

技术与方法 Techniques and Methods

菊叶薯蓣不同发育时期块茎内参基因的筛选

曾德福, 周建婵, 钟春梅*, 谢君*

华南农业大学林学与风景园林学院, 广东省高校生物质能源重点实验室, 农业部能源植物资源与利用重点实验室, 广州510642

摘要: 薯蓣皂苷元为重要的药物原料。为初步分析菊叶薯蓣(*Dioscorea composita*)块茎中薯蓣皂苷元合成关键基因的表达, 筛选稳定表达的内参基因至关重要。根据已建立的菊叶薯蓣转录组数据库和已报道的传统内参基因, 筛选出ubiquitin-conjugating enzyme E2 (UBC7)、MMS ZWEI homologue 3 (MMZ3)、tubulin beta-7 (TUB7)、actin 1 (ACT1)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit 1 (GAPC1)、elongation factor 1-alpha (EF-1a2)、cyclophilin 5 (CYP5)、histone H2A 2 (H2A2)共8个候选内参基因, 利用实时荧光定量PCR (qPCR)技术, 结合GeNorm、NormFinder和BestKeeper三个统计学软件进行分析。结果表明, 在菊叶薯蓣块茎不同发育过程中, TUB7和H2A2表达最稳定, 为最佳内参基因。本研究为探究薯蓣皂苷元合成途径分子机理提供参考。

关键词: 菊叶薯蓣; 内参基因; qPCR; GeNorm; NormFinder; BestKeeper

菊叶薯蓣(*Dioscorea composita*)原产自墨西哥, 是一种重要的药用植物, 其块茎含极丰富的薯蓣皂苷元, 具有极高的经济价值(陈新荣等2007)。薯蓣皂苷元是合成肾上腺皮质激素、性激素等300多种甾体激素药物的重要原料, 有“药用黄金”之称(陈新荣等2007)。研究表明, 菊叶薯蓣块茎中薯蓣皂苷元的含量显著高于其他薯蓣属物种(陈新荣等2007; 宋发军2003; 唐世蓉等2007), 尤其在中国传统薯蓣属物种如盾叶薯蓣(*D. zingiberensis*)和穿龙薯蓣(*D. nipponica*)品种退化等问题的影响下, 菊叶薯蓣有望成为最佳的替代材料。目前薯蓣属植物的研究主要集中在形态解剖(Raman等2014)、药用价值(Liu等2016; Dey等2016)和组织培养(Mano-haran等2016; Aighewi等2015)等方面。虽然有报道从盾叶薯蓣、人参(*Panax ginseng*)、三七(*P. notoginseng*)等物种中分别克隆得到了3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶基因(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMGR)、鲨烯合酶基因(squalene synthase, SS)和环阿屯醇合酶基因(cycloartenol synthase, CAS)等薯蓣皂苷元合成途径前期相关基因(Diarra等2013; Ye等2014; 罗红梅等2013; Jiang等2016), 但该合成途径后期相关基因报道极少(Wang等2015)。因此, 薯蓣皂苷元合成途径的详细分子机理还有待进一步探究。

实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)技术(Bustin 2002; Radonić等2004)具有灵敏

度高、特异性高和重复性好等优点, 是分析基因表达量的高效方法之一。但在qPCR过程中需要引进稳定表达的内参基因对检测基因的表达进行标准化分析(Gutierrez等2008a; Brunner等2004)。采用qPCR分析菊叶薯蓣块茎中薯蓣皂苷元合成途径相关基因的表达模式, 有助于揭示该合成途径的分子机理。然而, 目前尚未见任何薯蓣属相关内参基因筛选的报道。作为标准的内参基因, 其应具备在不同组织器官、不同环境和不同胁迫条件表达相对稳定等特点(Quackenbush 2002; Thellin等1999)。一些表达相对稳定的管家基因常被选定为内参基因, 如磷酸甘油酸脱氢酶基因(phosphoglycerate dehydrogenase)、多聚泛素酶基因(ubiquitin)、微管蛋白基因(tubulin)等(Faccioli等2007; Huggett等2005; Dheda等2005)。然而, 研究表明, 在不同物种, 甚至在相同物种不同发育时期或不同处理下, 管家基因的表达水平并非持续稳定不变(Thellin等1999; Gutierrez等2008b)。因此, 筛选适用于菊叶薯蓣不同发育时期块茎的qPCR标准化分析的内参基因是非常必要的。

转录组测序(transcriptome sequencing)是一种研究非模式物种基因表达水平和调控规律的有

收稿 2017-09-11 修定 2018-01-10

资助 国家科技支撑计划项目(2015BAD15B03)。

* 共同通讯作者: 谢君(xiejun@scau.edu.cn)、钟春梅(zhongchunmei@scau.edu.cn)。

效手段。目前基于转录组测序的qPCR内参基因筛选方法已在许多物种中运用,如忽地笑(*Lycoris aurea*)、木薯(*Manihot esculenta*)、侧柏(*Platycladus orientalis*)等(Ma等2016; Hu等2016; Chang等2011),是一种新的有效的内参基因筛选方法。

