

大豆胞囊线虫侵染下野生大豆根组织实时定量 PCR 分析中内参基因的筛选

袁翠平¹, 齐广勋², 王玉民¹, 赵洪钡², 刘晓冬¹, 王英男¹, 李玉秋¹, 董英山¹

(1. 吉林省农业科学院 大豆研究所/大豆国家工程研究中心, 吉林 长春 130033; 2. 吉林省农业科学院 作物资源研究所, 吉林 公主岭 130033)

摘要:以高抗和高感 HG 0 大豆胞囊线虫的野生大豆种质为试验材料, 采用 qRT-PCR 技术检测了 *ACT11* (Glyma. 18G290800)、*Tubulin_motif* (Glyma. 19G194800) 等 24 个候选持家基因在不同大豆胞囊线虫侵染时期(接种后 9, 15 和 20 d)野生大豆根系中的基因表达情况, 除 *Actin* (Glyma. 08G182200) 出现了非特异扩增外, 其它 23 个持家基因的 qRT-PCR 扩增效果均理想, 扩增特异性高。分析上述 23 个持家基因的表达丰度, 并利用 BestKeeper、geNorm 和 Normfinder 对其表达稳定性进行评价。结果表明:持家基因间的表达丰度不尽相同, 而且有些持家基因在不同品种间或不同处理间(接种虫卵和接种水)也存在表达丰度的差异。23 个持家基因的表达稳定性也不相同, 综合来看, 表达最不稳定的基因为 *Cons9* (Glyma. 10G152200)、*Cons2* (Glyma. 17G138500)、*Cons1* (Glyma. 15G270900) 和 *Tubulin_motif* (Glyma. 20G136000), 本试验条件下它们不适宜作内参基因; 其余持家基因相对稳定, 本试验条件下可选择 *Tubulin_motif* (Glyma. 15G132200)、*Cons6/SKIP16* (Glyma. 12G051100) 或 *Tubulin_motif* (Glyma. 05G110200) 作为内参基因, 它们表达量较高, 表达最为稳定, 其 Ct 平均值分别为 25.7、26.5 和 25.0, 标准偏差分别为 0.540、0.575 和 0.490, geNorm 软件评价其稳定性的 M 值分别为 0.698、0.715 和 0.727。该研究为野生大豆抗胞囊线虫相关基因的表达分析提供了参考。

关键词:野生大豆; 内参基因; 实时定量 PCR; 大豆胞囊线虫

中图分类号:S565.1; S432.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2018.01.0022

Reference Gene Identification for Real-time Quantitative PCR Analysis in *Glycine soja* Roots Infected with *Heterodera glycine*

YUAN Cui-ping¹, QI Guang-xun², WANG Yu-min¹, ZHAO Hong-kun², LIU Xiao-dong¹, WANG Ying-nan¹, LI Yu-qiu¹, DONG Ying-shan¹

(1. Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences / National Engineering Research Center for Soybean, Changchun 130033, China; 2. Crop Germplasm Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136199, China)

Abstract: Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) has been widely used in crops for gene expression analysis, and reference genes are required in qRT-PCR analysis to minimize influences of RNA quality and quantity and efficiency of reverse transcription. Housekeeping genes are often selected as reference genes, however many of the housekeeping genes provide stable expression under only certain environments. So it is necessary to identify and select suitable reference genes for a given experiment. In our study, 24 candidate housekeeping genes were selected for their gene expression analysis, there happened nonspecific amplification products for qRT-PCR of *Actin* (Glyma. 08G182200). The other 23 candidate housekeeping genes were evaluated for their expression level and stability in roots of susceptible and resistant wild soybean accessions under soybean cyst nematode HG 0 infection at 9, 15 and 20 days after inoculation. Housekeeping genes had different expression level, and some of them had different expression level between wild soybean accessions, or between different treatments. There also existed difference in expression stability among the 23 housekeeping genes. As a whole, *Cons9* (Glyma. 10G152200), *Cons2* (Glyma. 17G138500), *Cons1* (Glyma. 15G270900) and *Tubulin_motif* (Glyma. 20G136000) were the top four least stable genes, and they were not suitable for the study. The three housekeeping genes of *Tubulin_motif* (Glyma. 15G132200), *Cons6/SKIP16* (Glyma. 12G051100) and *Tubulin_motif* (Glyma. 05G110200) were the most stable genes with M value of 0.698, 0.715 and 0.727 respectively and with their expression level of Ct = 25.7, 26.5 and 25.0 respectively, which indicated that they are ideal reference genes for qRT-PCR analysis under our experiment conditions.

Keywords: *Glycine soja*; Reference gene; Real-time quantitative PCR; *Heterodera glycine*

收稿日期:2017-08-07
基金项目:吉林省科技厅国际合作项目(20170414009GH);国家自然科学基金青年科学基金项目(31200240);吉林省农业科学院创新工程(CXGC2017ZD014)。
第一作者简介:袁翠平(1978-),女,博士,副研究员,主要从事野生大豆优异基因发掘与利用研究。E-mail:cpyuan2004@126.com。
通讯作者:董英山(1963-),男,研究员,主要从事野生大豆资源研究与利用研究。E-mail:ysdong@cjaas.com。

实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR)是当前研究基因表达强有力的技术手段,具有灵敏度高、重复性好、定量准确等优点,被广泛应用于作物分子生物学和遗传学研究等领域^[14]。内参基因是 qRT-PCR 分析准确与否的关键因素,选择合适的内参基因是 qRT-PCR 研究的重要前提。植物中组成性表达的持家基因是植物维持生命活动所必需的细胞器骨架的基本组分,参与基本生化代谢过程,如肌动蛋白基因 ACT、 α/β 微管蛋白基因 TUA/TUB、甘油醛-3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 GAPDH 等。理论上,这些持家基因在不同细胞或不同生理状态下能够稳定的表达。因此,在大多数植物基因表达研究中,以它们作为稳定表达的内参基因^[1, 3, 5-6]。然而,作物不同组织、不同生长发育过程、不同环境等条件下持家基因的表达稳定性差异明显。因此,针对大豆高温^[7]、低磷^[8]、盐^[9]、衰老^[9]、干旱^[7-11]、铝^[13]、光周期^[14]等非生物胁迫和大豆疫霉诱导^[14]、大豆花叶病毒^[9]、紫斑病菌^[15]、根结线虫^[16]、天鹅绒豆毛虫^[16]等生物胁迫,已开展了候选持家基因在不同组织的表达稳定性评价和适合特定条件的内参基因的筛选研究。

