ 值均远大于0.15, 说明内参基因的表达稳定性不是很强, 此时不能借助阈值0.15来确定所需内参基因的最适数目。当分析核桃中目的基因的基因型、组织型及发育时期差异性表达需要多个内参基因进行校准时, 选择2~3个表达稳定的内参基因即可(任锐等2016)。

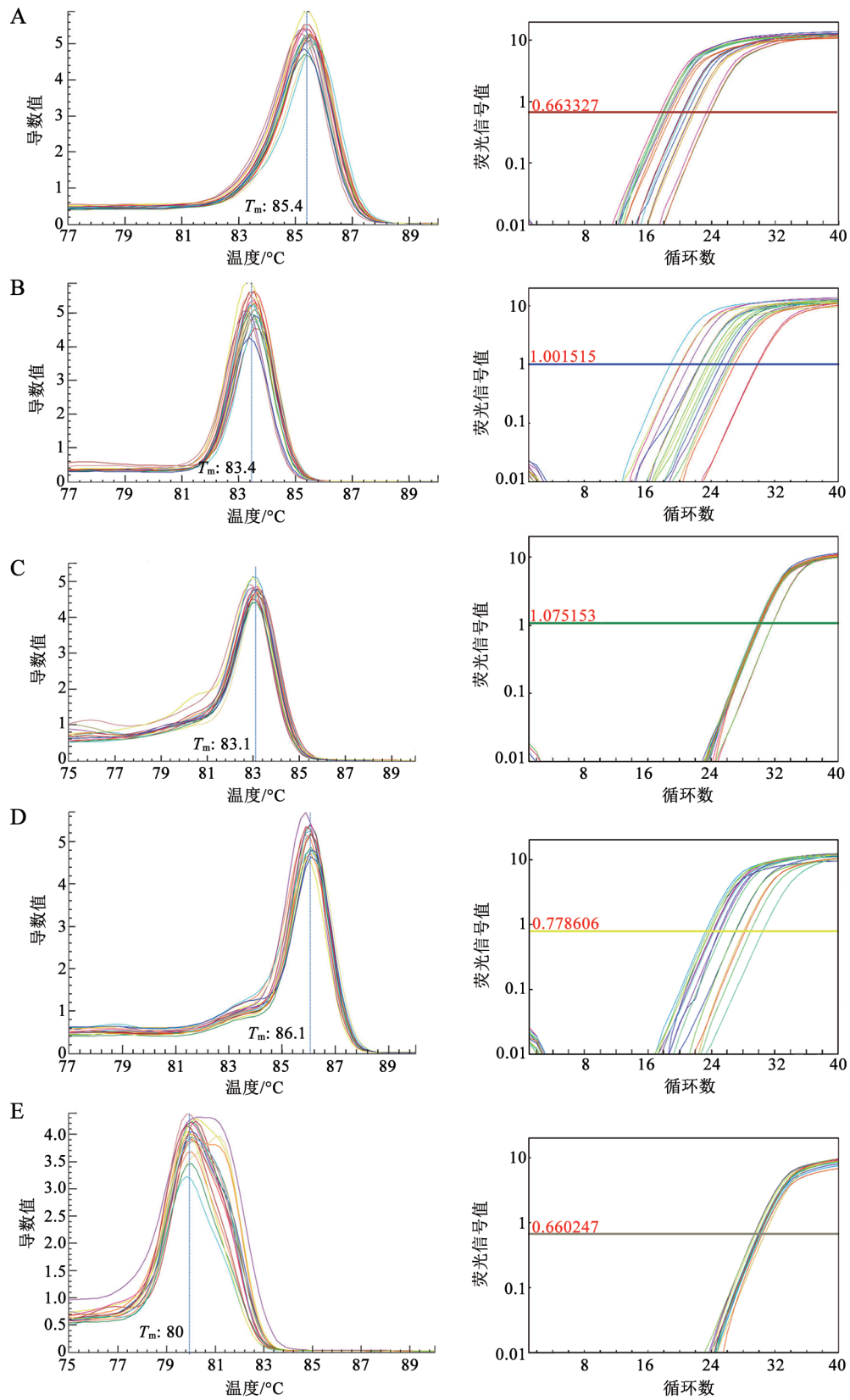
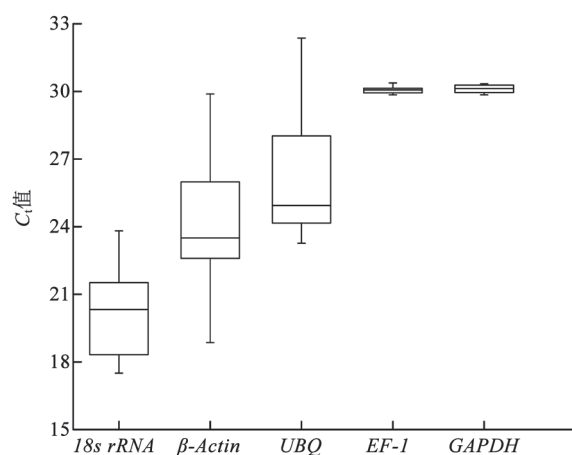


