

DOI:10.12403/j.1001-1498.20230291

文冠果种子发育基因表达分析内参基因的选择

李麟坤¹, 梁重钧¹, 宁楚龙², 张 薇¹, 姜国维²,
张 鑫², 王利兵^{1,2*}

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 2. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712199)

摘要: [目的] 验证 *ACT* 基因是否适用于文冠果种子发育的相关基因表达分析, 并筛选出在文冠果基因表达分析中最稳定的内参基因。[方法] 本研究采用了 4 种数学算法 (ΔC_T 、BestKeeper、NormFinder、geNorm) 评估 12 个候选内参基因的表达稳定性, 并利用在线工具 RefFinder 综合评价。[结果] 在文冠果不同发育时期种子内参基因综合评分排名为 *PP2A* > *Tip41* > *EF-1 α* > *18r* > *UCE* > *β -TUB* > *UBQ* > *α -TUB* > *CYP* > *SAM* > *ACT* > *GADPH*; 在文冠果不同组织内参基因综合评分排名为 *PP2A* > *Tip41* > *CYP* > *18r* > *UBQ* > *SAM* > *EF-1 α* > *UCE* > *GADPH* > *α -TUB* > *ACT* > *β -TUB*。[结论] *PP2A* 和 *Tip41* 基因是文冠果基因表达分析最稳定的内参基因。

关键词: 文冠果; 内参基因; 基因表达; 种子发育

中图分类号: S727.32

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2024)03-0079-07

文冠果 (*Xanthoceras sorbifolium* Bunge), 又名黄角 (Yellow horn), 落叶灌木或小乔木, 是无患子科文冠果属的唯一植物, 广泛种植于我国三北地区, 抗性强, 尤其抗旱, 是我国特有的观赏、药用及油用的高收入木本经济树种^[1]。文冠果种子富含油脂, 种仁含油率达 60% 以上, 不饱和脂肪酸组成高达 92%, 富含油酸 (约 30%)、亚油酸 (约 45%) 以及在植物中极为罕见的神经酸 (约 3%)^[2], 是生产高品质生物柴油和健康食用油的原料, 具有优秀的经济价值。由此可见, 研究文冠果种子不饱和脂肪酸的合成机制, 对培育优质高产的文冠果品种具有现实意义。截止至今, 已有文冠果种子发育转录组的文献分析出一些重要的不饱和脂肪酸合成相关候选关键基因^[3-4], 探究这些基因在文冠果各组织, 尤其不同发育时期种子中的表达模式, 尤为关键。

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 是大多数科学家常用的检测基因表达丰度的可靠技术, 具有高

灵敏性、特异性、精确性^[5], 而一个可靠的内参基因 (RGs) 是前提。内参基因一般选择在植物中稳定表达的管家基因, 常见的管家基因有 *actin* (*ACT*)、糖醛酸-3-磷酸脱氢酶基因 (*GADPH*)、延长因子 1 α (*EF-1 α*)、泛素酶基因 (*UBQ*)、泛素结合酶基因 (*UCE*) 以及 18S 核糖体 RNA (*18S*), 然而这些基因的表达在不同物种的不同组织和其不同发育时期中的稳定性有较大差异, 需要深入研究^[6-7]。

大量关于文冠果基因表达的研究均采用 *actin* 作为内参基因^[4,8-13], 王旭等通过对 7 个内参基因稳定性研究, 发现 *UBQ* 和 *eIF-4 α* 为适用于性别分别相关基因的最优内参基因^[14]。然而, 近年来神经酸的营养价值和药用价值被逐渐挖掘, 其种子油脂合成与代谢相关基因的研究亟待深入, 需要进一步研究文冠果种子不同发育时期的最适内参基因需要被进一步研究, 以便提高其油脂合成与代谢相关基因表达检测的准确性。基于此, 本研究首先

