

· 技术方法 ·

## 金毛狗实时荧光定量PCR内参基因的鉴别和评价

仲昭暄<sup>1,2</sup>, 周绍容<sup>1</sup>, 汤猛<sup>1</sup>, 陈利君<sup>1</sup>, 严岳鸿<sup>1</sup>, 常纓<sup>2\*</sup>, 王凤攀<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>深圳市兰科植物保护研究中心, 兰科植物保护与利用国家林业和草原局重点实验室, 深圳 518114

<sup>2</sup>东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

**摘要** 金毛狗(*Cibotium barometz*)是一种经济价值较高的药用蕨类植物, 其粗大的根状茎是制作中药狗脊的原材料。加强对金毛狗的科学研究可缓解野生资源保护与中药产业发展之间的矛盾。荧光定量PCR技术是研究植物基因功能的常用方法, 而选择合适的内参基因是该技术的关键环节之一。目前, 金毛狗相关基因功能研究较少, 无合适的内参基因可用。该研究从金毛狗转录组数据中筛选出12个常用的植物内参基因, 通过计算扩增效率, 确定8组可用的内参基因引物。根据8组内参基因对金毛狗10个组织部位的Ct值, 利用RefFinder和Normfinder软件筛选出最佳内参基因*CbUBC4*和*CbEF1A*。对于研究金毛狗不同发育时期根状茎中基因的表达变化, *CbEF1A*和*CbUBC4*是较合适的内参基因。研究机械损伤和水淹条件下基因的表达变化推荐用*CbUBC4*和*CbUBC28*作为内参基因, 通过检测机械损伤和水淹条件下一些快速响应基因的表达量变化, 进一步证实了*CbUBC4*和*CbUBC28*的稳定性。研究结果为金毛狗不同组织部位基因功能研究提供了合适的内参基因。

**关键词** 金毛狗, 不同组织, 内参基因, 根状茎, 稳定性

仲昭暄, 周绍容, 汤猛, 陈利君, 严岳鸿, 常纓, 王凤攀 (2026). 金毛狗实时荧光定量PCR内参基因的鉴别和评价. 植物学报 61, 300–312.

金毛狗(*Cibotium barometz*)为多年生草本植物, 隶属于桫欏目金毛狗科金毛狗属(Jiang et al., 2023), 广泛分布于中国长江流域及其以南的亚热带和热带地区, 常生长于溪流附近光线充足的向阳缓坡。金毛狗是我国二级重点保护野生植物, 也是重要的资源植物, 有较高的经济价值(徐家星等, 2012)。金毛狗的根状茎是制作南药狗脊的原材料。狗脊是《中国药典》收录的9种蕨类植物中药之一, 有祛风湿、补肝肾及强腰膝等功效, 是壮腰健肾类和健筋骨类中成药的核心原料。金毛狗的根状茎贴伏在地表, 随顶端分生组织向前伸长生长; 新生根状茎身披金黄色鳞毛, 多年后逐步脱落露出深棕褐色表皮。自然条件下, 野生金毛狗繁殖率极低且根状茎生长缓慢, 加之盗采严重, 当前面临野生资源保护和生药产业发展的双重困境。为有效保护和利用野生金毛狗资源, 需加快野生金毛狗人工驯化进程, 利用现代分子改良手段获得具有优良栽培性状的新品种或新种质, 推广人工栽培。目前,

关于金毛狗或狗脊相关研究较少, 且主要围绕化学成分(Kim et al., 2023; Zhang et al., 2023)、药理学(Chen et al., 2022)、系统分类(Jiang et al., 2023)和群体遗传学(由永飞和邓洪平, 2012)开展基础研究; 涉及金毛狗发育生物学、生殖生物学、非生物胁迫以及关键有效成分代谢通路等方面研究极少(Ji et al., 2023)。金毛狗全基因组序列的发布在一定程度上促进了相关分子生物学研究, 但该基因组还存在大量未解析的重复区域和复杂序列结构(Qin et al., 2024), 需深入研究以期获得注释更精细的全基因组序列。

定量PCR (quantitative polymerase chain reaction, qPCR)是20世纪末基于普通PCR技术开发出的用于定量检测样本中特异性RNA或DNA序列丰度的分子生物学技术(Higuchi et al., 1992)。Heid等(1996)将其改良后推出了实时荧光定量PCR (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术。PCR技术广泛应用于生命科学基础研究(Valasek

收稿日期: 2025-03-15; 接受日期: 2025-07-29

基金项目: 深圳市科技计划-基础研究重点项目(No. JCYJ20220818103212025)和国家林业和草原局2024年度中央财政转移支付林业改革发展资金-国家重点野生动植物保护补助项目

\* 通讯作者。E-mail: changying@neau.edu.cn; duibian@126.com

and Repa, 2005), 并逐步拓展到食品、农业、畜牧、微生物和环境工程等生产应用领域, 在食品和饮用水微生物检测(Botes et al., 2013; Coudray-Meunier et al., 2015)、生物检疫(Herbert et al., 2007)、动物疾病或植物病虫害诊断(Verdecchia et al., 2021; Dutta et al., 2022; Magro et al., 2023)和微生物菌种鉴别(刘建钊等, 2019)等领域发挥重要作用。qRT-PCR检测的准确性受到样品类型、核酸提取方法及保存过程等因素影响, 一般需要对待检测样品进行标准化处理, 利用物种自身的内参基因(reference gene)是最常用的标准化方法(Huggett et al., 2005)。ICG数据库(Internal Control Genes for qRT-PCR normalization)提供了大量可用于模式生物和非模式生物qRT-PCR检测的内参基因及适用场景, 但未提供金毛狗及同属物种内参基因的相关信息(Sang et al., 2018)。植物中常用的内参基因有*EF* (*Elongation factor*)、*Tub* (*Tubulin*)、*Act* (*Actin*)、*UBC* (*Ubiquitin-conjugating enzyme*)、*UBQ* (*Ubiquitin*)和*eIF* (*Eukaryotic initiation factor*)。内参基因在生物的不同部位或不同环境(生物或非生物胁迫)下不能均一性表达(Kozera and Rapacz, 2013); 甚至实验处理也会影响某些内参基因的表达量(Schmittgen and Zakrajsek, 2000)。因此, 研究者需要根据样品实际情况筛选合适的内参基因用于检测特异性核酸序列的丰度。

本研究以金毛狗不同发育时期多个器官为材料, 利用qRT-PCR技术检测不同内参基因在各器官中的表达丰度, 从不同角度评价各内参基因引物的特异性和稳定性, 以期为金毛狗基因功能研究提供合适的内参基因引物。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

选取深圳市兰科植物保护研究中心园区野生金毛狗(*Cibotium barometz* (L.) J.Sm.)植株, 幼年期根状茎取自人工繁育的金毛狗幼苗, 其它材料从同一个野生金毛狗居群中采集。每个样品设3–5个生物学重复。幼年期根状茎取自人工繁育1–2年的金毛狗幼苗, 采集3–5株生长健壮的幼苗, 清理干净, 找到生长点单独切下, 厚度约2 mm, 剩下的作为幼年期根状茎。样品经液氮速冻后保存在–80°C冰箱中备用。

取中生期和成熟期根状茎时, 仅切割生长点另一端的组织材料, 采集完成后对切口处进行杀菌处理, 确保植株继续生长。选择生长健壮的金毛狗植株, 用灭菌剪刀在金毛狗小羽叶上剪切多个伤口, 分别于0、2、4、8和16小时收集有伤口的小羽叶。选择生长健壮的一年生金毛狗盆栽幼苗, 将盆置于水中, 淹没幼苗根系, 分别于0、4、12、24和72小时收集水淹幼苗的小羽叶。每个时间点样品设3个生物学重复。样品经液氮速冻后保存备用。

### 1.2 基因组DNA和总RNA提取及cDNA合成

使用植物基因组DNA提取试剂盒(北京全式金生物技术股份有限公司, Cat No.EE112-01)从金毛狗小羽叶中提取DNA, 用于检测内参基因引物扩增效率。样品总RNA提取采用CTAB法(Gambino et al., 2008)。使用液氮将材料研磨成粉末, 加入提取液, 经恒温孵育、有机溶剂抽提、粗沉淀、重悬浮、有机溶剂抽提及特异沉淀等步骤获得高质量总RNA。利用微量分光光度计(Thermo NanoDrop ONE)和琼脂糖凝胶电泳检测总RNA浓度、纯度和完整度。