大豆胞囊线虫病是我国大豆生产上的重要病害^[17]。然而,大豆对胞囊线虫的相关基因表达研究均以 *Actin*^[18] 或 *Actin11*^[19] 为内参基因,尚未见在大豆胞囊线虫侵染下大豆持家基因表达稳定性评价的报道。本文以高抗和高感野生大豆种质为试验材料,检测 24 个候选持家基因在不同大豆胞囊线虫侵染时期野生大豆根系中的基因表达情况,评价其表达丰度和表达稳定性,以期筛选出适合大豆胞囊线虫侵染下野生大豆根系中基因表达研究的内参基因,探讨野生大豆对胞囊线虫的抗性机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 野生大豆和栽培大豆种质 野生大豆种质 ZYD03685 和 ZYD02688 分别高抗和高感大豆胞囊线虫 HG 0,用于大豆胞囊线虫侵染下野生大豆根系中基因表达研究。

7 份栽培大豆种质 (Peking, PI88788, PI90763, PI437654, PI209332, PI89772 和 PI548316) 作为鉴别寄主, Lee 68 作为感病对照,用于大豆胞囊线虫种群 HG 类型的鉴别。

1.1.2 含有大豆胞囊线虫的大豆根际土壤 含有大豆胞囊线虫的根际土壤取自吉林省洮南市吉林省农业科学院洮南综合试验站大豆田。其大豆胞囊线虫 HG 类型为 HG 0。

1.2 方法

1.2.1 大豆胞囊线虫种群 HG 类型的鉴别 大豆胞囊线虫种群 HG 类型的鉴别试验在温室中进行,温度为 $27 \pm 2^\circ\text{C}$ 。将 7 份鉴别寄主 (Peking, PI88788, PI90763, PI437654, PI209332, PI89772 和 PI548316) 和感病对照 Lee68 的种子各取 15 粒,播种在盛有蛭石的发芽床上。将含有大豆胞囊线虫的土壤过 20 目网筛,然后将过筛后的土壤搅拌均匀,装入上口直径 9.5 cm,下口直径 6 cm,高 17 cm 的塑料杯中。待大豆种植后 7 d 子叶展开时,将长势一致的大豆苗移栽到盛有病土的塑料杯中,置于温室中使其继续生长。试验设 2 次重复,每重复移栽 5 株。待移栽后 32 d,感病对照 Lee68 根系上呈现大量乳白色大豆胞囊线虫的胞囊。轻轻地将供试植株的根系从土壤中剥离出来,计数根上胞囊。按照 Niblack 等^[20]的计算方法和鉴别标准对供试土壤的大豆胞囊线虫种群 HG 类型进行鉴别。

1.2.2 大豆胞囊线虫虫卵的制备 大豆胞囊线虫的扩繁在温室中进行,温度为 $27 \pm 2^\circ\text{C}$ 。将含有大豆胞囊线虫的土壤装入直径 15 cm,高 17 cm 的塑料盆中,每盆种植大豆种质 Lee68 5 株,待种植后 35 d,将根系拔出,置于层筛上(自上而下分别为 20、40 和 60 目网筛),用较大压力的水流冲洗掉根系上的胞囊。将 60 目网筛上的胞囊收集到 1 L 的烧杯中,并利用胞囊、根系碎片、土壤等物质的沉降速度不同,将胞囊溶液进一步纯化。将纯化后的胞囊溶液倒入 60 目网筛上,用橡胶棒将其碾碎在筛网上,使之释放出卵和 2 龄幼虫,用洗瓶冲洗,将卵和 2 龄幼虫冲入 2 层套筛上(自上而下依次为 200 目和 500 目),用自来水多次冲洗 200 目网筛,将卵收集在 500 目网筛上。将 500 目网筛上的卵转移到 50 mL 烧杯中,配制成 $23\ 000$ 个卵 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的卵悬浮液,备接种用。

1.2.3 野生大豆的接种及其根系样品的处理 将供试野生大豆的种子各 60 粒用 0.5% NaClO 溶液消毒 3 min 后,用流动自来水冲洗 4 次。将消过毒的种子刻皮后种植在盛有高温灭菌珍珠岩的塑料钵中。在 27°C , 9 h 光照/15 h 黑暗的条件下培养 7 d 后,第一片三出复叶展开。将苗小心地拔出,并冲洗干净。每份供试材料的植株分为 6 组,每组 5 个植株,3 组为接种虫卵处理,3 组为对照处理(接种液为自来水)。将每组植株移到盛有高温灭菌珍珠岩的塑料钵中(珍珠岩占塑料钵容积的 2%),在根表面接种 5 mL 新鲜的虫卵悬浮液 ($23\ 000$ 个卵 $\cdot \text{mL}^{-1}$) (接种虫卵组)或 5 mL 的自来水(对照组),然后覆 2 cm 厚的高温灭菌的珍珠岩。放置于 27°C , 9 h 光照/15 h 黑暗的条件下培养。

接种后 9 d,每份供试材料随机选取 1 个对照组和 1 个处理组,将每个塑料钵的植株轻轻拔出,并将根系冲洗干净。从 5 个植株的根系中随机取 3 个植株的根系快速放置于液氮中,剩余 2 株用于大豆胞囊线虫侵染状况的观察。供试材料剩余 4 组的植株分别轻轻拔出,将根表面的虫卵和线虫冲洗掉后重新移栽到盛有高温灭菌珍珠岩的塑料钵中,放置在 27℃,9 h 光照/15 h 黑暗的条件下继续培养。分别在接种后 15 和 20 d,每份供试材料随机选取 1 个对照组和 1 个处理组,将每个塑料钵的植株轻轻拔出,并将根系冲洗干净。从 5 个植株的根系中随机取 3 个植株的根系快速放置于液氮中,剩余 2 株用于大

豆胞囊线虫侵染状况的观察。

1.2.4 RNA 的提取和 cDNA 的合成 将液氮中保存的根系样品,在液氮中研磨成粉末后,采用 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 根据其说明书进行 RNA 的提取,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,用 NanoDrop 2000 检测 RNA 的浓度和纯度。使用 TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 合成,反转录体系为 40 μL,其中含有 14 μL RNA 溶液。