收稿日期: 2023-07-24 修回日期: 2024-02-21

基金项目: 国家自然科学基金 (31870594) 和西北农林科技大学高层次人才科研经费

* 通讯作者: 王利兵, 研究员, 主要研究方向: 木本油料种质创新。E-mail: wlibing@caf.ac.cn

以 SapBase 数据库中中文冠果各组织转录组数据 (<http://www.sapindaceae.com/>) 中常见内参基因的基因表达量数据作为依据^[15], 挑选 12 个在各组织表达量较稳定的候选内参基因; 采用 qRT-PCR 法测试这 12 个候选内参基因在文冠果种子不同发育时期和不同组织中的表达水平 C_q 值; 利用 4 种常见的评估内参基因的表达稳定性的数学算法评价这 12 个候选内参基因在文冠果不同组织和种子发育不同时期中的稳定性, 随即利用在线工具 RefFinder 对这 12 个候选内参基因进行综合排名选出最佳内参基因。最后, 以超长链脂肪酸合成关键酶 3-酮酯酰-CoA 合酶 (*KCS*) 基因验证选择的最佳内参基因的稳定性, 本研究旨在选择稳定、可靠的文冠果内参基因。

1 材料与方法

1.1 植物材料

文冠果成熟实生苗 (五年生以上) 生长于内蒙古通辽市开鲁县 ($43^{\circ}32' N$, $120^{\circ}30' E$), 林间正常管理。文冠果根、茎、叶、花采集于 5 月 10 日, 种皮采集于 6 月 7 日, 不同发育时期种子胚乳分别采集于 6 月 18 日 (谢花后第 30 d, 30 DAP), 6 月 26 日 (38 DAP), 7 月 3 日 (45 DAP), 7 月 11 日 (53 DAP), 7 月 21 日 (63 DAP), 采集年份均为 2022 年, 5 个不同发育时期种子胚乳形态特征见图 1。每种文冠果组织采集生物学重复样品 3 份。



图 1 文冠果种子不同发育时期胚乳形态

Fig. 1 Seed endosperm morphology at different developmental stages (30 DAP~63 DAP)

1.2 RNA 提取和 cDNA 链合成

文冠果各植物组织的提取方法参照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (天根, 中国) 说明书, 经过降解酶 RQ1 RNase-Free DNase (Promega, 美国) 降解残留的基因组 DNA 后, 以 1 μg RNA 为模板, 利用 GoScript™ Reverse Transcription

System (Promega, 美国) 试剂盒反转录得到 cDNA, 稀释 10 倍后冻于 $-20^{\circ}C$ 待用

1.3 候选内参基因选择和荧光定量引物设计

参照 SapBase 数据库 (<http://www.sapindaceae.com/>) 中文冠果各组织转录组数据 (SRA 编号: SRP304628), 选择在各组织表达量较稳定的 12 个内参基因作为候选, 同时以超长链脂肪酸合成关键酶 3-酮酯酰-CoA 合酶 (*KCS*) 基因作为验证基因, 基因编号均来源于 SapBase 数据库^[15]。荧光定量 PCR (qRT-PCR) 引物由软件 Primer Premier 5.0 设计, 引物信息列于表 1。扩增序列均测序检验其正确性。

1.4 荧光定量 PCR 程序 and 数据分析

qRT-PCR 由 ABI StepOne7000 (美国) 实时荧光定量 PCR 仪完成, 反应体系为 30.0 μL , 包括 SYBR qPCR SuperMix 15.0 μL , 上游引物 (10.0 $\mu mol \cdot L^{-1}$) 1.0 μL , 下游引物 (10.0 $\mu mol \cdot L^{-1}$) 1.0 μL , ROX 0.5 μL , ddH₂O 12.5 μL 。反应采用三步法, 反应程序为: $95^{\circ}C$ 2 min, 1 个循环; $95^{\circ}C$ 10 s, $60^{\circ}C$ 20 s, $72^{\circ}C$ 20 s, 40 个循环; $72^{\circ}C$ 20 s, 1 个循环。熔解曲线在 $65 \sim 95^{\circ}C$ 间获得以验证引物的特异性。引物的扩增效率和线性相关系数由 cDNA 按 5 个稀释倍数 (1 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4}) 建立标准曲线计算得到。

4 种常见的评估内参基因的表达稳定性的数学算法 ΔC_T ^[16]、Best-Keeper^[17]、geNorm^[18] 及 NormFinder^[19] 用于评价 12 个候选内参基因在文冠果种子不同发育时期和不同组织的稳定性。最后利用在线工具 RefFinder (<http://150.216.56.64/referencegene>) 综合排名。