本研究根据建立的菊叶薯蓣转录组数据库(Wang等2015)和相关文献报道的传统内参基因,筛选出ubiquitin-conjugating enzyme E2 (*UBC7*)、*MMS ZWEI homologue 3 (MMZ3)*、*tubulin beta-7 (TUB7)*、*actin 1 (ACT1)*、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit 1 (GAPC1)*、*elongation factor 1-alpha (EF-1 α 2)*、*cyclophilin 5 (CYP5)*、*histone H2A 2 (H2A2)*共8个基因为候选内参基因,通过qPCR分析,结合GeNorm (Vandesompele等2002)、NormFinder (Andersen等2008)和BestKeeper (Pfaffl等2004)三个常用统计学程序分析候选内参基因的表达稳定性,筛选出适用于qPCR分析菊叶薯蓣块茎不同发育时期块茎中薯蓣皂苷元合成相关基因表达的内参基因,为探究菊叶薯蓣块茎薯蓣皂苷元合成途径的分子机理研究提供参考,也为近源薯蓣属植物内参基因的筛选提供线索。

1 材料与方 法

1.1 材料与处理

以菊叶薯蓣(*Dioscorea composita* Hemsl.)块茎为实验材料,采样地点为广东省韶关市翁源县(24°7'30"~24°37'15"N 113°39'2"~114°18'5"E)。以整株挖掘的方式分别挖掘一、二、三年齡的菊叶薯蓣成苗块茎为实验材料,去除地上部分枝叶后,对块茎进行流水冲洗,直至没有泥土和砂石残留,并用吸水纸吸干多余水分,液氮速冻后保存于-80°C冰箱备用;每个样品设3个生物学重复。根据菊叶薯蓣块茎所具有的多年生、不腐烂、在老化的块茎上继续长出新块茎的生长特性(郑惠兰1990),本研究对二和三年齡的块茎进行分段取材,分别选取新生和老化部分,并命名为新块茎和老块茎。

1.2 不同发育时期块茎总RNA的提取和cDNA第一链的合成

实验前液氮预冷研钵、镊子等实验器具,样品在液氮浸润下进行研磨。研磨后的样品使用天恩泽柱式植物RNA_{OUT}提取试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司)进行总RNA提取。使用1% (m/v)

琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性,并使用NanoDrop 2000c (Quawell, 美国)检测RNA的浓度和纯度。以RNA为模板使用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa, 日本)反转录合成cDNA第一链,产物放置于-20°C冰箱中保存备用。采用的反应体系为:模板RNA 500 ng, 5×gDNA Eraser Buffer 2 μ L, gDNA Eraser 1 μ L; 反应程序: 42°C 2 min, 冰上冷却2 min; 5×PrimeScript® Buffer (for Real-time) 4 μ L, PrimScript® RT Enzyme Mix I 1 μ L, RT Primer Mix 1 μ L, 用RNase Free dH₂O补至20 μ L体系; 反应程序: 37°C 15 min, 85°C 5 s, 4°C保存。

1.3 候选内参基因筛选和引物设计

根据本实验室建立的菊叶薯蓣转录组数据库(以UniGene ID如comp57518_c0为准)和相关文献报道的常用内参基因,选取了comp57518_c0 (*UBC7*)、comp58997_c2 (*MMZ3*)、comp29062_c0 (*TUB7*)、comp43854_c0 (*ACT1*)、comp21992_c0 (*GAPC1*)、comp29089_c0 (*EF-1 α 2*)、comp53470_c0 (*CYP5*)和comp41357_c1 (*H2A2*)共8个基因为候选内参基因,使用Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)和Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>)在线软件设计特异性引物(表1)并送生工生物工程(广州)股份有限公司合成引物。

1.4 qPCR

qPCR反应在Eppendorf AG 22331 Hamburg real time PCR仪(Eppendorf, 德国)上进行,反应体系(20 μ L)为: cDNA模板2 μ L, 上游引物1 μ L, 下游引物1 μ L, SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (2×) 10 μ L, ddH₂O 6 μ L。所用程序为: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 40个循环; 并添加由软件自动生成的溶解曲线。反应结束后根据溶解曲线分析每个基因的扩增特异性和获取8个基因的C_T值采用Origin 8软件绘制C_T值分布图。

1.5 绘制标准曲线及计算基因扩增效率

取不同发育时期块茎的cDNA模板,依次稀释为模板初始浓度的10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴,分别记为C₀、C₁、C₂、C₃和C₄共5个梯度。通过qPCR反应,获得5个梯度下每个候选内参基因的C_T值。以模板浓度的logC_n (0≤n≤4)为横坐标,以C_T值为纵坐标绘制标准曲线,可以算出斜率k和相关

表1 菊叶薯蓣候选内参基因qPCR的引物序列和扩增参数

Table 1 Primer sequences and amplification parameters for candidate reference genes of *D. composita* derived from qPCR