用反转录试剂盒(宝日医生物技术有限公司, Cat No.RR047A)合成cDNA, 具体操作步骤按产品使用说明进行, 每个反应中总RNA用量为1 μg。得到的cDNA原液用无核酸酶水稀释20倍, 用于后续qRT-PCR实验。

### 1.3 qRT-PCR实验

以叶片基因组DNA为模板计算引物的扩增效率。先将DNA用无核酸酶水稀释到qRT-PCR实验的Ct值(cycle threshold value)为11, 标记为5号(定义其浓度为 $10^4$ )。从5号取100 μL, 与900 μL无核酸酶水混合, 充分涡旋混匀, 标记为4号(定义其浓度为 $10^3$ ); 再从4号取100 μL, 与900 μL无核酸酶水混合, 充分涡旋混匀, 标记为3号(定义其浓度为 $10^2$ ); 依次稀释2号(定义其浓度为 $10^1$ )和1号(定义其浓度为 $10^0$ )。绘制扩增曲线时, 以lg(定义浓度)为横坐标, 样品对应的Ct值为纵坐标。

qRT-PCR实验采用染料法, 实验仪器为ABI QuantStudio 5。反应体系总体积为20 μL, 包括10 μL SYBR试剂(北京全式金生物技术股份有限公司, 染

料法荧光定量PCR预混液, AQ601-01), 1  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正向引物, 1  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 反向引物, 1  $\mu\text{L}$ 模板, 7  $\mu\text{L}$ 无菌水。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30秒; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性5秒, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30秒, 40个循环。

用Primer Premier 5.0软件设计引物。利用qRT-PCR检测响应机械损伤和水淹胁迫的基因引物分别为 *CbWAK3* (正向引物 5'-GCCCTTCTTTCCAA-CCCT-3'; 反向引物 5'-TCGCCCACTTTGCTGTAT-3')、*CbWRKY3* (正向引物 5'-GTTTCTGGTGGT-TTATCGG-3'; 反向引物 5'-GGTTCCTTAGCCTT-CTCAA-3')和 *CbEIN3* (正向引物 5'-ACATCCAG-CAAATATTCG-3'; 反向引物 5'-TTCTGTAGCCT-TGACCATA-3')。反应体系与程序同上。

#### 1.4 数据处理

利用Excel软件、RefFinder和Normfinder软件([https://](https://www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder-master)

[www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder-master](https://www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder-master)) 进行数据处理。利用在线软件ChiPlot (<https://www.chiplot.online/#Phylogenetic-Tree>)绘制小提琴图和柱形图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同样品总RNA质量检测

分别采集金毛狗根系、根状茎(幼年期、中生期和成熟期)、茎顶端分生组织、成熟叶(不育叶)、幼叶(不育叶)、未成熟孢子囊、拳卷叶和叶柄10个组织部位(图1), 按实验方法收集机械损伤和水淹处理的小羽叶。清洗擦干后用CTAB法提取上述样品的总RNA, 使用微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的浓度、质量和完整性, 确保获得足够量和高质量的总RNA, 用于后续反转录和qRT-PCR实验。用微量分光光度计测得所有总RNA溶液OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值为

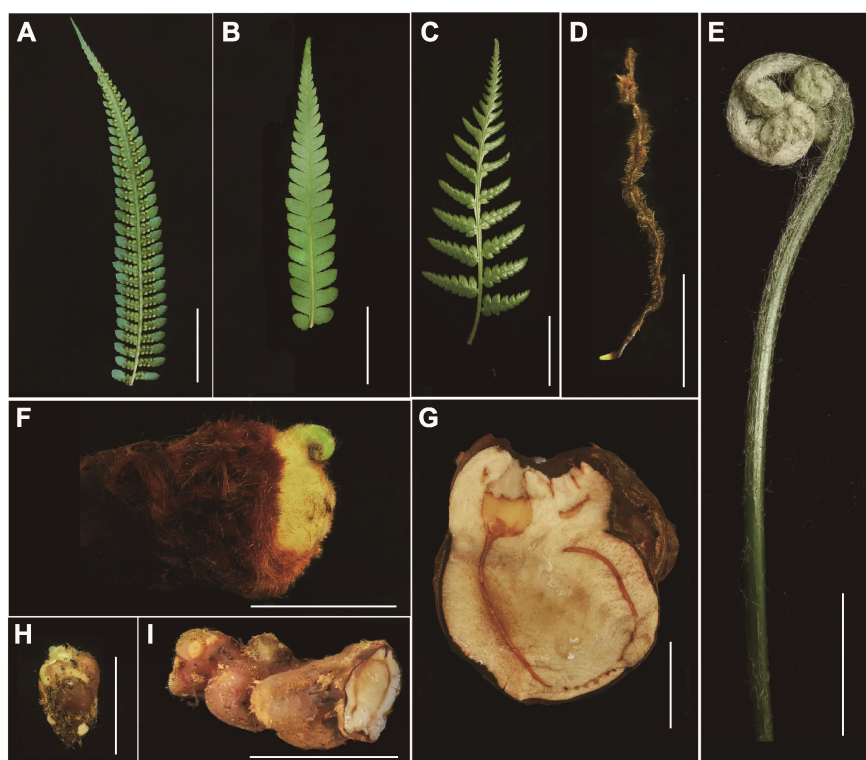


图1 金毛狗不同组织部位

(A) 未成熟孢子囊; (B) 成熟叶; (C) 幼叶; (D) 根系; (E) 叶柄和拳卷叶; (F) 茎顶端分生组织; (G) 根状茎-成熟期; (H) 根状茎-幼年期; (I) 根状茎-中生期。Bars=2 cm

Figure 1 The different tissues sampled from *Cibotium barometz*

(A) Immature sori; (B) Mature frond; (C) Young frond; (D) Root; (E) Stipe and rolled lamina; (F) Rhizome apical meristem; (G) Rhizome-mature stage; (H) Rhizome-young developmental stage; (I) Rhizome-middle developmental stage. Bars=2 cm

2.04–2.28, 浓度为569.60–1 309.34 ng·μL<sup>-1</sup>, 琼脂糖凝胶电泳显示所有总RNA电泳条带清晰完整, 未见明显的降解现象(图2)。所得金毛狗各样品总RNA可用于后续实验。

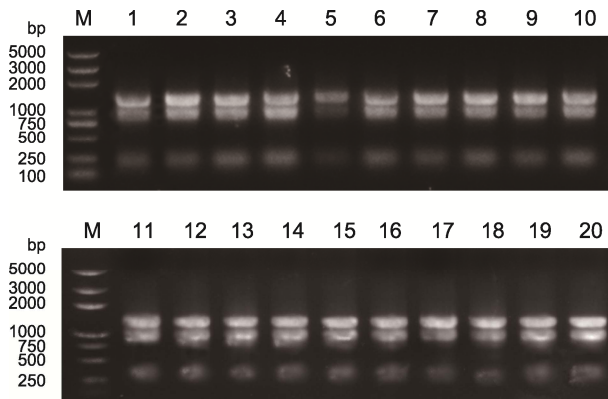


图2 不同样品总RNA琼脂糖凝胶电泳检测

1: 未成熟孢子囊; 2: 成熟叶; 3: 幼叶; 4: 根系; 5: 叶柄; 6: 拳卷叶; 7: 茎顶端分生组织; 8: 根状茎-成熟期; 9: 根状茎-幼年期; 10: 根状茎-中生期。11–15分别表示机械损伤0、2、4、8和16小时小羽叶。16–20分别表示幼苗(1年生)水淹处理0、4、12、24和72小时小羽叶。M: DNA marker

Figure 2 Agarose gel electrophoresis assay of total RNA extracted from different samples