2 结果与分析

2.1 扩增效率和引物特异性分析

所有样品 RNA 均利用 Agilent 2100 Bioanalyzer 生物分析仪测试 RNA 浓度和完整性, 样本 RNA 浓度分布于 $128.5 \sim 433.9 ng \cdot \mu L^{-1}$, RIN 值均大于 7.0, 琼脂糖电泳检测均显示有明显的 28S 和 18S 条带, RNA 质量达到后续实验要求。12 个候选内参基因的基因名称、SapBase 编号、引物序列、扩增长度、扩增效率、相关系数及 C_q 平均值均列于表 1。扩增片段长度在 107 bp (*GADPH*) $\sim$ 256 bp (*UCE*), 扩增效率在 98.23% (*GADPH*) $\sim$ 101.35% (β -TUB)。12 个

表 1 12 个候选内参基因引物和扩增效率

Table 1 12 candidate reference gene primers and amplification efficiency

基因/基因编号 Gene/Gene number	基因名称 Gene name	引物序列（5'-3'）正向/反向 Primer sequences (5'-3') forward/reverse	扩增长度 Amplification length/bp	扩增效率 Amplification efficiency/%	线性相关系数 R^2 Correlation coefficient R^2	平均值 C_q Average C_q value
ACT/EVM0004930	肌动蛋白	TACCGAGGCACCATTAATCCC/ AAGGTCCAACGAAGAATAGCA	226	99.23	0.997	21.51
UBQ/EVM0019311	泛素蛋白	TTCCGTCTTGCTCTCTACACTTC/ GTTTCTGCTTATTGACATCTTTATCC	176	98.75	0.995	24.59
UCE/EVM0006084	泛素结合酶	AATGGGGCTTCAGGAACCTCTCTAT/ TATCTTCAGGGCGTTGCTTCACAG	256	101.14	0.993	24.33
18r/EVM0012402	18S核糖体RNA	CAGGCACTACAGTCCTCACAAAA/ GTCACCTCCACCATCCATATCCA	117	99.46	0.998	26.68
GADPH/EVM0014701	糖醛酸-3-磷酸脱氢酶	GCAACCTATGAGGACATCAAAGC/ CCAACGAAATCGGTAGAAACAAAC	107	98.23	0.992	21.59
EF-1 α /EVM0013711	延伸因子	GTGCTATGTCACCCCGATTTCCT/ TTTTACCATTGTGCGAGCCTCCT	142	98.88	0.995	24.38
α -TUB/EVM0000325	α 微管蛋白	CAATCTCAACCGCCTTGCTCTCT/ AGCTGCTCATGGTATGCCTTCTC	183	100.72	0.996	22.94
β -TUB/EVM0013594	β 微管蛋白	GGGGCAAAATGAGCACTAAAGAA/ CCAGTCGGAGGGATATCACAGAC	127	101.35	0.994	23.67
PP2A/EVM0018196	蛋白质磷酸酯酶	TCTTTGACTTCACTGATCCGACA/ TGGACACCATCTTTACCATTTCTT	144	99.46	0.998	27.39
Tip41/EVM0004487	Tip41蛋白	AAGATGAATTGGCTGATAACGGA/ AGCTCTCACGAAGAATGACTGGG	183	98.58	0.994	25.53
SAM/EVM0014230	甲硫氨酸腺苷转移酶	TGAGGTGAGAAAGAACAAGACGT/ TGCTGGGTTGAAATGAGAACAGTG	132	99.73	0.998	25.34
CYP/EVM0006460	亲环蛋白	GAAAGGTGGAGAACAATGATAGAT/ TTGAAAGCACAAACAGGAGAGT	152	101.12	0.993	27.15
KCS/EVM0000575	3-酮酯酰-CoA合酶	TCCAAAGGGAGGATGACAACA/ CTCGGACATGGGAAGGACTAG	125	99.32	0.997	25.96