1.2.5 引物设计 参考前人研究,选择了 24 个持家基因(表 1)。利用 Oligo 6.0 软件设计了 qRT-PCR 引物序列,由华大基因(北京)合成。

表 1 持家基因及其 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Housekeeping genes and primers for qRT-PCR

基因名称 Gene symbol	基因位点 Gene locus	引物 Primers(5′-3′)	参考文献 Reference
<i>TUB4</i>	Glyma.03G124400	F:AGGGCAATGCGGGAACCA R:GAAGTTGTCGGGCCCGAATA	Hu et al. 2009 ^[12]
<i>Tubulin_motif</i>	Glyma.04G023900	F:GCCAATGCGGTAACCA R:CTGCTGTTGCCTTCCTCGTT	Kim et al. 2011 ^[21]
<i>Cons17</i>	Glyma.04G047900	F:GCCACTGTTCCGACAACCTT R:CACCATCACTTGCCTTTGTG	Libault et al. 2008 ^[22]
<i>ACT2/7</i>	Glyma.04G215900	F:ACTCTGGCGATGGTGTTAGT R:GCCCCATCAGGAAGCTCGTAG	Hu et al. 2009 ^[12] Jian et al. 2008 ^[22]
<i>GAPDH</i>	-	F:GACTGGTATGGCATTCCGTGT R:GCCCTCTGATTCTCTCTTGA	Sun et al. 2016 ^[24]
<i>Tubulin_motif</i>	Glyma.05G110200	F:CAACCCAGAGAGCGCGTCT R:GCCTGGCCGATGTGGATTGA	Kim et al. 2011 ^[21]
<i>TUA5</i>	Glyma.05G157300	F:ACAACTCATCTCCGGCAAGG R:GCAGTTGTCGGCGAGCTT	Hu et al. 2009 ^[12]
<i>Cons10</i>	Glyma.05G207500	F:ACTGGGCTAAAGGGCATTAT R:ACCTTTGGAGACGGGAACA	Libault et al. 2008 ^[22]
<i>UKN2</i>	Glyma.06G038500	F:AGAGGAAGCGTGCAATGCT R:AACGTTTCCGGAGTAGATGT	Hu et al. 2009 ^[12]
<i>Tubulin</i>	Glyma.08G014200	F:ACTAGTTGAGAATGCGGATG R:GAAGCGGAGACAGCACGTTA	Kim et al. 2011 ^[21]
<i>HDC</i>	Glyma.08G050200	F:GCGCAACAAAGACGACCAAG R:CTTTGCGGACGCTTATCATC	Hu et al. 2009 ^[12]
<i>Actin</i>	Glyma.08G182200	F:AGGCTTCTTCTTCGCTGAC R:CCCATCCCAACCATTACACC	Kim et al. 2011 ^[21]
<i>Cons9</i>	Glyma.10G152200	F:CGCAACATGGAGATTCACGA R:GCTCACTGGTCCGCTCAG	Libault et al. 2008 ^[22]
<i>Cons6/SKIP16</i>	Glyma.12G051100	F:CCCAAGACATTGCGAGAG R:GGTTGTGTCAAAGCGAGTTC	Hu et al. 2009 ^[12] Kim et al. 2011 ^[21]
<i>Gmβ-actin</i>	Glyma.15G050200	F:TGCTGCACCAACGAACAAC R:CCCATCCCAACCATTACACC	Stolf-Moreira et al. 2011 ^[25]
<i>Tubulin_motif</i>	Glyma.15G132200	F:AGGGCAATGCGGTAACCA R:ATAAACATTGATGCGCTCCA	Kim et al. 2011 ^[21]

续表 1

基因名称 Gene symbol	基因位点 Gene locus	引物 PrimersI (5′-3′)	参考文献 Reference
<i>Cons1</i>	Glyma. 15G270900	F:GCTCCACCAACCGCCACTAA R:TTTCGGGCTTCATTGATTGC	Libault et al. 2008 ^[22]
<i>Cons11</i>	Glyma. 17G072300	F:TGGCAACAAGGTTAAGGTCA R:TGGGCACTAACGGAGAC	Libault et al. 2008 ^[22]
<i>Cons2</i>	Glyma. 17G138500	F:TTTCAACCCAATCCAATCCT R:TAACAATGGTTTTCGATGAT	Libault et al. 2008 ^[22]
<i>ACT11</i>	Glyma. 18G290800	F:GGCAGACGCTGAGGATATTC R:TGCTCACAAATTCGTTGTTCA	Hu et al. 2009 ^[12] Jian et al. 2008 ^[23]
<i>Tubulin_motif</i>	Glyma. 19G194800	F:AGTGTGTAAATGGCGACC R:CGAACCACACTTCCGATTGC	Kim et al. 2011 ^[21]
<i>TIP41</i>	Glyma. 20G130700	F:TTGTGGAAGTGGCACTATTG R:TCCATTATCAGCGAGTTCA	Hu et al. 2009 ^[12]
<i>Tubulin_motif</i>	Glyma. 20G136000	F:ACCAATCCCAAATCCTACGA R:AGCAAGCATTTCGGACCT	Kim et al. 2011 ^[21]
<i>Tubulin_motif</i>	Glyma. 20G159200	F:GGTTTCGTTTCGGGTTTGAC R:GATCTGCTTTCGCGATTG	Kim et al. 2011 ^[21]

1. 2. 6 qRT-PCR 将已合成的 cDNA 溶液稀释 6 倍作为 qRT-PCR 的初始浓度。qRT-PCR 在基因有限公司 EcoTM 荧光定量 PCR 仪上进行,操作参照 TaKaRa SYBR Premix Ex TaqTM II (Tli RNAaseH Plus)的试剂盒说明书进行。20 μL qRT-PCR 反应体系包含 10 μL 的 SYBR Premix Ex TaqTM 溶液, 8 μL 的 cDNA 溶液,0.38 μmol·L⁻¹的上游引物和下游引物。反应程序为:50℃ 2 min;95℃ 30 S;(95℃ 5 S,60℃ 30 S)×40 个循环;95℃ 15 S;55℃ 15 S; 95℃ 15 S。每个样品设置 2 个重复。