1: Immature sori; 2: Mature frond; 3: Young frond; 4: Root; 5: Stipe; 6: Rolled lamina; 7: Rhizome apical meristem; 8: Rhizome-mature stage; 9: Rhizome-young developmental stage; 10: Rhizome-middle developmental stage. Samples 11–15 represent pinnules subjected to mechanical injury at 0, 2, 4, 8, and 16 h, respectively. Samples 16–20 indicate pinnules of seedlings (1 year old) under waterlogging treatment at 0, 4, 12, 24, and 72 h, respectively. M: DNA marker

## 2.2 不同内参基因引物扩增效率和熔解曲线检测

金毛狗全基因组序列尚未完全注释, 通过分析前期检测的金毛狗根状茎转录组数据(Qin et al., 2024), 参考不同数据库(KEGG、NR、Swiss-Prot、TrEMBL和Pfam)对各基因的注释及基因表达丰度的FPKM值(fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments), 筛选出12个可作为内参基因的基因序列(表1), 包含常见的植物内参基因*EF*、*Tub*、*ACT*、*UBC*、*UBQ*和*eIF*。针对每个基因利用Primer premier 5.0软件设计最优qRT-PCR引物。

理论上, 每次PCR反应过程中DNA模板与DNA产物序列间有固定的数量关系, 即 $X_n = X_0 \times 2^n$  ( $X_n$ 表示

PCR结束时系统的产物数量,  $X_0$ 表示PCR起动前系统的初始产物数量,  $n$ 表示PCR循环次数)。而实际PCR反应中扩增效率很难达到标准值2, 扩增效率主要受引物(引物二聚体、非特异性扩增、退火温度和浓度等)、*Taq*酶活性、PCR抑制因子(镁离子和EDTA)以及初始模板浓度等因素影响。为了验证上述筛选的内参基因是否适用于qRT-PCR实验, 利用模板梯度稀释实验制作每对引物的扩增曲线, 同时利用熔解曲线检测每对引物的PCR产物是否具有特异性。

利用qRT-PCR进行相对定量分析时, 为确保数据的准确性, 要求扩增效率范围在90%–110%之间, 对应扩增曲线斜率为 $-3.6 < k < -3.1$ 。根据qPCR检测的Ct值与对应模板浓度之间的线性关系, 8个备选基因引物的扩增曲线斜率符合要求, 分别为*CbACT*、*CbEF1A*、*CbeIF4A3*、*CbUBC4*、*CbUBC28*、*CbUBQ11.1*、*CbaTub1.1*和*CbβTub1*(图3)。采用这些基因引物进行PCR得到的DNA产物对应的熔解曲线有单一峰值(图4), 表明这些引物的特异性较好, 可用于qRT-PCR实验。

## 2.3 内参基因在不同组织中表达的稳定性

为了验证8组内参基因引物的稳定性, 分别以金毛狗10个组织部位的总RNA为模板, 通过反转录合成cDNA, 再以cDNA为模板进行qRT-PCR实验。结果显示, 10个组织部位中8组内参基因的Ct值范围不同(图5A), 其中*CbEF1A*的Ct值波动范围最小, 其次是*CbUBC4*、*CbUBC28*和*CbUBQ11.1*, 而*CbACT*、*CbeIF4A3*、*CbβTub1*和*CbaTub1.1*的Ct值波动范围均超过4。

RefFinder是一款综合评价qRT-PCR内参基因稳定性的软件(Xie et al., 2012), 将上述Ct值导入该软件后得到8组内参基因针对金毛狗10个组织部位的稳定性排名(图5B), 纵坐标分值越小表示内参基因越稳定。稳定性排名前4的内参基因分别是*CbUBC4*、*CbEF1A*、*CbUBC28*和*CbACT*, 而*CbeIF4A3*、*CbβTub1*、*CbUBQ11.1*和*CbaTub1.1*排名靠后。为了进一步验证上述内参基因的稳定性, 用Normfinder程序重新对8个内参基因的稳定性进行排序, 稳定性排名前4的内参基因依然是*CbUBC4*、*CbEF1A*、*CbACT*和*CbUBC28*(图5C)。因此, 利用qRT-PCR检测金毛狗10个组织部位中某个基因的表达量, *CbUBC4*

表1 金毛狗qRT-PCR候选内参基因

Table 1 The candidate reference genes of *Cibotium barometz* for qRT-PCR

Primer symbol	Base sequence (5'-3')	Products length (bp)	Melting temperature (°C)	GC percentage (%)	Amplification efficiency (%)
<i>CbUBQ11.1-F</i>	GGGAAAGCAACTGGAGGA	180	55.2	55.6	92.3
<i>CbUBQ11.1-R</i>	CGTGGATGTAACCGAGCA		55.3	55.6	
<i>CbaTub1.1-F</i>	CCTTGACCGCATTAGAAA	119	51.5	44.4	94.5
<i>CbaTub1.1-R</i>	ACAACCGCTCCAACAGAA		53.9	50.0	
<i>CbβTub1-F</i>	AAGTTCCTGGGAGGTGGTT	137	50.8	50.0	103.1
<i>CbβTub1-R</i>	ACAGCCCTTGGAACATAG		49.9	50.0	
<i>CbEF1A-F</i>	CACCGTCATTGATGCTCC	108	53.0	50.0	98.8
<i>CbEF1A-R</i>	AAGCCTCCCCTGGTAGAA		54.1	50.0	
<i>CbeIF4A3-F</i>	TCCTCCCAGTCCTTATT	137	49.6	50.0	100.9
<i>CbeIF4A3-R</i>	GCCACTCCCTTTCTACCA		50.3	50.0	
<i>CbACT-F</i>	GGCTGGATTCGCAGGTGA	133	59.6	61.1	109.7
<i>CbACT-R</i>	ACGCTTGACTGGGCTTC		58.0	61.1	
<i>CbUBC28-F</i>	TCCTGCTTTGACCATCTC	117	50.2	50.0	98.4
<i>CbUBC28-R</i>	TTGGCTCTGTCAGTCTTGTA		50.9	45.0	
<i>CbUBC4-F</i>	CTTCCCTCCAGACTACCC	120	50.9	61.1	104.9
<i>CbUBC4-R</i>	GGACTCCACTGCTCCTTC		51.5	61.1	
<i>CbβTub4-F</i>	ACATTGTTCGGTTCACCAG	134	53.5	50.0	113.8
<i>CbβTub4-R</i>	GGAAATCTAAGGCAGCAC		55.1	52.9	
<i>CbEFTUA-F</i>	GATGATGTTGCCGTCGTT	169	52.3	50.0	114.9
<i>CbEFTUA-R</i>	TGGGATGGGTATGTTGGT		56.0	52.9	
<i>CbACT7-F</i>	CTGGCACCATACTTCTA	132	55.2	50.0	87.9
<i>CbACT7-R</i>	TGATTTGGGTCACTTCT		53.6	38.8	
<i>CbUBC2-F</i>	AACCGTCCGTTTCATCTC	119	54.7	56.3	121.2
<i>CbUBC2-R</i>	ATTGCAGCCACATCGTAT		52.9	44.4	

是最优内参基因，其次是 *CbEF1A*、*CbUBC28* 和 *CbACT*。

## 2.4 内参基因在不同发育时期根状茎中表达的稳定性的

根状茎是金毛狗最具经济价值的器官，因此对金毛狗根状茎的研究较多。单独分析候选内参基因在不同发育时期根状茎中表达的稳定性的，发现 *CbUBQ11.1* 的 Ct 值波动范围最小(图5D)，之后依次是 *CbEF1A*、*CbUBC4* 和 *CbβTub1*。将8组内参基因针对金毛狗根状茎的 Ct 值导入 RefFinder 软件，结果显示，稳定性排名前4的内参基因分别为 *CbEF1A*、*CbUBC4*、*CbUBC28* 和 *CbβTub1* (图5E)。同样地，利用 Norm-

finder 程序重新对8个内参基因的稳定性的进行排序，显示稳定性排名前4的内参基因分别为 *CbEF1A*、*CbUBC4*、*CbβTub1* 和 *CbUBC28* (图5F)。综上，在研究金毛狗根状茎中某个基因的表达丰度随发育时期的变化规律时，*CbEF1A* 是最佳内参基因，其次为 *CbUBC4*、*CbUBC28* 和 *CbβTub1*。