候选内参基因溶解曲线均为单一峰（图 2），表明无引物二聚体和非特异性扩增发生。

2.2 候选内参基因表达谱

qRT-PCR 法得到 12 个候选内参基因在文冠果不同组织和不同种子发育时期中的表达水平 C_q 值， C_q 值越小，基因表达量越高。这些内参基因 C_q 值在文冠果各个组织有较大差异。这所有检测的组织中，PP2A 平均 C_q 值最高 27.39，分布于 25.47~28.69；ACT 平均 C_q 值最低 21.51，分布 18.69~23.65（表 1，图 3）。这 12 个候选内参基因的变异系数分别为 7.18%（ACT）、3.01%（UBQ）、4.54%（UCE）、3.24%（18r）、6.64%（GADPH）、4.56%（EF-1 α ）、8.84%（ β -TUB）、10.68%（ α -TUB）、4.13%（PP2A）、3.87%（Tip41）、9.60%（SAM）、3.11%（CYP）。

2.3 候选内参基因稳定性评价

常见的内参基因稳定性算法有 ΔC_T 、BestKeeper、NormFinder 以及 GeNorm。这 4 种算法中， ΔC_T 法是根据 C_q 值的标准差数值来评价，标准差数值越低的内参基因，稳定性越强；BestKeeper 算法是根据 C_q 值的变异系数和标准差数值联合评价，变异系数和标准差数值越低，内参

基因的稳定性越强；NormFinder 和 GeNorm 算法均根据平均表达稳定指数计算，表达稳定指数与内参基因的稳定性呈负相关。

上述 4 种内参基因稳定性算法用于评价 12 个候选内参基因在文冠果种子不同发育时期和不同组织中的稳定性。如表 2 所示，根据 ΔC_T 和 BestKeeper 算法分析，PP2A 和 Tip41 在文冠果种子不同发育时期和不同组织中稳定性均为最优，NormFinder 和 GeNorm 算法分析的最优结果与 ΔC_T 和 BestKeeper 算法不同，但 PP2A 和 Tip41 均在排名前四的行列。在文冠果种子不同发育时期中，所有算法均显示 ACT 和 GADPH 为最不稳定的内参基因；在不同组织中，所有算法均显示 ACT 和 β -TUB 为最不稳定的内参基因。

在线工具 RefFinder 根据 4 种数学算法的排名综合评价这 12 个候选内参的稳定性。结果如表 2 所示，在文冠果不同发育时期种子内参基因综合评分排名为 PP2A > Tip41 > EF-1 α > 18r > UCE > β -TUB > UBQ > α -TUB > CYP > SAM > ACT > GADPH；在文冠果不同组织内参基因综合评分排名为 PP2A > Tip41 > CYP > 18r > UBQ > SAM >