图3 核桃内参基因的熔解曲线(左)和扩增曲线(右)

Fig.3 Melting curves (left) and amplification curves (right) of reference genes in walnut

A: *18S rRNA*; B:  $\beta$ -*Actin*; C: *GAPDH*; D: *UBQ*; E: *EF-1*.  $T_m$ : 退火温度(单位: °C)。

图4 核桃内参基因的 $C_t$ 值分布Fig.4 Distribution of  $C_t$  values of reference genes in walnut

箱体代表 $C_t$ 值的集中范围, 箱体中央横线代表中位数, 箱体上、下边分别代表上四分位数和下四分位数, 箱体上、下端分别代表最大值与最小值。候选基因根据中位数值由低到高依次排列。

## 5.2 NormFinder软件分析

NormFinder软件根据各基因在样品间的组内变异系数与组间变异系数, 得到的表达稳定值(expression stability value,  $M$ )与基因的稳定性呈负相关, 即 $M$ 值越小, 基因表达越稳定, 反之亦然。如表2所示, 在所有测试样品中, 表达最稳定的内参基因是UBQ和EF-1; 且EF-1和GAPDH在不同组织和发育时期中表达最稳定; 而在不同基因型核桃样品中, 内参基因18S rRNA和EF-1的稳定性表现最好。此结果和geNorm软件分析结果相似。综合比较的情况下, 内参基因EF-1在核桃样品中的表达较为稳定, 其次为GAPDH, 而UBQ在不同组织、不同基因型核桃样品中表达水平最不稳定。但在所有测试样品中, 内参基因UBQ的稳定性排名存在差异, 可能是由于计算方法的不同引起的。

## 5.3 BestKeeper软件分析

BestKeeper软件依据各候选内参基因在各试验条件下 $C_t$ 值之间的标准偏差(standard deviation, SD)和变异系数(coefficient of variation, CV)对内参基因的稳定性进行综合分析。一般稳定的内参基因具有较低的SD值和CV值。由表3可知, 内参基因GAPDH和EF-1的表现最好, 表达稳定性均达到了软件默认值。其次, 18S rRNA在标准偏差和变异系数指标的评价中, 其表达稳定性较好, 在5个候选基因中居于中间水平, 且表达丰度较高, 也是

研究核桃基因表达分析中内参基因的良好选择。而SD的临界值为1.5, 若 $SD > 1.5$ , 则表明稳定性较差。UBQ和 $\beta$ -Actin在所有测试样品和不同基因型样品中SD值大于2, 且UBQ在不同组织核桃样品中的SD值为2.44, 说明UBQ和 $\beta$ -Actin在核桃样品中的表达稳定性较差, 不适合作为研究核桃基因表达分析中的内参基因。

## 讨 论

qRT-PCR检测结果的准确性受到多种因素的影响, 如引物的特异性、扩增产物的长度、RNA样品的质量等, 最重要的还是内参基因的稳定性(Udvardi等2008)。内参基因的选择不具有通用性, 不经筛选直接采用18S rRNA或 $\beta$ -Actin等常见的管家基因做内参基因, 很可能使定量结果的准确度降低, 甚至得到错误的结论(Gutierrez等2008)。