## 2.5 逆境胁迫下内参基因表达的稳定性的

有关金毛狗响应逆境胁迫的研究尚未见报道。为了检验内参基因在多应用场景下的稳定性，从而为分子生物学研究提供合适的内参基因，我们模拟了机械损伤和水淹胁迫，用同样方法检测上述8个内参基因的稳定性的。所有样品均为小羽叶，内参基因对应的 Ct 值波

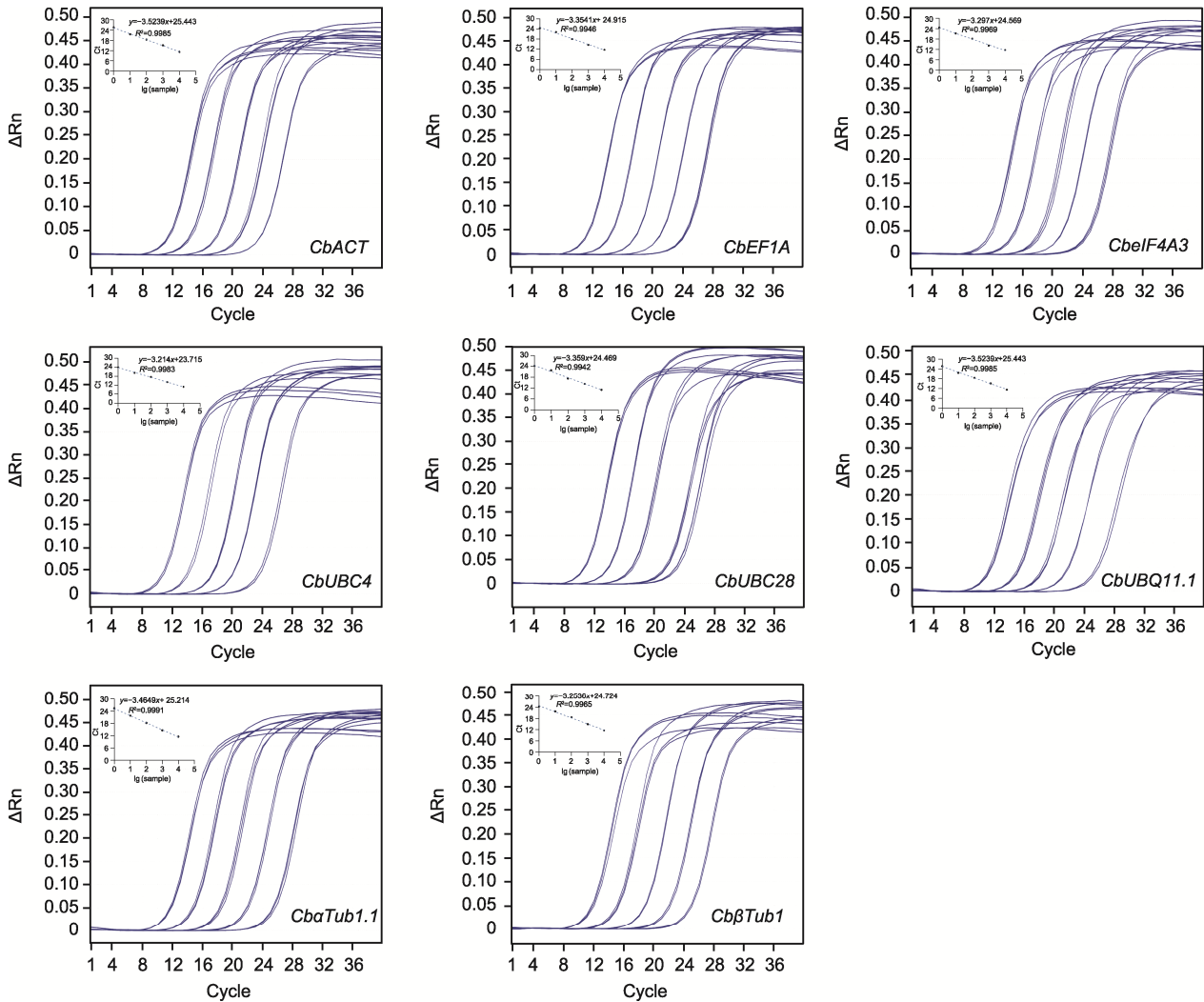


图3 金毛狗内参基因的扩增曲线

纵坐标  $\Delta Rn = (R+n) - (R-n)$ 。R+n表示每点测量的荧光强度; R-n表示荧光基线强度; Ct值(cycle threshold value)表示阈值循环数; lg(sample)表示模板浓度的对数值。

Figure 3 Amplification plot of the reference gene in *Cibotium barometz*

The ordinate value is  $\Delta Rn = (R+n) - (R-n)$ . R+n is the fluorescence emission of the product at each time point; R-n is the fluorescence emission of the baseline; Ct value (cycle threshold value) means cycle threshold; lg(sample) indicates the logarithmic value of template concentration.

动不大(图6A, D)。利用2种不同算法评估8个内参基因在机械损伤和水淹胁迫下的稳定性(图6B, C, E, F), 结果表明, 稳定性排名前4的内参基因是*CbUBC28*、*CbUBC4*、*CbEF1A*和*CbUBQ11.1*, 而*CbelF4A3*、*CbβTub1*、*CbACT*和*CbaTub1.1*的稳定性稍差。整体上看, *CbUBC28*和*CbUBC4*是金毛狗机械损伤和水淹胁迫下较理想的内参基因。

为了进一步验证筛选的内参基因在实际应用中的稳定性, 参考已报道的植物中快速响应机械损伤和

水淹胁迫的标志性基因, 如响应机械损伤的*WAK* (*WALL-ASSOCIATED KINASES*)和*WRKY*基因 (Savatin et al., 2014; Goyal et al., 2023), 以及响应水淹胁迫的*EIN3* (*ETHYLENE INSENSITIVE 3*) (Zheng et al., 2023), 筛选金毛狗转录组数据中与之对应的同源基因, 利用qRT-PCR检测机械损伤和水淹处理材料中这些基因的表达变化。结果显示, 机械损伤诱导金毛狗*CbWAK3*和*CbWRKY3*基因表达上调(图7), 基于不同内参基因检测变化趋势一致; 水淹