1. 3 数据分析

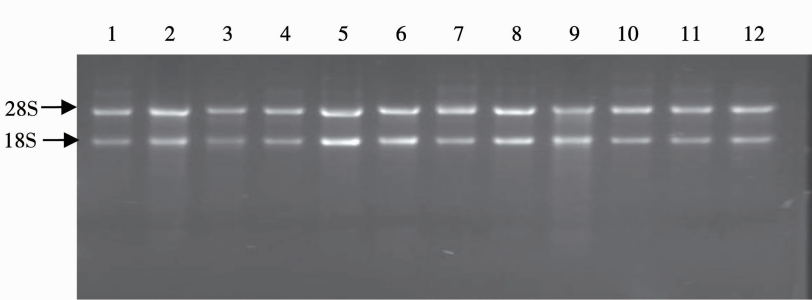
采用 Excel 2016 进行数据处理。采用 GeNorm、BestKeeper 和 Normfinder 对候选持家基因进行表达

稳定性评价。

2 结果与分析

2.1 RNA 质量及纯度检测

将提取的 12 份样品的 RNA 溶液进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,发现 28S rRNA 和 18S rRNA 谱带均清晰,RNA 完整性好(图 1);用 NanoDrop 2000 检测 RNA 的纯度和浓度表明,核酸最大吸收波长吸光值 A₂₆₀/蛋白和酚类物质最大吸收波长吸光值 A₂₈₀ 为 1.70 ~ 2.01,纯度较好,浓度变化范围为 55.0 ~ 99.7 ng·μL⁻¹。因此,提取的 RNA 可用于 cDNA 合成。



1 ~ 12 依次为:R_T_9,R_C_9,R_T_15,R_C_15,R_T_20,R_C_20;S_T_9,S_C_9,S_T_15,S_C_15,S_T_20,S_C_20;R:抗病品种;S:感病品种;T:接种虫卵处理;C:对照处理(接种自来水); 9:接种后第 9 d 取样;15:接种后第 15 d 取样;20:接种后第 20 d 取样。下同。
1-12 represent respectively R_T_9, R_C_9, R_T_15, R_C_15, R_T_20, R_C_20, S_T_9, S_C_9, S_T_15, S_C_15, S_T_20, S_C_20. R: Resistant accession; S: Susceptible accession; T: Inoculation with soybean cyst nematode; C: Inoculation with water; 9: Sampling at 9 days post-inoculation (DPI); 15: Sampling at 15 DPI; 20: Sampling at 20 DPI. The same below.