基因	引物序列(5'→3')	斜率	扩增效率	相关系数
<i>H2A2</i>	正向: GAAGTTGCCTTCTTCGCAGC 反向: GTCCCAAGCCGACCTAGAAG	-3.39	97.35	0.9982
<i>EF-1a2</i>	正向: CCCTAGCTGCTTTTCCGGA 反向: ACTTGCCAGAGTCGACATGG	-3.37	97.98	0.9999
<i>CYP5</i>	正向: GCAGGCTTCCATCAATCTCA 反向: AAGAGGATGATCTCGGTCCCA	-3.34	99.06	0.9998
<i>GAPC1</i>	正向: GTGACAGCAGGTCTAGCATCTT 反向: CTTGGTCTGAACATGTGGCG	-3.46	94.67	0.9996
<i>TUB7</i>	正向: AGACAACATCAACCCTGGACT 反向: GAGGCTGAGAGCAACATGAAT	-3.35	98.76	0.9993
<i>MMZ3</i>	正向: ATCGATCACCCATGACGCTC 反向: CCCTTTCACCGGTTCAAG	-3.49	93.26	0.9991
<i>UBC7</i>	正向: TATCATCCACAAGGCCAGCC 反向: CCTTCTCTCATGGCGGTC	-3.35	98.68	0.9993
<i>ACT1</i>	正向: GCCGTACAAGTCCTTCCTG 反向: CCATCGGTGCAGAAAGGTT	-3.28	101.92	0.9983

系数 R^2 。通过公式 $E=(10^{-1/k}-1)\times 100\%$, 计算出扩增效率 E 。

1.6 数据分析

将qPCR获得的8个候选内参基因的 C_T 值使用GeNorm、NormFinder和BestKeeper三个统计学软件进行分析, 以得到在不同组织中稳定表达的内参基因。其中GeNorm和NormFinder以 C_T 值转换的相对表达量为初始数据进行分析, 而BestKeeper以原始 C_T 值为初始数据进行分析。

2 实验结果

2.1 样品总RNA的质量检测

选取不同发育时期的菊叶薯蓣块茎提取总RNA, 经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, RNA电泳条带清晰明亮, 无可见的DNA污染(图1), 可见RNA完整性较好且无基因组DNA污染。使用NanoDrop 2000c检测RNA纯度, 结果显示, 样品 $OD_{260/280}$ 为1.8~2.1, $OD_{260/230}$ 为1.8~2.2。以上检测结果表明, RNA样品完整性较好, 纯度较高, 可进行后续实验。

2.2 扩增效率和扩增特异性分析

利用8个候选内参基因的引物, 分别对5个浓度梯度(10倍稀释)的cDNA模板进行qPCR扩增, 并根据获得的数据绘制各候选内参基因的标准曲线。结果显示, 所有候选内参基因的相关系数 R^2 均达0.99以上, 且扩增效率介于93.26%~101.92%之间(表

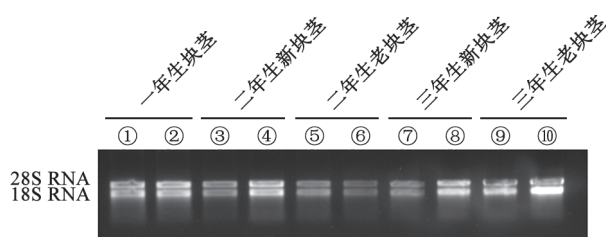


图1 菊叶薯蓣不同发育时期块茎总RNA的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoretogram of total RNA from *D. composita* tubers of different developmental stages

1), 表明cDNA模板量与相应的 C_T 值具有较好的线性关系, 满足qPCR对引物扩增效率的要求, 确保实验结果的可靠性。同时, 溶解曲线分析结果表明, 8个候选内参基因均具有明显的单一信号峰, 且同一样品重复性良好(图2), 表明引物的特异性高, 结果准确可信, 可进行后续实验。

2.3 候选内参基因表达丰度分析

C_T 值为基因进行qPCR扩增时到达预设的阈值时所需的循环数, 循环数越小代表起始基因的模板浓度越高。对8个候选内参基因在不同发育时期块茎样品中的 C_T 值进行整理分析, 评估这些基因的平均表达丰度, 如图3所示。结果显示, 8个候选内参基因的 C_T 值介于17~25之间, 其中大部分集中在20~24之间, 表明表达丰度适中。其中*GAPC1*