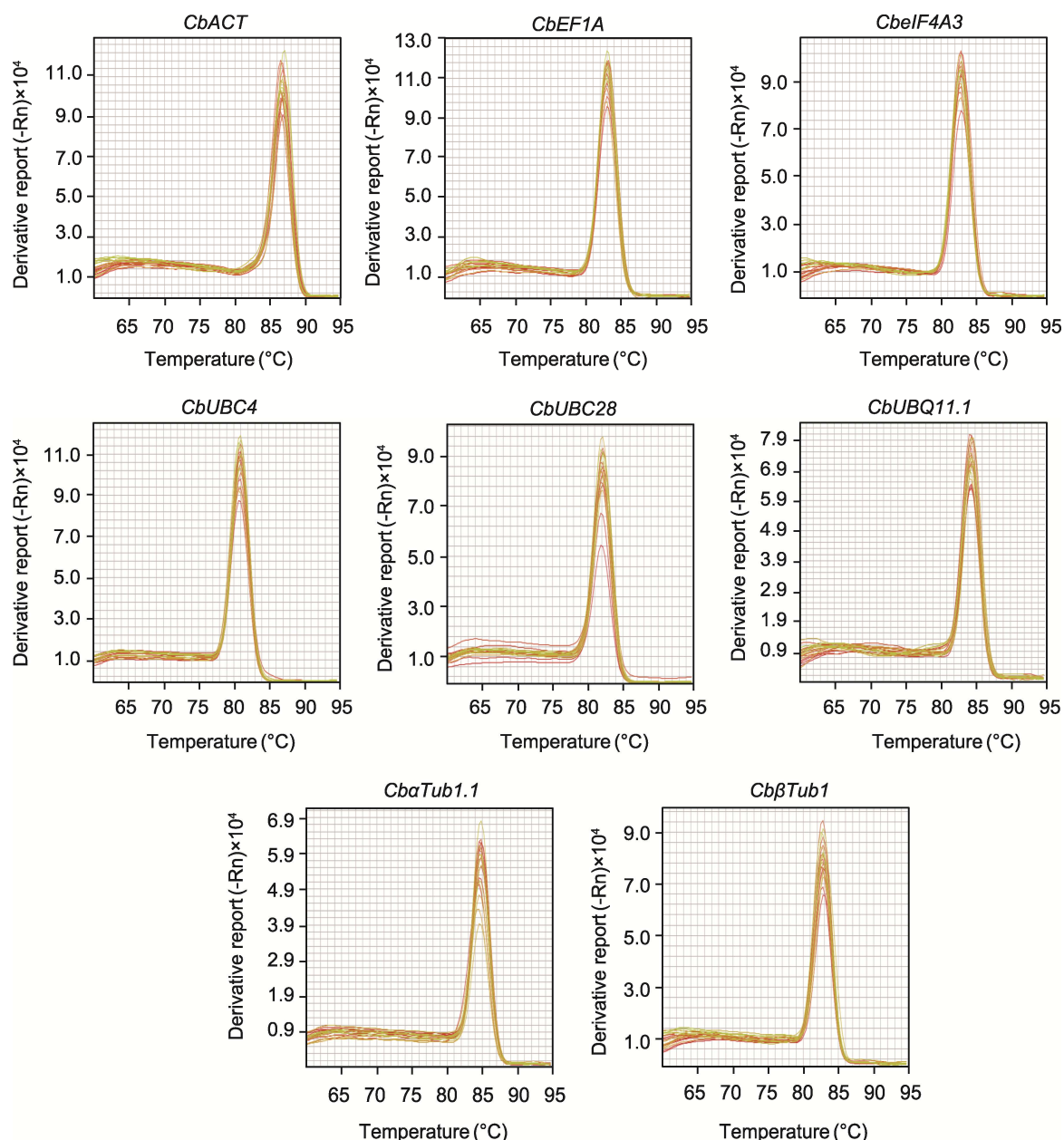


图4 金毛狗内参基因qRT-PCR产物的熔解曲线

Figure 4 The melt curve plot of DNA products in the qRT-PCR assay for reference genes in *Cibotium barometz*

胁迫使乙烯信号途径转录因子基因*CbEIN3*表达水平升高,且基于不同内参基因检测变化趋势一致。

## 2.6 讨论

从物种保护和资源开发利用角度考虑,金毛狗具有较高的研究价值。加强对金毛狗的研究,攻克其在繁育生物学和人工栽培方面的科学难题,既能提高金毛狗

野生资源的保护水平,又能缓解医药产业对金毛狗根状茎的迫切需求。随着测序技术的快速发展,植物研究已进入后基因组时代,现代植物生理学和分子生物学技术推动了资源植物的基因功能研究,而qRT-PCR是研究基因功能的基本方法,且在生产实践中广泛应用。选择合适的内参基因是成功开展qRT-PCR实验的必要条件,因此,在利用qRT-PCR

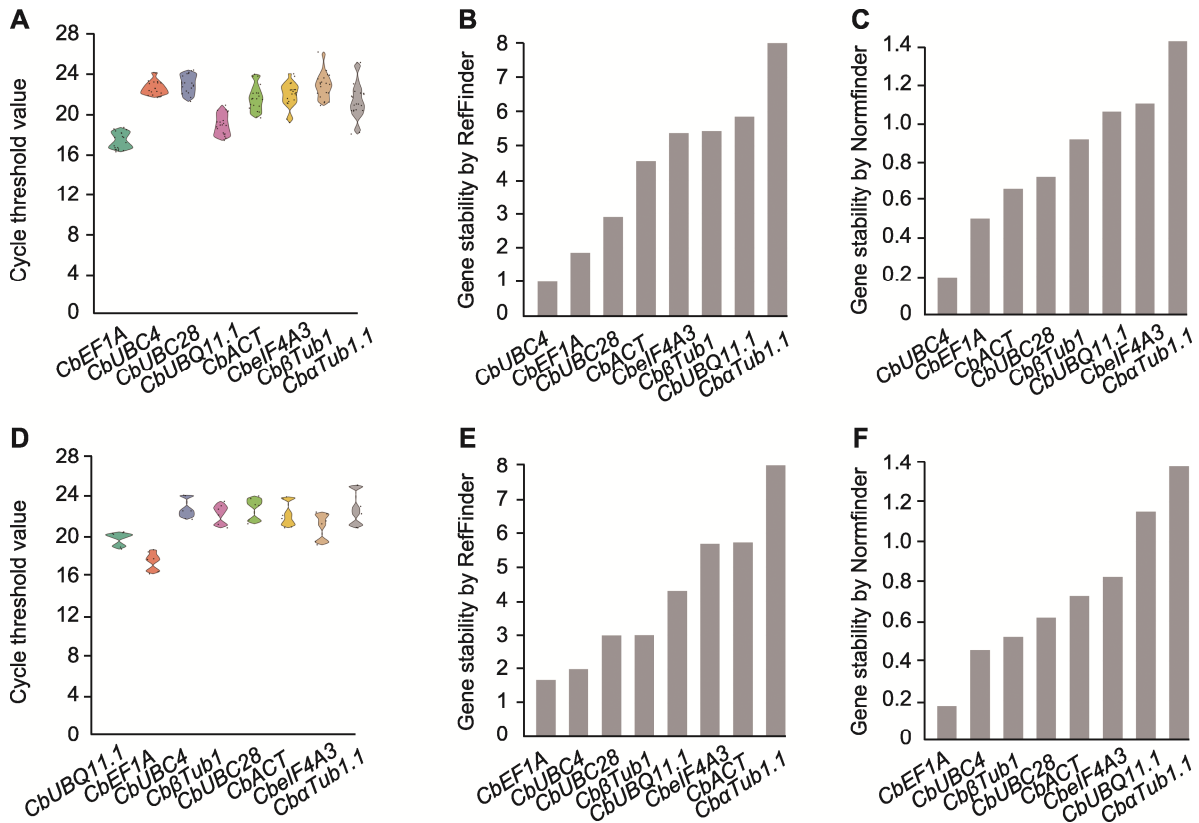


图5 金毛狗内参基因的Ct值(cycle threshold value) (A, D)和稳定性评价(B, C, E, F) (A)–(C) 10个组织部位; (D)–(F) 不同发育时期的根状茎

Figure 5 Ct value (cycle threshold value) of reference genes (A, D) and the evaluation of their stability (B, C, E, F) of *Cibotium barometz*

(A)–(C) Ten tissues; (D)–(F) Rhizomes at different developmental stages

检测植物组织中目标基因的表达丰度之前, 需对内参基因进行检验, 以确保实验数据的准确性。

目前已报道了大量的植物内参基因, ICG数据库收录了340个植物内参基因(Sang et al., 2018)。选择具体内参基因时, 首先要考虑是否有已发表的内参基因, 如果没有则要根据研究对象筛选合适的内参基因。一般先根据转录组数据筛选FPKM值较稳定的基因, 获得初步的备选内参基因(张登等, 2018; 彭寿杰等, 2023; 赵雨等, 2023); 然后利用不同算法综合评价内参基因的稳定性。研究表明, 内参基因的稳定性受到物种(彭寿杰等, 2023)、组织部位(张登等, 2018; 赵雨等, 2023)、发育时期(梁力丹等, 2024)、环境条件(赵雨等, 2023)和序列特异性等因素影响, 不同研究场景下最适内参基因既有家族保守性也有特异性(张登等, 2018; 彭寿杰等, 2023; 赵雨等, 2023)。我们发现金毛狗*CbUBC4*是多种研究场景下最适内参基

因, *UBC*也是研究水稻(*Oryza sativa*)重金属胁迫的合适内参基因(Almas and Kamrodi, 2018)。除*CbUBC4*外, *CbEF1A*和*CbUBC28*也是研究金毛狗不同组织和胁迫响应基因时较合适的内参基因。实际应用中, 研究者选择内参基因时有偏好性, 最终鉴定的适宜内参基因往往有差异; 同一个物种不同样品也会对应不同的适宜内参基因(Sang et al., 2018)。