目前, 在石蒜属(*Lycoris* sp.) (蒋婷婷等2016)、葡萄(查倩等2016)、苹果(周兰等2012; 李君英等2016; 樊连梅等2014)、毛竹(齐飞艳等2013)、珙桐(任锐等2016)、喀西茄(周晓慧等2014)、大豆(*Glycine max*) (曾文韬等2015)、橡胶草(*Taraxacum kok-saghyz*) (覃碧等2016)等植物上都已有相关内参基因研究的报道, 而在核桃属植物的基因表达研究中, 仅在普通核桃中有部分研究, 且选用的是常见的内参基因18S rRNA, 如徐丽等(2016)用18S rRNA做内参基因, 研究WRKY4基因在普通核桃不同组织中的表达, 虽得到较好的实验结果, 但是对于不同栽培种的不同品种、不同组织以及不同发育阶段具体应该选择哪一个内参基因才能获得精准的试验结果缺乏系统的研究和评价。

本研究采用geNorm、NormFinder和BestKeeper三个评价内参基因稳定性常用的软件, 以核桃属植物4个不同栽培品种、7个不同组织以及10个青皮的动态发育阶段共计21个样品为材料, 针对常用的5个内参基因18S rRNA、 $\beta$ -Actin、GAPDH、UBQ、EF-1进行筛选和稳定性评价, 发现GAPDH和EF-1在测试的核桃所有样品中均表达稳定; 18S rRNA表达稳定性居中;  $\beta$ -Actin和UBQ表达稳定性较差, 不适合作为核桃中基因表达分析时的内参基因。但是在对目标基因进行校准时, 不仅要求所用内参基因的表达水平稳定, 而且要求其稳定的表达

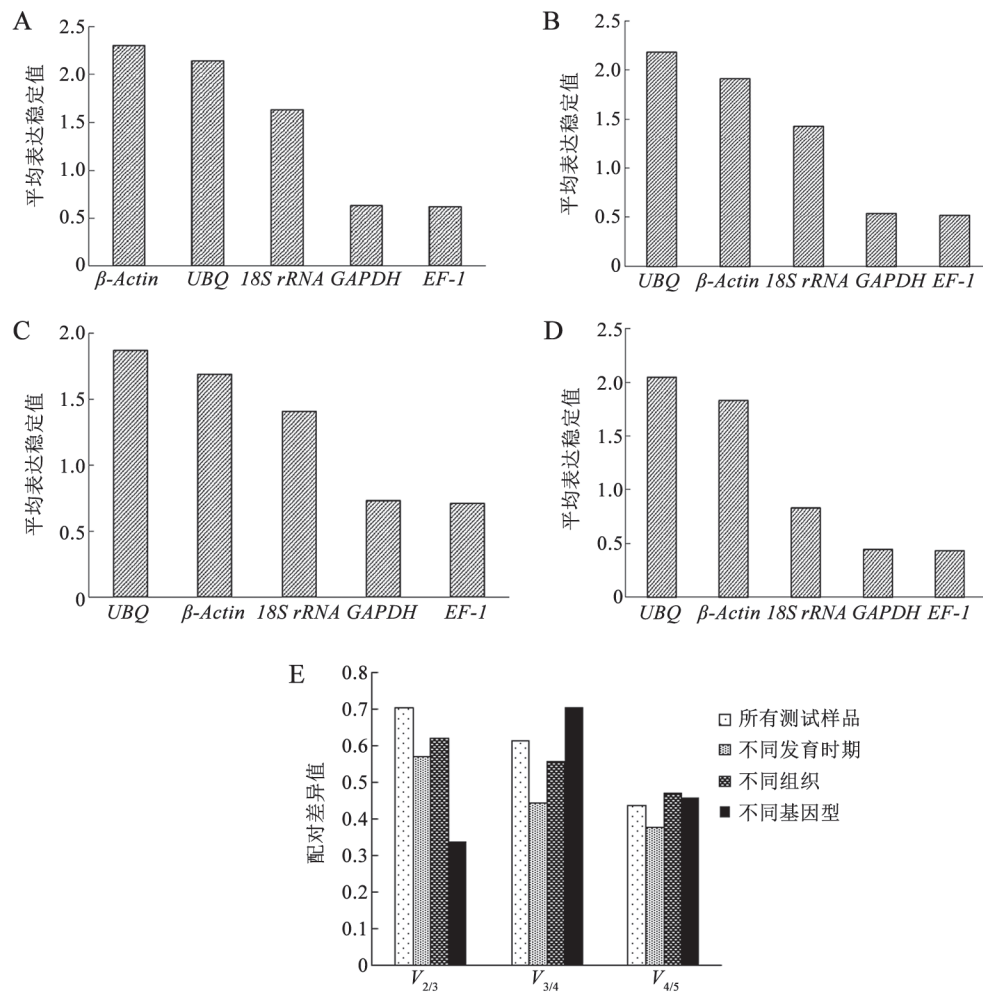


图5 geNorm软件分析内参基因的平均表达稳定值(M)和配对差异值(V)