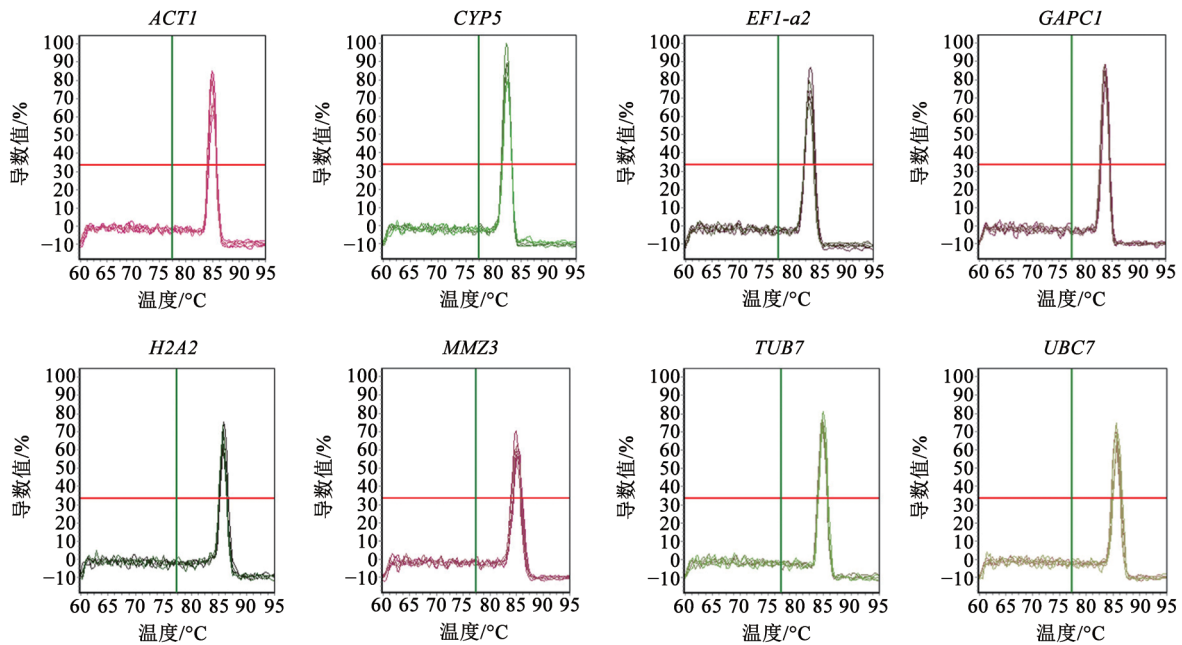
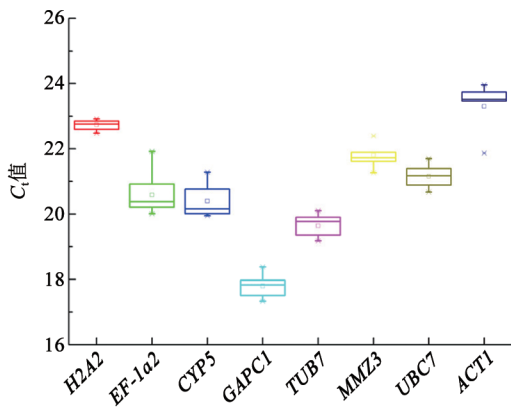


图2 八个候选内参基因的qPCR溶解曲线

Fig.2 qPCR melting curves of eight candidate reference genes

图3 八个候选内参基因的 C_T 值分布图Fig.3 C_T value distribution of eight candidate reference genes

大矩形框为四分位间距框, 中间横线为中位数, 小矩形框为平均数, 框外星号为异常值, 上下竖线分别为Whisker上限和Whisker下限。

的 C_T 值最低, 范围介于17.33~18.38之间, 显示其表达丰度最高; 而 $ACT1$ 的 C_T 值最高, 范围介于21.99~23.93之间, 显示其表达丰度最低。

2.4 候选内参基因稳定性分析

采用筛选内参基因3个常用但算法不同的分析软件GeNorm、NormFinder和BestKeeper, 对8个候选内参基因在菊叶薯蓣不同发育时期块茎中的表达稳定性进行分析。

2.4.1 GeNorm分析

GeNorm通过计算各候选内参基因在不同组织中的表达稳定值(expression stability value, M)来衡量其表达稳定性。该软件以 $M=1.5$ 为阈值, 当候选内参基因的 M 值大于1.5则不适于作为内参基因。 M 值越小, 稳定性越高, 越合适作为内参基因。按照 M 值由高到低排列依次为: $CYP5=GAPC1>MMZ3>TUB7>H2A2>EF-1\alpha2>UBC7>ACT1$ 。由图4-A可见, 8个候选内参基因的 M 值均小于1.5, 以 $ACT1$ 最大, 为0.552; $CYP5$ 和 $GAPC1$ 最小, 均为0.240, 表明这些候选内参基因均适合作为内参基因。其中 $CYP5$ 和 $GAPC1$ 最佳, 其次是 $MMZ3$ 、 $TUB7$ 和 $H2A2$; 相对而言, $ACT1$ 和 $UBC7$ 表达最不稳定。

此外, GeNorm通过计算配对变异值(pairwise variation value)来确定最适宜的内参基因个数, 以获得准确可靠的结果。该程序以0.15为阈值, 当 $V_{n/n+1}$ 小于1.5时, 则 n 个内参基因就可以满足校正目的基因表达量的要求。由图4-B可知 $V_{2/3}$ 为0.075, 小于1.5, 表明最适合内参基因个数为2。