为了全面系统地评价备选内参基因的稳定性, 本研究取样基本覆盖金毛狗(孢子体)所有组织部位, 既有地上部(叶和叶柄等), 也有地下部(根系); 既有成熟器官(成熟叶), 也有幼嫩器官(幼嫩叶); 同时也考虑到器官的发育过程(不同发育时期根状茎)及特殊的组织部位(孢子囊群和茎顶端生长点), 以及机械损伤和水淹胁迫条件。根据10个组织部位、3个不同发育时期根状茎和不同胁迫条件下对应的Ct值, 我们分别评价了8个候选内参基因在不同场景下的

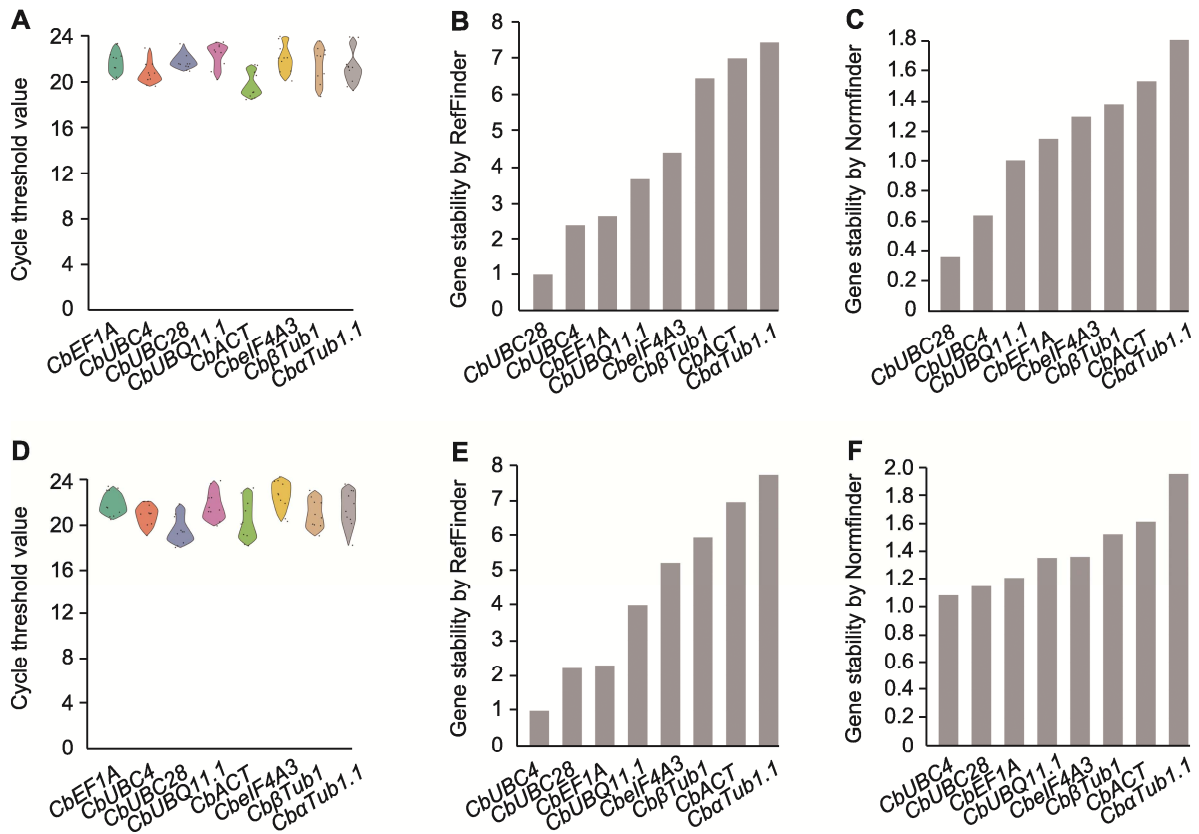


图6 胁迫条件下内参基因的Ct值(cycle threshold value) (A, D)和稳定性评价(B, C, E, F) (A)–(C) 机械损伤; (D)–(F) 水淹

Figure 6 Ct value (cycle threshold value) (A, D) and the evaluation of their stability (B, C, E, F) of reference genes under stress conditions (A)–(C) Mechanical injury; (D)–(F) Waterlogging

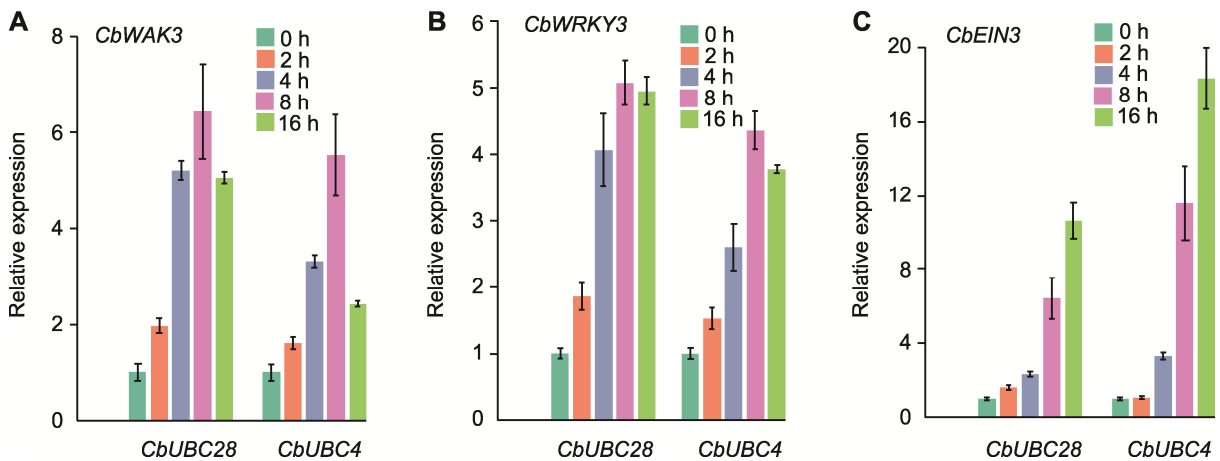


图7 响应机械损伤(A, B)和水淹胁迫(C)基因的表达式量

Figure 7 The relative expression of genes response to mechanical injury (A, B) and waterlogging stress (C)

稳定性。结果表明, 在多种研究场景下 *CbUBC4* 的稳定性均较好, 说明内参基因 *CbUBC4* 的稳定性在不

同样品系统中具有保守性。

目前尚未在植物中发现绝对稳定的内参基因, 开

展qRT-PCR实验时需根据样品选择相对稳定的内参基因(朱志鹏等, 2025)。本研究仅针对金毛狗单个物种的内参基因, 当研究范围扩展到金毛狗属甚至桫欏目, 最适内参基因需要做进一步筛选。Hong等(2022)以 $\beta$ -actin作为内参基因研究桫欏(*Alsophila spinulosa*)胁迫抗性及光适应性基因的表达变化。本研究未涉及金毛狗配子体样品, 若研究金毛狗配子体发育或生殖细胞性别分化等生殖相关基因功能, 还需对上述内参基因做进一步验证。

综上所述, 本研究为检测金毛狗不同组织、机械损伤和水淹胁迫下基因的表达量变化提供了合适的内参基因。在其它场景下, 利用qRT-PCR检测金毛狗组织中基因表达量变化时, 需验证内参基因在新样品系统中的稳定性; 或在一个样品系统中使用多个内参基因, 不同内参基因之间形成交叉验证, 以确保实验结果的准确性。

## 作者贡献声明

仲昭暄, 王凤攀: 构思并设计实验, 完成实验, 分析数据及作图, 撰写论文; 周绍容, 汤猛: 协助采集和处理实验材料; 陈利君: 指导论文撰写; 严岳鸿, 常纓: 指导论文修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突