Fig.5 Average expression stability (M) and pairwise variation (V) values of the candidate reference genes calculated by geNorm  
 A: 所有核桃样品中候选内参基因的M值; B: 核桃不同组织中候选内参基因的M值; C: 核桃不同发育时期中候选内参基因的M值; D: 核桃不同基因型中候选内参基因的M值; E: 核桃不同条件下的V值。V<sub>2/3</sub>代表在2个内参基因条件下的配对差异值; V<sub>3/4</sub>代表在3个内参基因条件下的配对差异值; V<sub>4/5</sub>代表在4个内参基因条件下的配对差异值。

表2 NormFinder软件分析5个候选内参基因在不同条件下的表达稳定值(M)

Table 2 NormFinder analysis of five candidate reference genes with respect to their expression stability values (M) under different conditions

处理	排序	基因	M	处理	排序	基因	M
所有测试样品	1	UBQ	0.794	不同组织	1	EF-1	0.524
	2	EF-1	0.818		2	GAPDH	1.051
	3	18S rRNA	0.863		3	$\beta$ -Actin	1.103
	4	GAPDH	0.930		4	18S rRNA	1.281
	5	$\beta$ -Actin	1.070		5	UBQ	2.403
不同基因型	1	18S rRNA	0.077	不同发育时期	1	EF-1	0.285
	2	EF-1	0.882		2	GAPDH	0.338
	3	GAPDH	1.710		3	$\beta$ -Actin	0.968
	4	$\beta$ -Actin	1.791		4	UBQ	1.293
	5	UBQ	2.247		5	18S rRNA	1.376

表3 BestKeeper软件分析5个候选内参基因在不同条件下的表达稳定性

Table 3 BestKeeper analysis of five candidate reference genes with respect to their expression stability under different conditions

处理	排序	基因	SD	CV	处理	排序	基因	SD	CV
所有测试样品	1	<i>GAPDH</i>	0.31	1.03	不同组织	1	<i>GAPDH</i>	0.12	0.39
	2	<i>EF-1</i>	0.32	1.08		2	<i>EF-1</i>	0.33	1.11
	3	<i>18S rRNA</i>	1.65	8.19		3	<i>18S rRNA</i>	1.43	6.94
	4	<i>β-Actin</i>	2.29	8.81		4	<i>β-Actin</i>	1.52	5.87
	5	<i>UBQ</i>	2.30	9.55		5	<i>UBQ</i>	2.44	9.07
不同基因型	1	<i>GAPDH</i>	0.08	0.26	不同发育时期	1	<i>EF-1</i>	0.42	1.41
	2	<i>EF-1</i>	0.24	0.81		2	<i>GAPDH</i>	0.53	1.76
	3	<i>18S rRNA</i>	1.29	5.77		3	<i>18S rRNA</i>	1.10	5.77
	4	<i>UBQ</i>	2.17	10.11		4	<i>UBQ</i>	1.46	5.81
	5	<i>β-Actin</i>	3.27	12.60		5	<i>β-Actin</i>	1.56	7.08

量与目标基因的表达量相近, 表达量过高或过低, 都可能导致定量结果出现明显偏差(Gimeno等2014)。 *GAPDH*和*EF-1*的表达丰度偏低, 适合作为分析较低表达丰度目标基因时的内参; *18S rRNA*表达丰度偏高, 适合作为分析较高表达丰度目标基因时的内参。本研究为开展核桃功能基因表达分析提供了方法学参考。