图 1 供试 RNA 样品的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RNA samples

2.2 引物的扩增效果和扩增特异性

利用合成的 24 个持家基因的引物,以稀释了 6 倍的 cDNA 为模板,进行了 qRT-PCR 检测 (图 2)。

除持家基因 *Actin* (Glyma. 08G182200) 出现了非特异扩增外,其它 23 个持家基因的 qRT-PCR 扩增效果均理想,扩增特异性高。

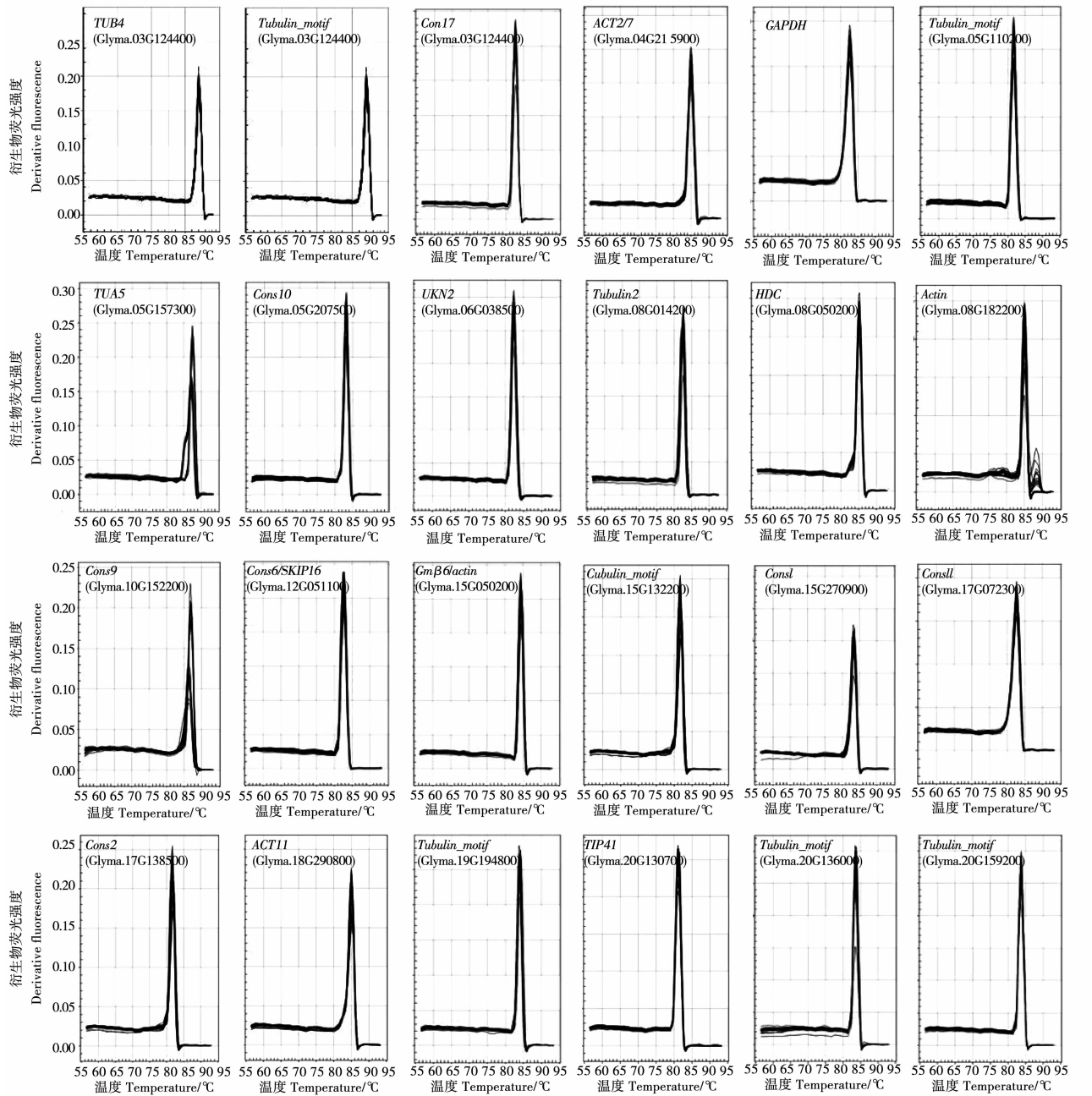


图 2 24 个候选持家基因的熔解曲线
Fig. 2 Derivative melt of 24 candidate housekeeping genes

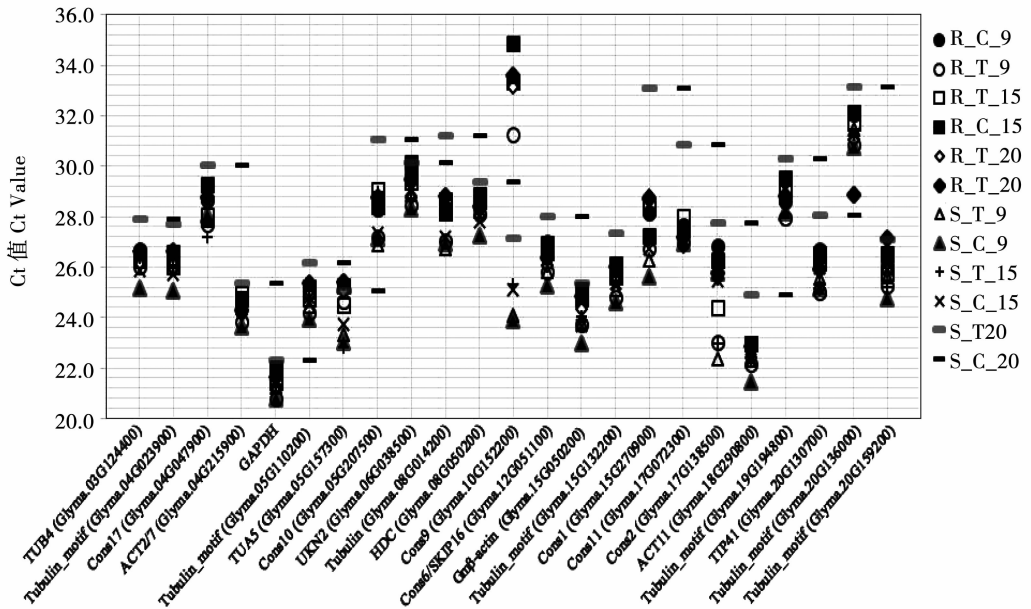
2.3 持家基因的表达丰度分析

利用 Ct 值评价持家基因的表达水平。Ct 值越高,其表达量越低,其表达丰度越低;反之,则表达丰度越高。Ct 值在样品间的变化反映了基因在样品间表达量的差异。对 23 个持家基因的表达丰度分析发现,持家基因间的表达丰度不尽相同(图 3)。本试验中 *GAPDH* 和 *ACT11* (Glyma. 18G290800) 表达丰度较

高,平均 Ct 值分别为 21.6 和 22.7;而 *Tubulin_motif* (Glyma. 20G136000) 和 *UKN2* (Glyma. 06G038500) 表达丰度较低,平均 Ct 值分别为 31.4 和 29.2;其它基因的表达丰度介于它们之间。持家基因在不同品种间或不同处理间也存在表达丰度的差异,而且不同持家基因表达丰度的差异程度也不尽相同。如在抗、感野生大豆间, *Cons9* (Glyma. 10G152200)

的 Ct 值相差最大,达 8.1, *TUA5* (Glyma. 05G157300) 相差 1.2,而 *Cons10*(Glyma. 05G207500)、*Cons6/SKIP16* (Glyma. 12G051100) 和 *Cons2*(Glyma17g14750) 相差值均为 0;在不同处理(接种虫卵和接种自来水)间, *Cons2*(Glyma. 17G138500) Ct 值相差最大,为 1.9,

Cons17(Glyma. 04G047900) 相差 0.7,而 *Tubulin_motif* (Glyma. 15G132200) 和 *Tubulin_motif*(Glyma. 19G194800) 相差值均为 0。可见,持家基因在不同野生大豆品种,不同处理(接种虫卵和接种自来水)条件下,其表达丰度表现不同,其稳定性是相对的。



R:抗病品种;S:感病品种;T:接种虫卵处理;C:对照处理(接种自来水);9:接种后第9天取样;15:接种后第15天取样;20:接种后第20天取样。
R:Resistant accession; S:Susceptible accession; T:Inoculation with soybean cyst nematode; C:Inoculation with water; 9:Sampling at 9 days post - inoculation (DPI); 15:Sampling at 15 DPI; 20:Sampling at 20 DPI.

图3 23个候选家基因的表达水平

Fig. 3 Expression level of 23 candidate housekeeping genes

2.4 持家基因的表达稳定性评价

为了明确大豆胞囊线虫侵染下23个持家基因在野生大豆根系的表达稳定性,本文借助 BestKeeper、GeNorm 和 Normfinder 软件分析了持家基因 Ct 值,并根据软件要求,将 Ct 值转换成相对表达量。

2.4.1 BestKeeper 评价持家基因的稳定性 BestKeeper 软件采用持家基因在不同品种、不同处理及不同取样时期 Ct 值的标准差和变异系数来评价基因表达的稳定性,标准差和变异系数均较小时,基因的表达稳定性较好,标准差和变异系数较大时,基因的表达稳定性较差。一般地,标准差大于1时,说明该基因的稳定性差。23个持家基因中,20个基因表达较稳定,其 Ct 值的标准差为 0.405 ~ 0.863,变异系数为 1.43% ~ 3.05%。表达最稳定的2个持家基因为 *HDC* (Glyma. 08G050200) 和 *Tubulin_motif* (Glyma. 19G194800),其 Ct 标准差分别为 0.405 和 0.440,变异系数分别为 1.43% 和 1.52%;而最不稳定的持家基因为 *Cons9*(Glyma. 10G152200)、*Cons2*(Glyma. 17G138500) 和 *Cons1* (Glyma. 15G270900),其 Ct 标准差均大于1,分别为 4.029、1.400 和 1.309,Ct 的