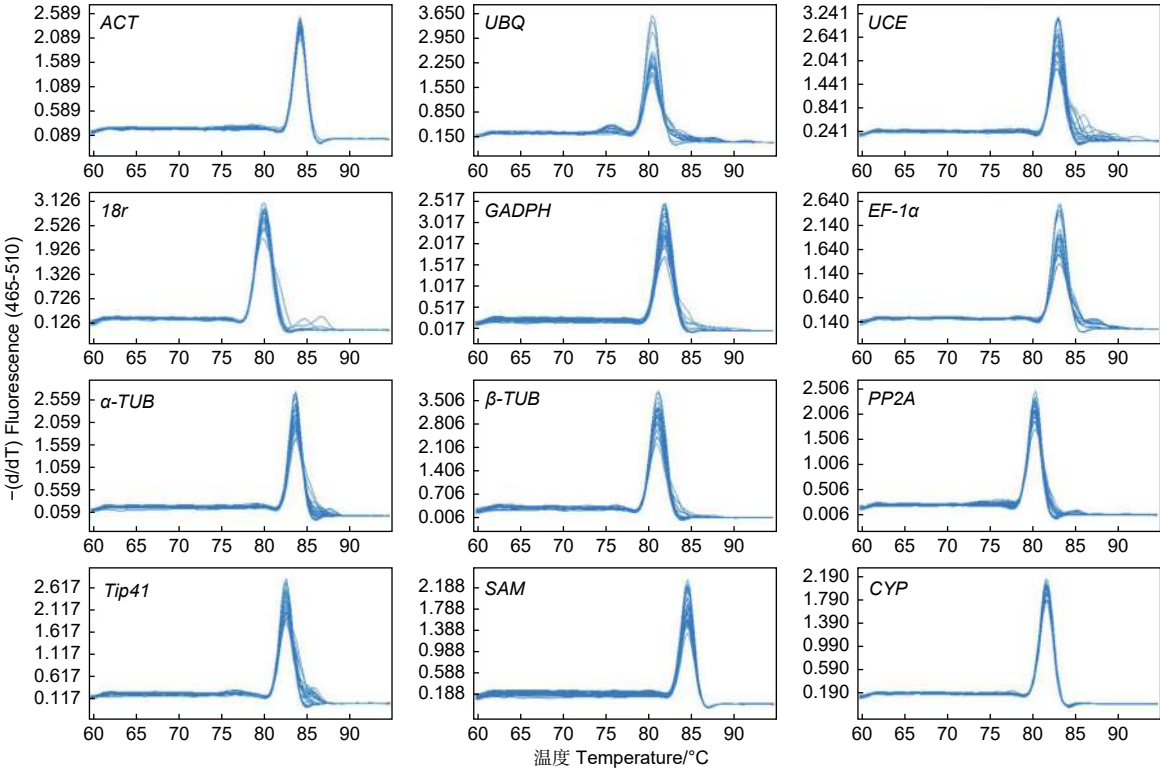


图 2 12 个候选内参基因熔解曲线

Fig. 2 Melting curves with a single peak for the 12 candidate reference genes

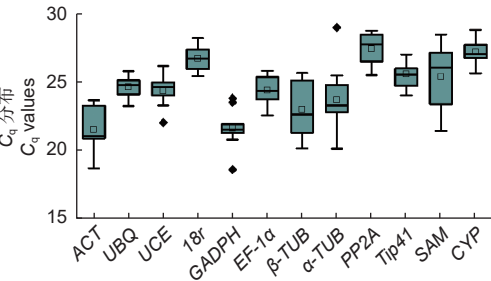


图 3 12 个候选内参基因 C_q 值分布

Fig. 3 The quantification cycle (C_q) values of the 12 candidate reference genes

EF-1α > *UCE* > *GADPH* > *α-TUB* > *ACT* > *β-TUB*. *PP2A* 和 *Tip41* 在文冠果不同发育时期种子和不同组织中的排名均为最高，表明为最合适的内参基因。

2.4 验证挑选的内参基因

为了评估上述选择的最优内参基因的稳定性，本研究以选择的最优内参基因 *PP2A* 和 *Tip41* 及文献中最常用的 *ACT* 作为后续验证实验的内参基因，利用 qRT-PCR 法计算种子高表达目标基因 *KCS* 在文冠果种子不同发育时期和不同组织中的表达水平。结果如图 4 所示，以 *PP2A* 和 *Tip41*

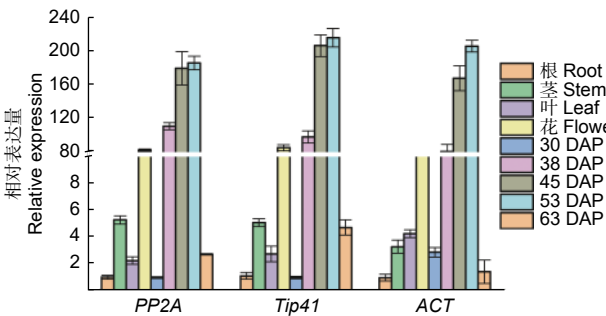


图 4 *KCS* 基因在不同内参基因下的组织特异性表达分析
Fig. 4 Relative expression of the *KCS* gene in diverse tissue samples using selected reference genes

作为内参基因达到大致相同的 *KCS* 表达模式 (图 4A、B)。 *KCS* 主要在种子发育期 38~53 DAP 高表达。在除了种子外的其他组织中，在种皮中几乎不表达，不参与计算，在花中高表达，然而，当采用 *ACT* 作为内参基因时，其表达模式有所不同 (图 4C)。在以 *PP2A* 和 *Tip41* 作为内参基因时， *KCS* 基因在种子发育 30 DAP 的表达最低，作为标准值“1”，在茎的表达量高于叶片；而以 *ACT* 作为内参基因在根中的表达量最低，且在叶片中的表达量高于茎。在不同发育时期种子中，

表 2 候选内参基因在文冠果种子不同发育时期和不同组织的稳定性评价

Table 2 Stability ranking of candidate reference genes in seeds at different developmental stages and across diverse tissue samples