### 参考文献

- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft 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: 5245–5250
- Die JV, Román B, Nadal S, González-Verdejo CI (2016). Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. *Planta*, 232: 145–153
- Fan LM, Wang C, Liu GS, Yuan YB (2014). Screening and validation of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR during coloring period in apple (*Malus domestica*). *Plant Physiol J*, 50 (12): 1903–1911 (in Chinese with English abstract) [樊连梅, 王超, 刘更森, 原永兵(2014). 苹果着色期实时定量PCR内参基因的筛选和验证. *植物生理学报*, 50 (12): 1903–1911]
- Gantasala NP, Papolu PK, Thakur PK, Kamaraju D, Sreevathsa R, Rao U (2013). Selection and validation of reference genes for quantitative gene expression studies by real-time PCR in eggplant (*Solanum melongena* L.). *BMC Res Notes*, 6: 312
- Gimeno J, Eattock N, Van Deynze A, Blumwald E (2014). Selection and validation of reference genes for gene expression analysis in switchgrass (*Panicum virgatum*) using quantitative real-time RT-PCR. *PLoS ONE*, 9 (3): e91474
- Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, Pellous J, Lefebvre JF, Louvet R, Rusterucci C, Moritz T, Guérineau F, Bellini C, et al (2008). The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biol J*, 6: 609–618
- He FQ (2011). Molecular cloning and expression pattern of a *LFY* homologous gene from *Juglans regia* L. (PhD thesis). Baoding: Hebei Agricultural University (in Chinese with English abstract) [何富强(2011). 核桃*LFY*同源基因的克隆和表达(博士论文). 保定: 河北农业大学]
- Jiang TT, Gao YH, Tong ZK (2015). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Lycoris*. *Acta Horticult Sin*. 42 (6): 1129–1138 (in Chinese with English abstract) [蒋婷婷, 高燕会, 童再康(2015). 石蒜属植物实时荧光定量PCR内参基因的选择. *园艺学报*, 42 (6): 1129–1138]
- Li J, Zhang H, Han Y, Shao J, Sun J (2016). Selection of reference genes for real-time quantitative PCR in apples (*Malus domestica*) *in vitro*. *J Fruit Sci*, 33 (9): 1033–1042 (in Chinese with English abstract) [李君英, 张鹤, 韩永峰, 邵建柱, 孙建设(2016). 组培条件下苹果实时定量PCR内参基因的筛选. *果树学报*, 33 (9): 1033–1042]
- Lopez-Pardo R, de Galarreta JIR, Ritter E (2013). Selection of house-keeping genes for qRT-PCR analysis in potato tubers under cold stress. *Mol Breeding*, 31: 39–45
- Qi F, Hu T, Peng Z, Gao J (2013). Screening of reference genes used in qRT-PCR and expression analysis of *pheTFL1* gene in Moso bamboo. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 33 (1): 48–52 (in Chinese with English abstract) [齐飞艳, 胡陶, 彭镇华, 高健(2013). 毛竹实时荧光定量PCR内参基因的筛选及成花基因*PheTFL1*表达分析. *西北植物学报*, 33 (1): 48–52]
- Qin B, Pan M, Yu HY, Yang YS, Gan L, Liu SZ (2016). Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in *Taraxacum kok-saghyz* Rodin. *Plant Physiol J*. 52 (7): 1059–1065 (in Chinese with English abstract) [覃碧, 潘敏, 余海洋, 杨玉双, 甘霖, 刘实忠(2016). 橡胶草实时荧光定量PCR内参基因评价. *植物生理学报*, 52 (7): 1059–1065]
- Ren R, Dai PH, Li M, Liu ZM, Cao FX (2016). Selection and stability evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR in dove tree (*Davidia involucreta*). *Plant Physiol J*, 52 (10): 1565–1575 (in Chinese with English abstract) [任锐, 戴鹏辉, 李萌, 刘志明, 曹福祥(2016). 珙桐实时定量PCR内参基因的筛选及稳