变异系数分别为 13.78%、5.53% 和 4.69%(表2)。

2.4.2 geNorm 评价持家基因的稳定性 geNorm 根据基因表达稳定性参数 M 值的大小来评价基因的稳定性。M 值越小,基因表达越稳定。本研究中表达最不稳定的3个持家基因为 *Cons9* (Glyma. 10G152200)、*Cons2* (Glyma. 17G138500) 和 *Cons1* (Glyma. 15G270900),其 M 值分别为 1.061、0.769 和 0.703。表达最稳定的2个为 *Tubulin_motif*(Glyma. 15G132200) 和 *Tubulin_motif*(Glyma. 05G110200),M 值为 0.223;其次为 *Cons6/SKIP16* (Glyma. 12G051100) (M 值为 0.240) (图4)。

使用多个内参基因进行校准可以获得更为准确的实时定量 PCR 数据。利用 geNorm 软件计算的标准化因子配对差异 ($V_{n/n+1}$) 可以来确定内参基因的数目。本试验条件下,同时选择2个持家基因作为内参基因,其标准化因子配对差异 $V_{2/3}$ 为 0.074,小于 0.15(图5),因此,同时选择持家基因 *Tubulin_motif* (Glyma. 15G132200) 和 *Tubulin_motif* (Glyma. 05G110200) 作为内参基因即可获得较为准确的实时定量 PCR 数据。

表 2 Bestkeeper 评价 23 个候选持家基因的稳定性

Table 2 Expression stability of 23 candidate housekeeping genes evaluated via Bestkeeper software

基因 Gene	基因位点 Gene locus	Ct 值 Ct value			标准偏差 Standard deviation	变异系数 CV/%
		平均值 Mean	最小值 Minimum	最大值 Maximum		
HDC	Glyma.08G050200	28.3	27.3	29.4	0.405	1.4
Tubulin_motif	Glyma.19G194800	28.9	27.9	30.3	0.440	1.5
ACT2/7	Glyma.04G215900	24.6	23.6	25.7	0.440	1.8
TUB4	Glyma.03G124400	26.4	25.2	27.9	0.487	1.8
Tubulin_motif	Glyma.05G110200	24.9	23.9	26.2	0.490	2.0
GAPDH	—	21.6	20.8	23.0	0.489	2.3
UKN2	Glyma.06G038500	29.2	28.3	30.1	0.515	1.8
Tubulin_motif	Glyma.15G132200	25.7	24.6	27.3	0.540	2.1
ACT11	Glyma.18G290800	22.7	21.4	24.9	0.540	2.4
Cons6/SKIP16	Glyma.12G051100	26.5	25.3	28.0	0.575	2.2
Tubulin_motif	Glyma.04G023900	26.4	25.0	28.0	0.579	2.2
Gmβ-actin	Glyma.15G050200	24.3	23.0	25.4	0.579	2.4
Tubulin_motif	Glyma.20G159200	26.0	24.7	27.1	0.612	2.4
Cons11	Glyma.17G072300	27.6	26.8	30.8	0.659	2.4
Cons17	Glyma.04G047900	28.6	27.2	30.0	0.665	2.3
TIP41	Glyma.20G130700	26.0	25.0	28.0	0.691	2.7
Tubulin_motif	Glyma.20G136000	31.4	28.9	33.2	0.779	2.5
TUA5	Glyma.05G157300	24.4	22.8	25.4	0.785	3.2
Cons10	Glyma.05G207500	28.4	26.9	31.1	0.838	3.0
Tubulin	Glyma.08G014200	28.2	26.7	31.2	0.863	3.1
Cons1	Glyma.15G270900	27.9	25.6	33.1	1.309	4.7
Cons2	Glyma.17G138500	25.2	22.4	27.7	1.399	5.5
Cons9	Glyma.10G152200	29.0	23.9	34.9	4.029	13.8

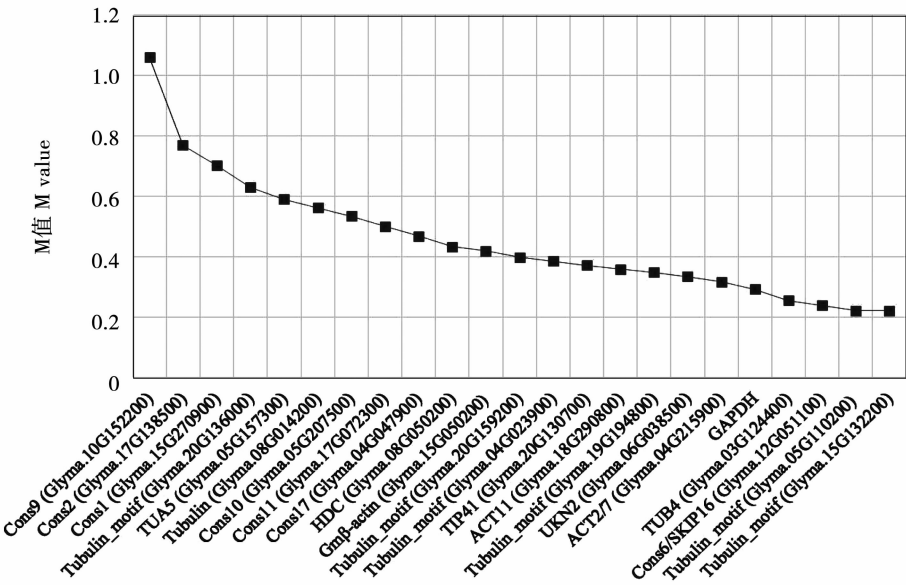


图 4 geNorm 评价 23 个候选持家基因的表达稳定性

Fig. 4 Expression stability of 23 candidate housekeeping genes evaluated via geNorm software