方法 Method	稳定性排名（高-低） Ranking order（high-low）											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
不同发育时期种子 Seeds at different stages												
ΔC_T	<i>Tip41</i>	<i>PP2A</i>	<i>UCE</i>	<i>EF-1α</i>	<i>UBQ</i>	<i>18r</i>	<i>β-TUB</i>	<i>CYP</i>	<i>α-TUB</i>	<i>SAM</i>	<i>ACT</i>	<i>GADPH</i>
BestKeeper	<i>Tip41</i>	<i>PP2A</i>	<i>UBQ</i>	<i>EF-1α</i>	<i>18r</i>	<i>UCE</i>	<i>β-TUB</i>	<i>CYP</i>	<i>SAM</i>	<i>α-TUB</i>	<i>ACT</i>	<i>GADPH</i>
NormFinder	<i>β-TUB</i>	<i>UCE</i>	<i>Tip41</i>	<i>PP2A</i>	<i>α-TUB</i>	<i>EF-1α</i>	<i>UBQ</i>	<i>18r</i>	<i>CYP</i>	<i>SAM</i>	<i>ACT</i>	<i>GADPH</i>
GeNorm	<i>EF-1α/PP2A</i>		<i>Tip41</i>	<i>18r</i>	<i>UBQ</i>	<i>UCE</i>	<i>β-TUB</i>	<i>CYP</i>	<i>SAM</i>	<i>α-TUB</i>	<i>ACT</i>	<i>GADPH</i>
RefFinder	<i>PP2A</i>	<i>Tip41</i>	<i>EF-1α</i>	<i>18r</i>	<i>UCE</i>	<i>β-TUB</i>	<i>UBQ</i>	<i>α-TUB</i>	<i>CYP</i>	<i>SAM</i>	<i>ACT</i>	<i>GADPH</i>
不同组织 All tissues												
ΔC_t	<i>Tip41</i>	<i>PP2A</i>	<i>18r</i>	<i>CYP</i>	<i>UBQ</i>	<i>EF-1α</i>	<i>SAM</i>	<i>UCE</i>	<i>GADPH</i>	<i>α-TUB</i>	<i>ACT</i>	<i>β-TUB</i>
BestKeeper	<i>Tip41</i>	<i>PP2A</i>	<i>18r</i>	<i>Tip41</i>	<i>UBQ</i>	<i>EF-1α</i>	<i>UCE</i>	<i>SAM</i>	<i>GADPH</i>	<i>α-TUB</i>	<i>ACT</i>	<i>β-TUB</i>
NormFinder	<i>Tip41</i>	<i>SAM</i>	<i>PP2A</i>	<i>18r</i>	<i>CYP</i>	<i>UBQ</i>	<i>EF-1α</i>	<i>GADPH</i>	<i>UCE</i>	<i>α-TUB</i>	<i>ACT</i>	<i>β-TUB</i>
GeNorm	<i>PP2A/CYP</i>		<i>Tip41</i>	<i>18r</i>	<i>UBQ</i>	<i>EF-1α</i>	<i>UCE</i>	<i>SAM</i>	<i>GADPH</i>	<i>α-TUB</i>	<i>ACT</i>	<i>β-TUB</i>
RefFinder	<i>PP2A</i>	<i>Tip41</i>	<i>CYP</i>	<i>18r</i>	<i>UBQ</i>	<i>SAM</i>	<i>EF-1α</i>	<i>UCE</i>	<i>GADPH</i>	<i>α-TUB</i>	<i>ACT</i>	<i>β-TUB</i>

KCS 基因以 *PP2A* 和 *Tip41* 作为内参基因计算时，种子发育 63 DAP 的表达量高于 30 DAP，而以 *ACT* 作为内参基因时相反。上述结果表明，以不同稳定性的内参基因计算得到的组织特异性表达分析结果有所不同。由此可见，选择可靠稳定的内参基因对 qRT-PCR 实验的准确度非常重要。

3 讨论

实时荧光定量（qRT-PCR）技术因其具有高灵敏性、特异性、精确性等特点，是分析基因表达水平和核酸含量的应用最为广泛的技术之一。不同物种之间没有固定的内参基因，例如常用的内参基因 *ACT*、*GADPH*、*UBQ* 等在不同植物物种的不同组织的不同发育时期可表现出表达差异^[20]。由此可见，为特定植物的特定组织发育的 qRT-PCR 实验选择可靠的内参基因极为必要。