2.4.2 NormFinder分析

NormFinder与GeNorm类似, 其候选内参基因的表达稳定性与表达稳定值 M 呈负相关关系。即

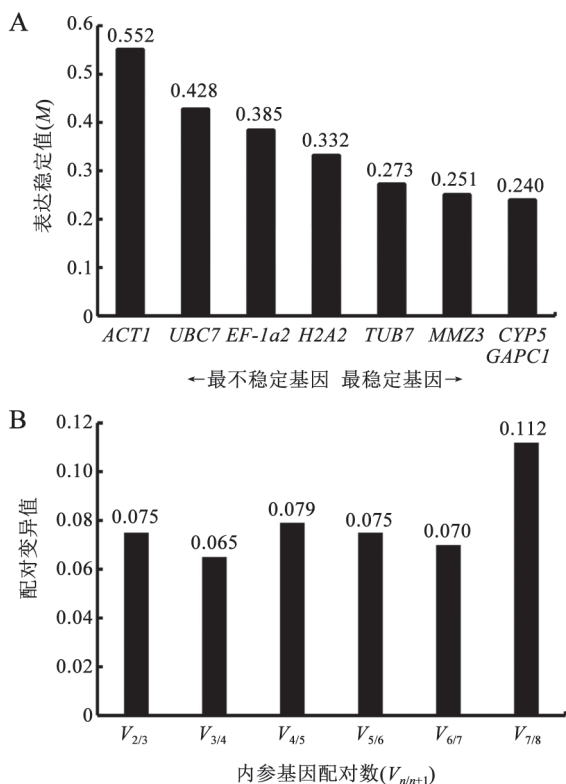


图4 GeNorm分析8个候选内参基因表达稳定性(A)和最佳内参基因个数(B)
Fig.4 Expression stabilities of eight candidate reference genes (A) and optimal numbers of reference genes (B) analyzed by GeNorm

M值越小, 越合适作为内参基因。分析结果显示(图5), 8个候选内参基因按照M值由高到低排列依次为: *H2A2*>*TUB7*>*EF-1α2*>*GAPC1*>*MMZ3*>*UBC7*>*CYP5*>*ACT1*。其中*H2A2*和*TUB7*表达稳定值最小, 分别为0.087和0.138, 即表达稳定性最好; 而表达稳定值最大的是*ACT1*和*CYP5*, 分别为0.617和0.350, 即表达稳定性最差。因此*H2A2*和*TUB7*最

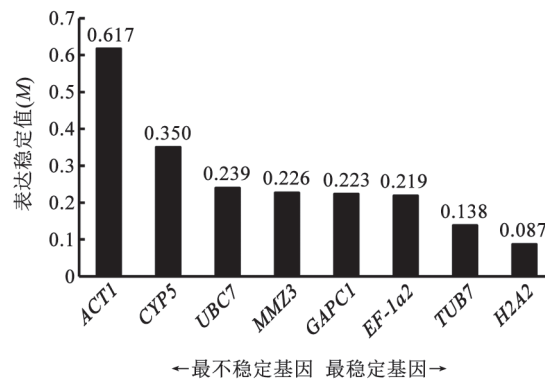


图5 NormFinder分析8个候选内参基因的表达稳定性
Fig.5 Expression stabilities of eight candidate reference genes analyzed by NormFinder

适合作为内参基因, 其次是*EF-1α2*和*GAPC1*。

2.4.3 BestKeeper分析

BestKeeper分别根据候选内参基因在不同样品中平均C_t值计算标准差(standard deviation, SD), SD值越小, 表达越稳定。该程序以SD=1为临界值, SD值大于1时表明不合适作为内参基因; 反之则表示基因的表达稳定性好。由表2所示, 8个候选内参基因的SD值均小于1, 故均合适作为内参基因, 其中*TUB7*和*H2A2*表达稳定性最好, 最适合作为内参基因, 其次是*UBC7*和*EF-1α2*。

根据上述3种程序的分析结果, GeNorm分析得出最稳定的基因组合为*CYP5*和*GAPC1*, 而NormFinder和BestKeeper分析出的均为*H2A2*和*TUB7*组合, GeNorm分析中*H2A2*和*TUB7*组合也符合内参基因要求。综合而言, 最适合内参基因的组合为*H2A2*和*TUB7*。

2.5 内参基因稳定性验证

分别使用*H2A2*和*TUB7*作为内参基因, 对菊叶

表2 BestKeeper分析8个候选内参基因表达稳定性

Table 2 Expression stabilities of eight candidate reference genes analyzed by BestKeeper

基因	几何平均数	算数平均数	最小值	最大值	标准差	稳定性排序
<i>TUB7</i>	19.88	19.88	19.79	19.99	0.07	1
<i>H2A2</i>	22.73	22.73	22.62	22.87	0.09	2
<i>UBC7</i>	21.10	21.10	20.77	21.32	0.22	3
<i>EF-1α2</i>	20.78	20.79	20.39	21.18	0.26	4
<i>MMZ3</i>	21.95	21.95	21.72	22.37	0.28	5
<i>GAPC1</i>	17.89	17.89	17.46	18.30	0.29	6
<i>CYP5</i>	20.63	20.64	20.09	21.23	0.40	7
<i>ACT1</i>	23.13	23.14	21.93	23.89	0.81	9