**Conflict of Interests:** The authors declare that there is no conflict of interests.

©The author(s) 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

## 参考文献

- Almas DE, Kamrodi AR (2018). Validation of appropriate reference genes for real-time quantitative PCR gene expression analysis in rice plants exposed to metal stresses. *Russ J Plant Physiol* **65**, 890–897.
- Botes M, de Kwaadsteniet M, Cloete TE (2013). Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Anal Bioanal Chem* **405**, 91–108.
- Chen GY, Wang YF, Yu XB, Liu XY, Chen JQ, Luo J, Tao QW (2022). Network pharmacology-based strategy to investigate the mechanisms of *Cibotium barometz* in treating osteoarthritis. *Evid-Based Compl Alt* **2022**, 1826299.
- Coudray-Meunier C, Fraise A, Martin-Latil S, Guillier L, Delannoy S, Fach P, Perelle S (2015). A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples. *Int J Food Microbiol* **201**, 17–26.
- Dutta D, Naiyer S, Mansuri S, Soni N, Singh V, Bhat KH, Singh N, Arora G, Mansuri MS (2022). COVID-19 diagnosis: a comprehensive review of the RT-qPCR method for detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics* **12**, 1503.
- Gambino G, Perrone I, Gribaudo I (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem Anal* **19**, 520–525.
- Goyal P, Devi R, Verma B, Hussain S, Arora P, Tabassum R, Gupta S (2023). WRKY transcription factors: evolution, regulation, and functional diversity in plants. *Protoplasma* **260**, 331–348.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**, 986–994.
- Herbert KS, Hoffmann AA, Powell KS, Ophel-Keller K, Parsons YM (2007). The development of a polymerase chain reaction method for the rapid identification of grape phylloxera in vineyard soil. *Acta Hort* **733**, 75–88.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nat Biotechnol* **10**, 413–417.
- Hong YF, Wang Z, Li MH, Su YJ, Wang T (2022). First multi-organ full-length transcriptome of tree fern *Alsophila spinulosa* highlights the stress-resistant and light-adapted genes. *Front Genet* **12**, 784546.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* **6**, 279–284.
- Ji ZJ, Fan BL, Chen YD, Yue JY, Chen JB, Zhang RR, Tong Y, Liu ZQ, Liang JC, Duan LX (2023). Functional characterization of triterpene synthases in *Cibotium barometz*. *Syn Syst Biotechnol* **8**, 437–444.
- Jiang RH, Liang SQ, Wu F, Tang LM, Qin B, Chen YY, Huang YH, Li KX, Zhang XC (2023). Phylogenomic analysis, cryptic species discovery, and DNA barcoding of the genus *Cibotium* in China based on plastome data. *Front Plant Sci* **14**, 1183653.
- Kim NH, Lee JY, Kim CY (2023). Protective role of ethanol extract of *Cibotium barometz* (Cibotium Rhizome) against dexamethasone-induced muscle atrophy in C2C12 myotubes. *Int J Mol Sci* **24**, 14798.

- Kozera B, Rapacz M** (2013). Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* **54**, 391–406.
- Liang LD, Li HJ, Lan YF, Zang XZ, Lin JL, Wei YQ, Zhang PJ, Ren PF, Meng L** (2024). Screening and validation of reference genes in *Lyophyllum decastes* by qRT-PCR. *J Agric Biotechnol* **32**, 2915–2925. (in Chinese)  
梁力丹, 李华君, 兰玉菲, 臧西哲, 林嘉龙, 韦勇琪, 张佩锦, 任鹏飞, 孟丽 (2024). 实时荧光定量PCR筛选荷叶离褶伞的内参基因及验证. *农业生物技术学报* **32**, 2915–2925.
- Liu JC, Liu HZ, Liu YW, Zhang HP, Song KK, Li JQ, Qiao TK, Wu ZY** (2019). Rapid identification for the species of *Candida* by real-time qPCR. *Chin Vet Sci* **49**, 58–66. (in Chinese)  
刘建钊, 柳焕章, 刘彦威, 张鹤平, 宋阔阔, 李聚芹, 乔铁库, 吴志勇 (2019). 定量PCR快速鉴别念珠菌种方法的建立. *中国兽医科学* **49**, 58–66.
- Magro S, Visentin E, Chiarin E, Cendron F, Penasa M, Costa A, Cassandro M, De Marchi M** (2023). Pathogen detection via quantitative PCR in milk of healthy cows collected using different sampling protocols. *Pathogens* **12**, 935.
- Peng SJ, Cai C, Li DD, Lai JH, Zhao YL, Xu FR** (2023). Screening and validation of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. forrestii*. *Plant Physiol J* **59**, 997–1007. (in Chinese)  
彭寿杰, 蔡吹, 李丹丹, 赖佳辉, 赵艳丽, 徐福荣 (2023). 滇重楼和长柱重楼实时荧光定量PCR内参基因的筛选和验证. *植物生理学报* **59**, 997–1007.
- Qin GL, Pan DL, Long Y, Lan HY, Guan DL, Song J** (2024). Chromosome-scale genome of the fern *Cibotium barometz* unveils a genetic resource of medicinal value. *Horticulturae* **10**, 1191.
- Sang J, Wang ZN, Li M, Cao JB, Niu GY, Xia L, Zou D, Wang F, Xu XJ, Han XJ, Fan JQ, Yang Y, Zuo WZ, Zhang Y, Zhao WM, Bao YM, Xiao JF, Hu SN, Hao LL, Zhang Z** (2018). ICG: a wiki-driven knowledgebase of internal control genes for RT-qPCR normalization. *Nucleic Acids Res* **46**, D121–D126.
- Savatin DV, Gramegna G, Modesti V, Cervone F** (2014). Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. *Front Plant Sci* **5**, 470.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA** (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* **46**, 69–81.
- Valasek MA, Repa JJ** (2005). The power of real-time PCR. *Adv Physiol Edu* **29**, 151–159.
- Verdecchia E, Ceustermans A, Baets D, Ferreira J, Bonants P, Melis P, Van Hemelrijck W, Bylemans D, Rediers H, Lievens B** (2021). Quantitative PCR for detection and quantification of *Phytophthora cactorum* in the cultivation of strawberry. *Eur J Plant Pathol* **160**, 867–882.
- Xie FL, Xiao P, Chen DL, Xu L, Zhang BH** (2012). miR-DeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol* **80**, 75–84.
- Xu JX, Wang YL, Wang JJ, Tang W, Chen LJ, Long CL** (2012). Chemical constituents of *Cibotium barometz* and their bioactivities. *Nat Prod Res Dev* **24**, 134–140. (in Chinese)  
徐家星, 王业玲, 王建军, 唐雯, 陈丽娟, 龙春林 (2012). 濒危植物金毛狗的化学成分及其药理活性研究进展. *天然产物研究与开发* **24**, 134–140.
- You YF, Deng HP** (2012). Analysis of genetic diversity of the rare and endangered species *Cibotium barometz* by SRAP markers. *Acta Bot Boreali-Occident Sin* **32**, 688–692. (in Chinese)  
由永飞, 邓洪平 (2012). 珍稀濒危植物金毛狗的SRAP分析. *西北植物学报* **32**, 688–692.
- Zhang D, Li JJ, Zhang MJ, Bao YT, Yang X, Xu WY, Ouyang KX, Chen XY** (2018). Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis in *Neolamarckia cadamba*. *Chin Bull Bot* **53**, 829–839. (in Chinese with English abstract)  
张登, 李景剑, 张梦洁, 包钰韬, 杨霄, 徐武云, 欧阳昆晞, 陈晓阳 (2018). 黄梁木实时荧光定量PCR分析中内参基因的选择. *植物学报* **53**, 829–839.
- Zhang ZH, Wang YJ, Gao T, Tang ZZ, Zhou LJ, Chen T, Feng SL, Ding CB, Yuan S, Yuan M** (2023). Basic characterization and Alzheimer's disease relieving property of a glucose riched polysaccharide from *Cibotium barometz*. *Arab J Chem* **16**, 104597.
- Zhao Y, Lin L, Wang Q, Zhang GZ, Wang J, Shang LX, Hong SD, Ma QQ, Gu CH** (2023). Screening and validation of reference genes in *Heimia myrtifolia* in different tissues and under drought stress. *J Zhejiang A&F Univ* **40**, 665–672. (in Chinese)  
赵雨, 林琳, 王群, 张国哲, 王杰, 尚林雪, 洪思丹, 马清清, 顾翠花 (2023). 不同组织及干旱胁迫下黄薇内参基因的筛选与验证. *浙江农林大学学报* **40**, 665–672.
- Zheng QW, Li GG, Wang HY, Zhou ZQ** (2023). The rela-

tionship between ethylene-induced autophagy and reactive oxygen species in *Arabidopsis* root cells during the early stages of waterlogging stress. *PeerJ* 11, e15404.