文冠果油是在植物种油中极为罕见的含有神经酸的木本油料来源，大量文献均以内参基因 *ACT* 作为文冠果基因表达分析的唯一内参基因^[4,8-13]，其稳定性是否适宜文冠果种子发育中相关基因的表达分析未有确定。本研究选择了 12 个常见且表达较为稳定的候选内参基因，利用 4 种数学算法（ ΔC_T 、BestKeeper、NormFinder、geNorm）评估它们在文冠果种子发育过程中和不同组织中的稳定性，同时采用网络在线工具 RefFinder 综合这

4 种算法的结果并排名。

PP2A 和 *Tip41* 在文冠果不同发育时期种子和不同组织中的排名均为最高，为本研究的最适内参基因，而 *UBQ* 和 *Tip41* 是油用牡丹（*Paeonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang）种子发育过程中的最适内参基因，*PP2A* 排名中游^[6]；*UBCE2* 是草果（*Amomum tsaoko* Crevost et Lemarie）种子发育的最适内参基因^[21]；*UCE*、*RPS13* 和 *RPII* 是美藤果（*Plukenetia volubilis* L.）种子发育最适内参基因^[22]。以上结果表明不同物种不同发育组织最适内参基因大部分均不相同，值得研究。最为关键的是本研究结论中的最适内参基因与前期大部分研究报道所使用的并不一致，前期大量研究均采用 *ACT* 基因作为文冠果基因表达分析的内参基因^[4,8-13]，而本研究结果表明 *ACT* 基因在文冠果种子不同发育时期和不同组织中内参稳定性排名较差，并不适合用于基因表达的研究，同时王旭等研究也表明 *ACT* 基因不是研究文冠果性别分化和不同组织的最适内参基因，且排名同样靠后^[14]。据此，本研究最重要的意义是更正用于文冠果基因表达分析的内参基因，以期获得更准确的基因表达数据。

4 结论

本研究通过 4 种数学算法（ ΔC_T 、BestKeeper、

NormFinder、geNorm)对文冠果 12 个候选内参基因稳定性和有效性的评估,发现 *PP2A* 和 *Tip41* 基因在文冠果种子不同发育时期和不同组织中稳定表达,是文冠果基因表达分析最稳定的内参基因。本研究为文冠果 qRT-PCR 数据标准化提供了有效依据。

参考文献:

- [1] CHEN X Q, LEI Z L, CAO J, *et al.* Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and current uses of underutilized *Xanthoceras sorbifolium* bunge: A review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 283: 114747.
- [2] MA Y X, BI Q X, LI G T, *et al.* Provenance variations in kernel oil content, fatty acid profile and biodiesel properties of *Xanthoceras sorbifolium* Bunge in northern China[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 151: 112487.
- [3] LIANG Q, LIU J N, FANG H C, *et al.* Genomic and transcriptomic analyses provide insights into valuable fatty acid biosynthesis and environmental adaptation of yellowhorn[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 991197.
- [4] WANG L, RUAN C J, LIU L Y, *et al.* Comparative RNA-seq analysis of high- and low-oil yellow horn during embryonic development[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(10): 3071.
- [5] BUSTIN S A, BENES V, NOLAN T, *et al.* Quantitative real-time RT-PCR – a perspective[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2005, 34(3): 597-601.
- [6] LI C Q, HU L Z, WANG X Q, *et al.* Selection of reliable reference genes for gene expression analysis in seeds at different developmental stages and across various tissues in *Paeonia ostii*[J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46(6): 6003-6011.
- [7] HU Y, CHEN H, LUO C, *et al.* Selection of reference genes for real-time quantitative PCR studies of kumquat in various tissues and under abiotic stress[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 174: 207-216.
- [8] GUO H H, LI Q Q, WANG T T, *et al.* *XsFAD2* gene encodes the enzyme responsible for the high linoleic acid content in oil accumulated in *Xanthoceras sorbifolia* seeds[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(3): 482-488.
- [9] ZHAO N, ZHANG Y, LI Q Q, *et al.* Identification and expression of a stearyl-ACP desaturase gene responsible for oleic acid accumulation in *Xanthoceras sorbifolia* seeds[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2015, 87: 9-16.
- [10] GUO Y X, SONG H F, ZHAO Y Y, *et al.* Switch from symplasmic to apoplasmic phloem unloading in *Xanthoceras sorbifolia* fruit and sucrose influx *XsSWEET10* as a key candidate for sugar transport[J]. Plant Science, 2021, 313: 111089.
- [11] ZHAO Y, LIU X J, WANG M K, *et al.* Transcriptome and physiological analyses provide insights into the leaf epicuticular wax accumulation mechanism in yellowhorn[J]. Horticulture Research, 2021, 8(1): 134.
- [12] GUO H H, WANG T T, LI Q Q, *et al.* Two novel diacylglycerol acyltransferase genes from *Xanthoceras sorbifolia* are responsible for its seed oil content[J]. Gene, 2013, 527(1): 266-274.
- [13] WANG L, RUAN C J, BAO A M, *et al.* Small RNA profiling for identification of microRNAs involved in regulation of seed development and lipid biosynthesis in yellowhorn[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 464.
- [14] 王 旭, 敖 妍, 刘 阳, 等. 文冠果实时荧光定量PCR内参基因的筛选[J]. 分子植物育种, 2020, 18 (9): 2977-2986.
- [15] LI J W, CHEN C J, ZENG Z H, *et al.* SapBase (Sapinaceae Genomic DataBase): a central portal for functional and comparative genomics of Sapindaceae species[J]. BioRxiv, 2022, v1: 517904.
- [16] SILVER N, BEST S, JIANG J, *et al.* Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR[J]. BMC Molecular Biology, 2006, 7(1): 33.
- [17] PFAFFL M W, TICHOPAD A, PRGOMET C, *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(6): 509-515.
- [18] 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 Biology, 2002, 3(7): research0034.1.
- [19] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ØRNTØFT T F. 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[J]. Cancer Research, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [20] NARANCIO R, JOHN U, MASON J, *et al.* Selection of optimal reference genes for quantitative RT-PCR transcript abundance analysis in white clover (*Trifolium repens* L.) [J]. Functional Plant Biology, 2018, 45(7): 737-744.
- [21] 姚李祥, 潘春柳, 余丽莹, 等. 草果种子休眠解除过程中qRT-PCR内参基因筛选[J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (15): 3832-3837.
- [22] NIU L J, TAO Y B, CHEN M S, *et al.* Selection of reliable reference genes for gene expression studies of a promising oilseed crop, *Plukenetia volubilis*, by real-time quantitative PCR[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(6): 12513-12530.

Selection of Reference Genes for Gene Expression Analysis in Seed Development of *Xanthoceras sorbifolium* Bunge

LI Lin-kun¹, LIANG Chong-jun¹, NING Chu-long², ZHANG Wei¹, JIANG Guo-Wei²,
ZHANG Xin², WANG Li-bing^{1,2}

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Forestry College, Northwest A & F University, Yangling 712199, China)

Abstract: **[Objective]** : To assess the suitability of the *ACT* gene for gene expression analysis in seed development of *Xanthoceras sorbifolium*, and to identify the most stable reference genes for gene expression analysis in *X. sorbifolium*. **[Method]** : In this study, four mathematical algorithms (ΔC_T , BestKeeper, NormFinder, geNorm) were carried out for evaluating the expression stability of 12 candidate reference genes based on the web-based tool RefFinder. **[Result]** : The RefFinder result showed that the gene *PP2A* performed the best, followed by *Tip41*, *EF-1 α* , *18r*, *UCE*, *β -TUB*, *UBQ*, *α -TUB*, *CYP*, *SAM*, *ACT*, and *GADPH* at the different seed development stages in *X. sorbifolium* , and the gene also had the highest score, followed by *Tip41*, *CYP*, *18r*, *UBQ*, *SAM*, *EF-1 α* , *UCE*, *GADPH*, *α -TUB*, *ACT*, and *β -TUB* at various tissues. **[Conclusion]** : *PP2A* and *Tip41* are the two most stable reference genes for gene expression analysis in *X. sorbifolium*.
Keywords: *Xanthoceras sorbifolium*; reference gene; gene expression; seed development

（责任编辑：张 研）