薯蓣 *WRKY* 转录因子家族中的 *WRKY10* 基因进行 qPCR 表达分析, 从而验证内参基因的稳定性。如图 6 所示, *WRKY10* 在以 *H2A2* 和 *TUB7* 为内参时的表达情况相一致, 由此可见 *H2A2* 和 *TUB7* 可作为菊叶薯蓣不同发育时期块茎 qPCR 分析时合适的内参基因。

3 讨论

近年来, qPCR 技术已成为研究基因表达量不可或缺的手段, 但其准确性依赖于内参基因的稳定性。由于在不同物种, 甚至在同物种不同组织、不同生理阶段、不同胁迫条件下内参基因表达的不稳定性 (Suzuki 等 2000), 根据实验条件筛选合适的内参基因显得尤为重要。基于转录组测序的 qPCR 内参基因筛选是一种有效的新方法, 可为缺乏全基因组的非模式物种如菊叶薯蓣内参基因的筛选提供技术和线索 (Ma 等 2016; Hu 等 2016; Chang 等 2011)。

本研究根据菊叶薯蓣的转录组数据库和相关文献报道的常用内参基因, 选取了 *UBC7*、*MMZ3*、*TUB7*、*ACT1*、*GAPC1*、*EF-1 α 2*、*CYP5* 和 *H2A2* 共 8 个基因为候选内参基因。通过 qPCR 分析, 结合 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 三个统计学软件对这些基因在菊叶薯蓣不同发育时期块茎中的表达稳定性进行了分析, 以期获得表达最为稳定

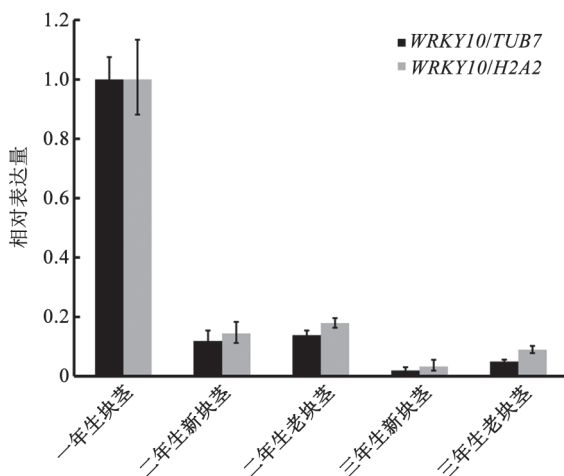


图6 以 *H2A2* 和 *TUB7* 分别作为内参基因时 *WRKY10* 基因的表达分析

Fig.6 Expression analysis of *WRKY10* using *H2A2* and *TUB7* as reference genes

的内参基因。结果表明, 三种软件的分析所得结论基本一致, 但其稳定性排序略有不同, 推测是三个统计学软件算法的不同导致的结果 (Mafra 等 2012; Vandesompele 等 2002; Andersen 等 2008; Pfaffl 等 2004)。NormFinder 和 BestKeeper 的分析结果几乎一致, 表达相对稳定且排序前 5 的内参基因中均包括 *H2A2*、*TUB7*、*EF-1 α 2* 和 *MMZ3*, 其中 *H2A2* 和 *TUB7* 表达最稳定, 表明 *H2A2* 和 *TUB7* 是最适合的内参基因。GeNorm 的分析结果显示, 前 5 个相对表达稳定的基因为 *CYP5*、*GAPC1*、*MMZ3*、*TUB7* 和 *H2A2*, 且均适合作为内参基因, 其中最稳定的为 *CYP5* 和 *GAPC1*, 而 *MMZ3* 和 *TUB7* 次之。GeNorm 分析内参基因的配对变异值结果表示, 理想的内参基因个数为 2 就能满足校正目的基因的表达量需求。相比使用单一的内参基因, 使用两个或两个以上的内参基因得到的结果更准确可靠 (Maroufi 等 2010; Luo 等 2014)。以 *H2A2* 和 *TUB7* 分别为内参基因对菊叶薯蓣 *WRKY10* 基因进行 qPCR 表达分析时发现, *WRKY10* 表达情况相一致, 可见 *H2A2* 和 *TUB7* 的稳定性较好。综上所述, 一致选定 *H2A2* 和 *TUB7* 为菊叶薯蓣不同发育时期块茎 qPCR 分析基因表达的最佳内参基因。