Zhu ZP, Yu JX, Guo YX, Liu FF, Kang YJ, Sun M (2025). Research progress of plant reference genes in response to abiotic stress. *Mol Plant Breed*. 2025.05.08. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20241227.1522.004>. (in Chinese)

朱志鹏, 虞健翔, 郭瑶仙, 刘方方, 康贻军, 孙森 (2025). 非生物胁迫下植物内参基因的研究进展. *分子植物育种*. 2025.05.08. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20241227.1522.004>.

cnki.net/urlid/46.1068.S.20241227.1522.004. (in Chinese)

## Identification and Evaluation of Reference Genes for Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction in *Cibotium barometz*

Zhaoxuan Zhong<sup>1,2</sup>, Shaorong Zhou<sup>1</sup>, Meng Tang<sup>1</sup>, Lijun Chen<sup>1</sup>  
Yuehong Yan<sup>1</sup>, Ying Chang<sup>2\*</sup>, Fengpan Wang<sup>1\*</sup>

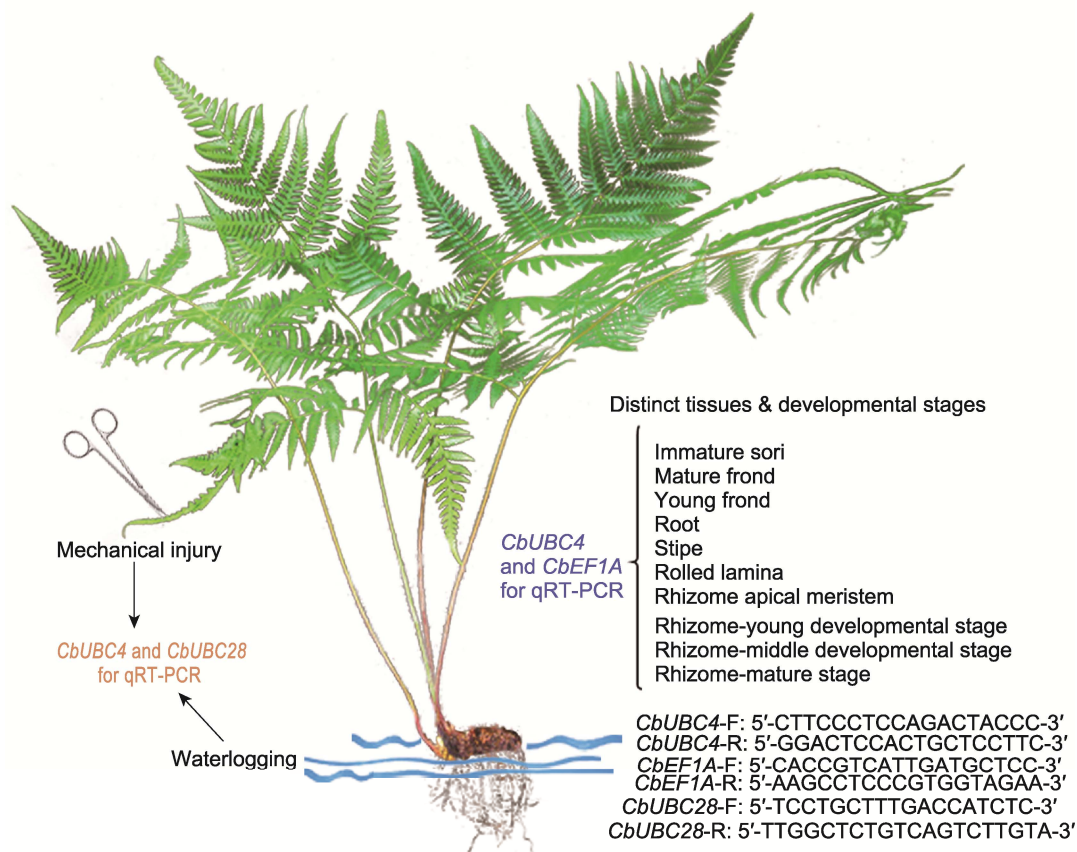
<sup>1</sup>Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration for Orchid Conservation and Utilization, The Orchid Conservation and Research Center of Shenzhen, Shenzhen 518114, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**INTRODUCTION:** *Cibotium barometz* is a medicinal fern species with high economic value, and Chinese people produce the traditional medicinal herb “Gou-ji” using its robust rhizome. To balance the conservation of wild plant resources with the sustainable development of herbal medicine, much more effort is needed in scientific research on *C. barometz*, which might be crucial to mitigate conflicts between wild resource protection and the development of the traditional medicine industry. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) is a commonly used method for characterizing plant gene molecular function, and an appropriate reference gene is pivotal for this technique. Currently, limited literature focuses on the gene function studies for *C. barometz*, and few validated reference genes are available.

**RATIONALE:** Previous studies have demonstrated that the expression stability of reference genes is influenced by multiple factors, including species, tissue type, developmental stage, stress treatment, and sequence specificity. Consequently, distinct reference genes are required for different research subjects. When employing qRT-PCR to analyze gene expression patterns in *C. barometz* tissues, it is essential to prevalidate the stability of reference genes within the novel experimental system. This validation process ensures the accuracy and reliability of the experimental results by maintaining proper data normalization.

**RESULTS:** In this study, 12 commonly used plant reference genes were identified as candidate genes from transcriptome data of *C. barometz* rhizome. The amplification efficiency of candidate reference genes was calculated by the template gradient dilution method, and eight pairs of reference gene primers with high amplification efficiency were screened out. The cycle threshold values of these eight reference genes in ten tissues of *C. barometz* were measured using the qRT-PCR method; the software RefFinder and Normfinder determined that the best reference genes were *CbUBC4* and *CbEF1A*, respectively. Studying the gene expression patterns of *C. barometz* at different developmental stages, it was suggested that *CbEF1A* and *CbUBC4* should be used as optimal reference genes. The reference genes *CbUBC4* and *CbUBC28* were recommended under mechanical injury and waterlogging conditions.

**CONCLUSION:** *CbUBC4*, *CbEF1A* and *CbUBC28* were validated as stable reference genes in *C. barometz* across distinct experimental contexts, demonstrating their suitability for normalization in gene expression studies for qRT-PCR assays. From a methodological rigor perspective, we recommended that the stability of reference genes should be evaluated prior to conducting qRT-PCR experiments, particularly when analyzing samples from diverse tissues or distinct developmental stages of a specific tissue.



**Identification and evaluation of reference genes in *Cibotium barometz* across distinct experimental contexts for qRT-PCR assay.** *CbUBC4* and *CbEF1A* were validated as proper reference genes in various tissues and in the different developmental stages of *C. barometz*, while *CbUBC4* and *CbUBC28* were recommended under mechanical injury and waterlogging conditions.

**Key words** *Cibotium barometz*, different tissues, reference gene, rhizome, stability

**Zhong ZX, Zhou SR, Tang M, Chen LJ, Yan YH, Chang Y, Wang FP** (2026). Identification and evaluation of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Cibotium barometz*. *Chin Bull Bot* **61**, 300–312.

\* Authors for correspondence. E-mail: changying@neau.edu.cn; duibian@126.com

(责任编辑: 白羽红)

### 通讯作者简介

**王凤攀**, 博士, 助理研究员。主要从事药用蕨类植物资源收集、保护、繁育和产业化利用等工作, 驯化和改良栽培药用蕨类植物, 重点围绕金毛狗属植物开展繁育生物学、发育生物学、分子生物学和栽培生物学等基础和应用研究。主持广东省自然科学基金区域联合青年项目和中国科学院庐山植物园植物专项各 1 项。发表学术论文 10 余篇, 参编专著 1 部。

**常纓**, 二级教授, 博士生导师。寒地药用植物开发与利用 B 类学科创新团队带头人, 中国野生植物保护协会蕨类植物分会副会长。主要从事寒地药用植物资源的开发与利用研究。主持国家自然科学基金及省部级项目 15 项。发表学术论文 80 余篇, 主编或参编国家级教材 7 部。