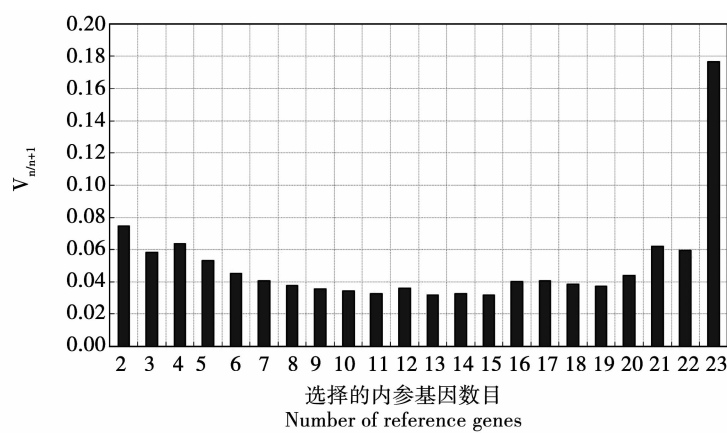


图 5 最佳内参基因数目的确定

Fig. 5 Determination of the optimal number of control genes for normalization

2. 4. 3 Normfinder 评价持家基因的稳定性 与 geNorm 相似,Normfinder 评价持家基因的稳定性需 要将基因的 Ct 值转化为相对表达量,然后根据基因 表达稳定指数 M 来评价基因的稳定性。M 值越小, 基因表达越稳定。本研究中表达最稳定的基因为 *Cons6/SKIP16*(Glyma. 12G051100) (M 值为 0. 050) , 其次为 *Tubulin_motif*(Glyma. 15G132200) (M 值为 0. 051) 和 *Tubulin_motif*(Glyma. 05G110200) (M 值 为 0. 064) 。表达最不稳定的持家基因为 *Tubulin_ motif*(Glyma. 20G136000) (M 值为 0. 315) 、*Cons2* (Glyma. 17G138500) (M 值为 0. 285) 和 *Cons9*(Gly- ma. 10G152200) (M 值为 0. 268) (表 3) 。

表 3 Normfinder 评价候选持家基因在供试样品的稳定性					
Table 3 Expression stability of 23 candidate housekeeping genes evaluated via Normfinder software					
基因 Gene	基因位点 Gene locus	M 值 M value	基因 Gene	基因位点 Gene locus	M 值 M value
<i>Cons6/SKIP16</i>	Glyma. 12G051100	0. 050	<i>Cons1</i>	Glyma. 15G270900	0. 134
<i>Tubulin_motif</i>	Glyma. 15G132200	0. 051	<i>Tubulin_motif</i>	Glyma. 19G194800	0. 136
<i>Tubulin_motif</i>	Glyma. 05G110200	0. 064	<i>TIP41</i>	Glyma. 20G130700	0. 154
<i>ACT11</i>	Glyma. 18G290800	0. 070	<i>Tubulin</i>	Glyma. 08G014200	0. 184
<i>UKN2</i>	Glyma. 06G038500	0. 077	<i>Cons10</i>	Glyma. 05G207500	0. 187
<i>TUB4</i>	Glyma. 03G124400	0. 099	<i>Cons11</i>	Glyma. 17G072300	0. 188
<i>Tubulin_motif</i>	Glyma. 20G159200	0. 101	<i>Cons17</i>	Glyma. 04G047900	0. 193
<i>Gmβ-actin</i>	Glyma. 15G050200	0. 103	<i>TUA5</i>	Glyma. 05G157300	0. 210
<i>GAPDH</i>	—	0. 105	<i>Cons9</i>	Glyma. 10G152200	0. 268
<i>Tubulin_motif</i>	Glyma. 04G023900	0. 120	<i>Cons2</i>	Glyma. 17G138500	0. 285
<i>ACT2/7</i>	Glyma. 04G215900	0. 125	<i>Tubulin_motif</i>	Glyma. 20G136000	0. 315
<i>HDC</i>	Glyma. 08G050200	0. 134			

3 结论与讨论

本文选用的候选持家基因主要是与细胞结构相关的肌动蛋白(*ACT11*, *Gmβ-actin*、*ACT2/7* 和 *Actin*)、微管蛋白(*Tubulin_motif*、*TUA5* 等)、ATP 结合元件(*Cons4*)及 F-box 蛋白(*Cons6/SKIP16*)等。尽管它们是组成性表达的持家基因,但是在大豆胞囊线虫侵染条件下,其在野生大豆根组织中的表达丰度及表达稳定性存在明显的差异。前人研究也表明,大豆不同组织、不同生长发育过程、不同环境等条件下持家基因的表达稳定性差异明显^[7-9, 13-14, 21]。可见,为获得可靠的实时定量 PCR 结果,有必要针对特定试验条件开展稳定表达内参基因的筛选。

本文选用了 3 个常用的分析内参基因稳定性软件 BestKeeper、NormFinder 和 geNorm,对 23 个大豆候选持家基因的表达稳定性进行评价。尽管这 3 个软件对候选持家基因的表达稳定性排序不一致,但其表达稳定性评价结果相关性高达 0.75 (BestKeeper 与 NormFinder)、0.86 (BestKeeper 与 geNorm)和 0.98 (NormFinder 与 geNorm)。综合考虑,23 个候选持家基因中,*Tubulin_motif* (Glyma. 20G136000)、*Cons1* (Glyma. 15G270900)、*Cons2* (Glyma. 17G138500)和 *Cons9* (Glyma. 10G152200)是表达稳定性最差的持家基因,而 *Cons6/SKIP16* (Glyma. 12G051100)、*Tubulin_motif* (Glyma. 15G132200)、*Tubulin_motif* (Glyma. 05G110200)、*TUB4* (Glyma. 03G124400)和 *UKN2* (Glyma. 06G038500)表达稳定性较好。本试验条件下,开展 qRT-PCR 研究时,可采用 *Cons6/SKIP16* (Glyma. 12G051100)、*Tubulin_motif* (Glyma. 15G132200)或 *Tubulin_motif* (Glyma. 05G110200)作为内参基因,或同时选择 *Tubulin_motif* (Glyma. 15G132200)和 *Tubulin_motif* (Glyma. 05G110200) 2 个持家基因作为内参基因组合。

参考文献

[1] 黄志熊,王飞娟,蒋晗,等. 两个水稻品种镉积累相关基因表达及其分子调控机制[J]. 作物学报, 2014, 40(4): 581-590. (Huang Z X, Wang Z X, Jiang H, et al. Comparison of cadmium-accumulation-associated genes expression and molecular regulation mechanism between two rice cultivars (*Oryza sativa* L. sub-species japonica) [J]. ACTA Agronomica Sinica, 2014, 40(4): 581-590.)

[2] 崔洪秋,冯乃杰,孙福东,等. DTA-6 对大豆花荚脱落纤维素

酶和 *GmAC* 基因表达的调控[J]. 作物学报, 2016, 42(1): 51-57. (Cui H Q, Feng N J, Sun F D, et al. Regulation of DTA-6 by abscission cellulase and *GmAC* gene expression in flowers and pods of soybean [J]. ACTA Agronomica Sinica, 2016, 42(1): 51-57.)