H2A2 是一种编码组蛋白的 *H2A* (*histone 2A*) 基因, 是 *H2A* 基因家族中的一员。组蛋白是真生物染色质中的碱性蛋白, 在生物体内表达稳定。研究表明, 在许多物种筛选内参基因时均得到组蛋白基因 *H2A* 可作为最合适的内参基因。Kundu 等 (2013) 得到在盐胁迫的条件下组蛋白基因 *H2A* 在黑吉豆 (*Vigna mungo*) 中的表达最为稳定。Yan 等 (2014) 在筛选红砂 (*Reaumuria songarica*) 的内参基因时发现组蛋白基因 *H2A* 为最佳内参基因。Velada 等 (2014) 发现在高温条件下金丝桃 (*Hypericum perforatum*) 组蛋白基因 *H2A* 表达最稳定。微管蛋白基因 *TUB* 编码微管蛋白, *TUB* 作为常见的管家基因在很多物种中被作为内参基因, 如在三色堇花 (*Viola tricolor*) 和麻风树 (*Jatropha curcas*) 的不同发育时期中 *TUB* 表达最稳定 (Zeng 等 2016; Zhang 等 2013)。可见, *H2A* 和 *TUB* 基因是常见的内参基因, 这与本研究的结论相一致。因此, 本研究选择 *H2A* 家族中的 *H2A2* 和 *TUB* 家族中的 *TUB7* 作为菊叶薯蓣不同发育时期块茎 qPCR 分析时最佳内参基因。

本研究首次报道了*H2A2*和*TUB7*作为菊叶薯蓣不同发育时期块茎qPCR分析时最合适的内参基因,为菊叶薯蓣皂苷元合成途径的分子机理研究提供参考,也为近源薯蓣属植物内参基因的筛选提供线索。

参考文献(References)

- Aighewi BA, Asiedu R, Maroya N, et al (2015). Improved propagation methods to raise the productivity of yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Food Sec*, 7 (4): 823–834
- 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 (15): 5245–5250
- Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH (2004). Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol*, 4 (1): 14–21
- Bustin SA (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29 (1): 23–39
- Chang E, Shi S, Liu J, et al (2011). Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) using real-time PCR. *PLoS ONE*, 7 (3): e33278
- Chen X, Yang T, Hu S (2007). Industrialization development advantages and prospect analysis of comprehensive utilization of *Dioscorea composita*. *Panzhijia Sci-Tech Inform*, 32 (4): 20–28, 32 (in Chinese) [陈新荣, 杨天龙, 胡世波(2007). 菊叶薯蓣产业化发展优势及综合利用前景分析. *攀枝花科技与信息*, 32 (4): 20–28, 32]
- Dey P, Chowdhuri SR, Sarkar MP, et al (2016). Evaluation of anti-inflammatory activity and standardisation of hydro-methanol extract of underground tuber of *Dioscorea alata*. *Pharm Biol*, 54 (8): 1474–1482
- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, et al (2005). The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem*, 344 (1): 141–143
- Diarra ST, He J, Wang J, et al (2013). Ethylene treatment improves diosgenin accumulation in *in vitro* cultures of *Dioscorea zingiberensis* via up-regulation of CAS and HMGR gene expression. *Electron J Biotech*, 16 (5): 6
- Faccioli P, Ciceri GP, Provero P, et al (2007). A combined strategy of “in silico” transcriptome analysis and web search engine optimization allows an agile identification of reference genes suitable for normalization in gene expression studies. *Plant Mol Biol*, 63 (5): 679–688
- Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, 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 Biotechnol J*, 6 (6): 609–618
- Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, et al (2008). Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *Plant Cell*, 20 (7): 1734–1735
- Hu M, Hu W, Xia Z, et al (2016). Validation of reference genes for relative quantitative gene expression studies in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by using quantitative real-time PCR. *Front Plant Sci*, 7: 680
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, et al (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*, 6 (4): 279–284
- Jiang D, Rong Q, Chen Y, et al (2016). Molecular cloning and functional analysis of squalene synthase (SS) in *Panax notoginseng*. *Int J Biol Macromol*, 95: 658–666
- Kundu A, Patel A, Pal A (2013). Defining reference genes for qPCR normalization to study biotic and abiotic stress responses in *Vigna mungo*. *Plant Cell Rep*, 32 (10): 1647–1658
- Liu Y, Li H, Fan Y, et al (2016). Antioxidant and antitumor activities of the extracts from Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) flesh and peel and the effective compounds. *J Food Sci*, 81 (6): H1553–H1564
- Luo H, Luo K, Luo L, et al (2014). Evaluation of candidate reference genes for gene expression studies in *Cymbidium kanran*. *Sci Hort*, 167 (3): 43–48
- Luo HM, Song JY, Li XY, et al (2013). Cloning and expression analysis of a key device of *HMGR* gene involved in ginsenoside biosynthesis of *Panax ginseng* via synthetic biology approach. *Acta Pharm Sin*, 48 (2): 219–227 (in Chinese with English abstract) [罗红梅, 宋经元, 李雪莹等(2013). 人参皂苷合成生物学关键元件HMGR基因克隆与表达分析. *药学学报*, 48 (2): 219–227]
- Ma R, Xu S, Zhao Y, et al (2016). Selection and validation of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Lycoris aurea*. *Front Plant Sci*, 7: 536
- Mafra V, Kubo KS, Alves-Ferreira M, et al (2012). Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PLoS ONE*, 7 (2): e31263
- Manoharan R, Tripathi JN, Tripathi L (2016). Plant regeneration from axillary bud derived callus in white yam (*Dioscorea rotundata*). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 126 (3): 481–497
- Maroufi A, Van Bockstaele E, De Loose M (2010). Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *BMC Mol Biol*, 11: 15
- 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. *Biotechnol Lett*, 26 (6): 509–515
- Quackenbush J (2002). Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet*, 32 (Suppl): 496–501
- Radonić A, Thulke S, Mackay IM, et al (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Bioph Res Co*, 313 (4): 856–862
- Raman V, Galal AM, Avula B, et al (2014). Application of anatomy and HPTLC in characterizing species of *Dioscorea* (Dioscoreaceae). *J Nat Med*, 68 (4): 686–698
- Song FJ (2003). The research and production situation of diosgenin in dioscorea plants, a kind of steroidal drugs source plants. *Chin Tradit Pat Med*, 25 (3): 232–234 (in Chinese) [宋发军(2003). 甾体药物源植物薯蓣属植物中薯蓣皂苷元的研究及生产状况. *中成药*, 25 (3): 232–234]
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR (2000). Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, 29 (2): 332–337
- Tang SR, Yang RT, Pan FS, et al (2007). Steroidal saponin and steroidal sapogen in Chinese *Dioscorea* L. *J Plant Resour Environ*, 16 (2): 64–72 (in Chinese with English abstract) [唐世蓉, 杨如同, 潘福生等(2007). 中国薯蓣属植物中的甾体皂苷及甾体皂苷元. *植物资源与环境学报*, 16 (2): 64–72]
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*, 75 (2–3): 291–295
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7): research0034
- Velada I, Ragonezi C, Arnholdt-Schmitt B, et al (2014). Reference genes selection and normalization of oxidative stress responsive genes upon different temperature stress conditions in *Hypericum perforatum* L. *PLoS ONE*, 9 (12): e115206
- Wang X, Chen D, Wang Y, et al (2015). *De novo* transcriptome assembly and the putative biosynthetic pathway of steroidal sapogenins of *Dioscorea composita*. *PLoS ONE*, 10 (4): e0124560
- Yan X, Dong X, Zhang W, et al (2014). Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in *Reaumuria soongorica*. *PLoS ONE*, 9 (8): e104124
- Ye Y, Wang R, Jin L, et al (2014). Molecular cloning and differential expression analysis of a *squalene synthase* gene from *Dioscorea zingiberensis*, an important pharmaceutical plant. *Mol Biol Rep*, 41 (9): 6097–6104
- Zeng Y, Li J, Gong S, et al (2016). Validation of reference genes in pansy for accurate transcript normalization during its flowering stages. *Ind J Genet*, 76 (2): 195–201
- Zhang L, He LL, Fu QT, et al (2013). Selection of reliable reference genes for gene expression studies in the biofuel plant *Jatropha curcas* using real-time quantitative PCR. *Int J Mol Sci*, 14 (12): 24338–24354
- Zheng H (1990). Study on the growth and development of *Dioscorea composita*. *Plant Diver Resour*, 12 (1): 75–79 (in Chinese with English abstract) [郑惠兰(1990). 菊叶薯蓣生长发育的研究. *植物分类与资源学报*, 12 (1): 75–79]