- 定性评价. 植物生理学报, 52 (10): 1565–1575]
- Song XB, Wang HX, Zhang ZH (2016). Cloning and expression analysis of *JrGAI* gene in DELLA protein from ‘Liaoning 2’. *J Agr Univ Hebei*, 39 (1): 29–34 (in Chinese with English abstract) [宋晓波, 王红霞, 张志华(2016). ‘辽宁2号’ DELLA蛋白编码基因的克隆及表达分析. 河北农业大学学报, 39 (1): 29–34]
- Sun ML, Wang YS, Yang DQ, Wei CL, Gao LP, Xia T, Shan Y, Luo Y (2010). Reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Camellia sinensis*. *Chin Bull Bot*, 45 (5): 579–587 (in Chinese with English abstract) [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]
- Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR (2008). Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell*, 20 (7): 1736–1737
- 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
- Wang SB, Liu KW, Diao WP, Zhi L, Ge W, Liu JB, Pan BG, Wan HJ, Chen JF (2012). Evaluation of appropriate reference genes for gene expression studies in pepper by quantitative real-time PCR. *Mol Breeding*, 30: 1393–1400
- Xu L, Chen X, Wei HR, Zhang LS, Wang JW, Zong XJ, Liu QZ (2014). Cloning and expression analysis of *WRKY4* gene from *Juglans regia* L. *J Nucl Agr Sci*, 28 (7): 1188–1196 (in Chinese with English abstract) [徐丽, 陈新, 魏海蓉, 张力思, 王甲威, 宗晓娟, 刘庆忠(2014). 核桃*WRKY4*基因的克隆与表达分析. 核农学报, 28 (7): 1188–1196]
- Yang L, Yang GS, Li CH, Niu JH, Yin JM (2015). Screening of reference genes in *Anthurium andraeanum* spathes for qRT-PCR analysis. *J Trop Subtrop Bot*, 23 (1): 51–58 (in Chinese with English abstract) [杨澜, 杨光穗, 李崇晖, 牛俊海, 尹俊梅(2015). 红掌佛焰苞基因qRT-PCR分析中内参基因的筛选. 热带亚热带植物学报, 23 (1): 51–58]
- Zeng W, Chai C, Dou D (2015). Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis in soybean. *J Nanjing Agr Univ*, 38 (5): 787–795 (in Chinese with English abstract) [曾文韬, 柴春月, 窦道龙(2015). 适用于大豆实时荧光定量PCR分析的内参基因的筛选和验证. 南京农业大学学报, 38 (5): 787–795]
- Zha Q, Xi X, Jiang A, Tian Y, Wang S (2015). Identification of the appropriate reference gene through using a real-time quantitative PCR in grapes. *J Fruit Sci*, 33 (3): 268–274 (in Chinese with English abstract) [查倩, 奚晓军, 蒋爱丽, 田益华, 王世平(2016). 葡萄实时定量PCR中稳定内参基因的筛选. 果树学报, 33 (3): 268–274]
- Zhou L, Zhang LY, Zhang CX, Kang GD, Ting Y, Cong PH (2012). Screening of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in apple (*Malus × domestica*). *J Fruit Sci*, 29 (6): 965–970 (in Chinese with English abstract) [周兰, 张利义, 张彩霞, 康国栋, 田义, 丛佩华(2012). 苹果实时荧光定量PCR分析中内参基因的筛选. 果树学报, 29 (6): 965–970]
- Zhou XH, Liu J, Zhuang Y (2014). Selection of appropriate reference genes in *Solanum aculeatissimum* for quantitative gene expression studies under different experimental conditions. *Acta Hort Sin*, 41 (8): 1731–1738 (in Chinese with English abstract) [周晓慧, 刘军, 庄勇(2014). 喀西茄内参基因实时荧光定量PCR表达稳定性评价. 园艺学报, 41 (8): 1731–1738]

## Stability evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in walnut (*Juglans* spp.)

LI Xue, PAN Xue-Jun\*, ZHANG Wen-E\*, ZHANG Rui, CHEN Jing

Guizhou Engineering Research Center for Fruit Crops, Guizhou University, Guiyang 550025, China

**Abstract:** In order to screen out the ideal reference genes for stable expression in walnut (*Juglans* spp.), *GAPDH*,  $\beta$ -*Actin*, *18S rRNA*, *UBQ* and *EF-1* were used to evaluate the expression stability in different walnut genotypes, tissues, and developmental stages by using quantitative real-time PCR and softwares of geNorm, Norm-Finder and BestKeeper. The results show that reference genes *GAPDH* and *EF-1* were identified as stable genes in all samples of walnut, followed by *18S rRNA*,  $\beta$ -*Actin* and *UBQ*. *GAPDH* and *EF-1* were suitable for the analysis of lower target genes due to their low abundance of expression. *18S rRNA* abundance of expression is high and suitable for analysis of higher expression target genes. However, the expression stability of  $\beta$ -*Actin* and *UBQ* in all samples was poor, which was not suitable as reference genes in walnut.

**Key words:** walnut; qRT-PCR; reference gene

Received 2017-06-05 Accepted 2017-08-08

This work was supported by the Project of High-level Innovative Talents in Guizhou (Grant No. [2016]4038), and Guizhou University Graduate Innovation Fund (Grant No. 2017019).

\*Co-corresponding authors (E-mail: pxjun2050@aliyun.com; agr.wezhang@gzu.edu.cn).