[3] 曹鑫,邓梅,张正丽,等. 小麦分蘖角度 *TaTAC1* 基因同源克隆及表达分析. 植物遗传资源学报[J], 2017, 18: 125-132. (Cao X, Deng M, Zhang Z L, et al. Molecular characterization and expression analysis of *TaTAC1* gene in *Triticum aestivum* L [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18: 125-132.)

[4] 史庆玲,董永彬,周强,等. 玉米转录因子 *ZmERF1* 的克隆及表达分析[J]. 生物技术进展. 2017, 7, 38-42. (Shi Q L, Dong Y B, Zhou Q, et al. Cloning and expression analysis of *ZmERF1* in maize [J]. Current Biotechnology, 2017, 7: 38-42.)

[5] 王艳,武林,孙梦阳,等. 不同生育时期大豆异黄酮合成相关酶基因表达的分析[J]. 大豆科学, 2012, 31: 887-893. (Wang Y, Wu L, Sun M Y, et al. Analysis of gene expression underlying soybean isoflavone synthesis relative enzymes at different growth stages [J]. Soybean Science, 2012, 31: 887-893.)

[6] 李媛媛,南海洋,刘宝辉,等. 大豆 *GmFDL06* 基因抗干旱及耐盐性研究[J]. 大豆科学, 2017, 36(3): 351-359. (Li Y Y, Nan H Y, Liu B H, et al. Study on drought resistance and salt tolerance of soybean gene *GmFDL06* [J]. Soybean Science, 2017, 36(3): 351-359.)

[7] 王骁. 基于实时荧光定量 PCR 的大豆内参基因筛选[D]. 太谷: 山西农业大学, 2016: 27-44. (Wang X. Selection of candidate reference genes for gene expression studies [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2016: 27-44.)

[8] 陈玉连,张涛,董登峰. 低磷胁迫大豆 qRT-PCR 内参基因的筛选及谷胱丙肽合成代谢酶的表达[J]. 广西植物. 2016, DOI:10.11931/guihai.gxzw201609013. (Chen Y L, Zhang T, Dong D F. Selection of reference genes for qRT-PCR and expression of genes involved in homogluthathione anabolism in soybean under stress of phosphorus deficiency [J]. GuiHaia, 2016, DOI: 10.11931/guihai.gxzw201609013.)

[9] Ma S, Niu H, Liu C, et al. Expression stabilities of candidate reference genes for RT-qPCR under different stress conditions in soybean [J]. Plos One, 2013, 8: e75271.

[10] 刘伟灿,王骐,周永刚,等. 大豆干旱胁迫下 miRNA 与 mRNA 荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(2): 61-67. (Liu W C, Wang Q, Zhou Y G, et al. Selection of reference genes for quantitative polymerase chain reaction of miRNA and mRNA in soybean under drought stress [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2016, 44(2): 61-67.)

[11] Marcolinogomes, J, Rodrigues, F A, Fugantipagliarini, R, et al. Transcriptome-wide identification of reference genes for expression analysis of soybean responses to drought stress along the day [J]. Plos One, 2015, 10(9): e0139051.

[12] Hu R, Fan C, Li H, et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR[J]. BMC Molecular Biology,2009, 10: 93.

[13] 侯高杰. 铝胁迫下大豆内参基因的筛选及相关基因表达分析[D]. 南宁: 广西大学, 2015: 21-32. (Hou G J. Selection of reference genes and analysis some related gene expression in soybean under aluminum toxicity[D]. 2015:21-32.)

[14] 曾文韬, 柴春月, 窦道龙. 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[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(5): 787-95. (Zeng W T, Zhai C Y, Dou D L. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis in soybean[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2015, 38(5): 787-95.)

[15] Costa J H, Saraiva K D C, Morais V D, et al. Reference gene identification for real-time PCR analyses in soybean leaves under fungus (*Cercospora kikuchii*) infection and treatments with salicylic and jasmonic acids[J]. Australasian Plant Pathology, 2016, 45: 191-199.

[16] Miranda V D J, Coelho R R, Viana A A B, et al. Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack[J]. BMC Research Notes, 2013, 6: 196.

[17] 宋美静, 朱晓峰, 王东, 等. 我国大豆主产区大豆胞囊线虫群体分布及致病性分化研究[J]. 大豆科学, 2016, 35(4): 630-636. (Song M J, Zhu X F, Wang D, et al. Population distribution and pathogenicity differentiation of soybean cyst nematode in main soybean production areas of china[J]. Soybean Sciences, 2016, 35(4): 630-636.)

[18] 刘鹤. 大豆抗胞囊线虫组织病理学及相关基因表达研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016:40-50 (Liu H. Study on histopathology and related genes of soybean resistant to *Heterodera glycines*[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016: 40-50.)

[19] 赵思阳, 王媛媛, 朱晓峰, 等. 大豆与胞囊线虫互作中 *GmPRs* 的表达研究[J]. 中国油料作物学报. 2017,39(2): 213-220. (Zhao S Y, Wang Y Y, Zhu X Y, et al. Expression of pathogenesis-related proteins (*GmPRs*) in interactions between soybean and soybean cyst nematode[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2017,39(2): 213-220.)

[20] Niblack T, Tylka G L, Arelli P, et al. A standard greenhouse method for assessing soybean cyst nematode resistance in soybean: SCE08 (standardized cyst evaluation 2008) [J]. Plant Health Progress, 2009, 10. doi:10.1094/PHP-2009-0513-01-RV.

[21] Kim H K, Kang Y J, Kim D H, et al. RNA-Seq analysis of a soybean near-isogenic line carrying bacterial leaf pustule-resistant and -susceptible alleles[J]. DNA Research. 2011, 18, 483-497.

[22] Libault M, Thibivilliers S, Bilgin D D, et al. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization[J]. The plant genome, 2008, 1(1): 44-54.

[23] Jian B, Liu B, Bi Y, et al. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR [J]. BMC Molecular Biology,2008, 9, 1-14.

[24] Sun X, Sun M, Jia B, et al. A *Glycine soja* methionine sulfoxide reductase B5a interacts with the Ca²⁺ +/CAM-binding kinase *GsCBRLK* and activates ROS signaling under carbonate alkaline stress[J]. Plant Journal, 2016, 86: 514-529.

[25] Stolf-Moreira R, Gertrudes de Macedo Lemos E, Vilela-Abdelnoor R, et al. Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean[J]. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2011, 46: 58-65.