Screening of reference genes in *Dioscorea composita* tubers of different development stages

ZENG De-Fu, ZHOU Jian-Chan, ZHONG Chun-Mei*, XIE Jun*

College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University; Key Laboratory of Biomass Energy of Guangdong Regular Higher Education Institutions; Key Laboratory of Energy Plant Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, Guangzhou, 510642, China

Abstract: *Dioscorea composita* of the family Dioscoreaceae produces the pharmaceutically important compound diosgenin. In order to study the expression patterns of the key genes in diosgenin biosynthetic pathway in *D. composita* tubers, screening and validation of the steadily expressing reference genes are inevitable. We analyzed *D. composita* transcriptome and selected eight candidate genes such as *ubiquitin-conjugating enzyme E2 (UBC7)*, *MMS ZWEI homologue 3 (MMZ3)*, *tubulin beta-7 (TUB7)*, *actin 1 (ACT1)*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit 1 (GAPC1)*, *elongation factor 1-alpha (EF-1 α 2)*, *cyclophilin 5 (CYP5)* and *histone H2A 2 (H2A2)* for expression stability analysis. Statistical analysis of quantitative real-time PCR (qPCR) results using GeNorm, NormFinder and BestKeeper showed that the expression of *TUB7* and *H2A2* are the most stable in tubers, and thus can be used as reference genes for qPCR analysis in *D. composita*. In summary, our findings identified suitable reference genes for qPCR in *D. composita* and laid foundation for studying gene expression in diosgenin biosynthetic pathway.

Key words: *Dioscorea composita*; reference genes; qPCR; GeNorm; NormFinder; BestKeeper

Received 2017-09-11 Accepted 2018-01-10

This work was supported by the National Science and Technology Support Project of China (2015BAD15B03).

*Co-corresponding authors: Xie J (xiejun@scau.edu.cn), Zhong CM (zhongchunmei@scau.edu.cn).