

# 菜豆黄单胞菌侵染下木薯内参基因筛选与评价

李慈云<sup>1,2#</sup>, 杨静<sup>2</sup>, 卢东莹<sup>2</sup>, 杨健飞<sup>2</sup>, 杨琦<sup>2</sup>,  
王菲<sup>1</sup>, 陈银华<sup>2</sup>, 牛晓磊<sup>1\*</sup>

(1. 海南大学南繁学院, 海南 三亚 572025 中国; 2. 海南大学热带农林学院, 海南 儋州 571737 中国)

**摘要:** 为筛选出菜豆黄单胞菌(*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, *Xpm*)侵染木薯(*Manihot esculenta*)叶片后稳定表达的内参基因, 确保后续基因功能研究的可靠性, 以木薯抗病品种‘JG1301’和感病品种‘SC9’叶片为研究材料, 在病原菌侵染后 0、6、12、24、72 和 120 h 时采样, 对常用内参基因 *Nascent*、*EF1a*、*ACT*、*GTPb*、*TUB* 在接种不同时间点后的稳定性进行分析。结果表明, 在 *Xpm* 侵染抗病品种‘JG1301’和感病品种‘SC9’木薯叶片后, 5 个内参基因表达量变化均有差异; 使用 Delta Ct、GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件对这些内参基因稳定性进行排序, 并结合 RefFinder 软件进行各内参基因稳定性的综合排名, 结果发现, *Xpm* 侵染木薯叶片后表达最稳定的内参基因为 *EF1a*。本研究筛选出了 *Xpm* 侵染木薯叶片后表达稳定的内参基因, 为木薯响应 *Xpm* 基因表达和抗病基因的进一步挖掘奠定了基础。

**关键词:** 木薯细菌性枯萎病; 木薯; 内参基因; qRT-PCR

中图分类号: S476 文献标志码: A 文章编号: 1674–7054(2026)02–0215–08

李慈云, 杨静, 卢东莹, 等. 菜豆黄单胞菌侵染下木薯内参基因筛选与评价[J]. 热带生物学报(中英文), 2026, 17(2): 215–222. DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.20240201 CSTR: 32425.14.j.cnki.rds wxb.20240201



实时荧光定量 PCR(reverse transcription quantitative real-time PCR, qRT-PCR)是基因表达研究中最准确、最可靠的技术之一<sup>[1-2]</sup>。该方法通过荧光信号测定 PCR 循环扩增产物总量, 并利用内参基因作为参考对特定 cDNA 序列进行定量分析<sup>[3-4]</sup>。qRT-PCR 常用于检测基因在不同处理、不同生长发育时期的表达量变化, 而内参基因的稳定性决定了检测基因表达量变化的准确性。因此, 使用稳定表达的内参基因对目的基因表达水平的标准化至关重要<sup>[5]</sup>。好的内参基因参与细胞的基础代谢功能, 并在整个过程中保持稳定表达, 不受外部条件改变的影响<sup>[6-7]</sup>。然而, 基因在生物体中不同组织和不同环境下行使功能的差异会导致没有任何一个内参基因能够在所有条件下都恒定表达<sup>[8]</sup>。因此, 应根据具体的实验条件筛选出表达量相对稳定的内参基因来对靶标基因的表达进

行分析, 从而获得可靠的试验结果。

木薯(*Manihot esculenta*), 是大戟科(Euphorbiaceae)木薯属植物, 与马铃薯(*Solanum tuberosum*)、红薯(*Ipomoea batatas*)并列为世界重要的薯类作物, 被誉为“地下粮仓”和“淀粉之王”<sup>[9-11]</sup>。木薯具有多种优良特性, 如耐瘠、耐旱、适应性强、管理粗放、容易栽培和淀粉含量高等特点<sup>[12]</sup>; 块根淀粉含量丰富且种植易成活的优势, 使其成为了热带地区低收入国家的主要人类粮食<sup>[13]</sup>。木薯还能作为乙醇的主要生产原料, 也可以用以制作沼气、纺织、医疗药品等<sup>[13-14]</sup>。但病害是制约木薯产业健康、持续发展的重要因素之一。世界范围内, 危害木薯生产的病害高达 30 多种, 其中木薯细菌性枯萎病(cassava bacterial blight, CBB)的危害尤其严重<sup>[15]</sup>。CBB 是由菜豆黄单胞菌木薯萎蔫致病变种(*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*,



收稿日期: 2024-12-30

修回日期: 2025-02-16

基金项目: 海南省国际科技合作研发项目(GHYF2022005); 海南省高等学校教育教学改革研究重点项目(Hnjg2019ZD-2)

\*第一作者: 李慈云(2000—), 女, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: 1695841062@qq.com

\*通信作者: 牛晓磊(1979—), 男, 副教授, 博士生导师。研究方向: 作物遗传育种。E-mail: ninterxll@hainanu.edu.cn

*Xpm*)引起的检疫性病害,导致木薯严重减产甚至绝收<sup>[16-17]</sup>。尽管对 CBB 的研究已取得一定进展,但相关研究大多停留在生理水平,其在分子层面上的抗病机制仍有待进一步阐明。目前,尚未有木薯在 *Xpm* 侵染条件下稳定表达内参基因的研究报道,因此,筛选在 *Xpm* 侵染木薯过程中稳定表达的内参基因是研究木薯响应细菌性枯萎病相关功能基因定量表达准确性的关键因素,可为木薯抗病分子育种基因功能研究提供衡量基因表达水平的标尺。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验材料** 木薯抗病品种‘JG1301’、感病品种‘SC9’和菜豆黄单胞菌 *Xpm* 均由海南大学热带农林学院热带作物与微生物互作团队提供。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 木薯样品采集** 随机选择生长良好、高度和长势一致的 3 株生长 45 d 的木薯‘JG1301’和‘SC9’,采用叶片注射法接种病原菌 *Xpm*,每个品种接种 3 株,每株接种 3 个掌叶,每片掌叶接种 2 个复叶;接种后分别于 0、6、12、72 和 120 h 采取叶片,每个时间点从 3 株木薯各采 1 复叶(3 次重复),采集后放入离心管中,液氮速冻后,-80 °C 保

存备用。

### 1.2.2 植物组织总 RNA 提取及 cDNA 的合成

使用天根 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(DP432)按照说明书方法进行木薯叶片总 RNA 的提取。用微型分光光度计(Nano-300 Micro-Spectrophotometer)检测 RNA 浓度和质量。通过 1.0% 琼脂凝胶电泳检测 RNA 完整度。采用天根 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂(KR118),按照说明书方法进行反转录,使用 1 μg 总 RNA 建立 20 μL cDNA 逆转录反应体系。反转录后的 cDNA 于-80 °C 冰箱保存备用。

**1.2.3 内参基因的选择及引物的设计** 根据文献 [15, 18-22] 查找木薯研究中 qRT-PCR 实验常用的内参基因,并最终筛选出实验所需要的 5 个内参基因,分别为 *TUB*、*Nascent*、*GTPb*、*ACT* 和 *EF1a*;通过在 Phytozome 数据库中查询基因序列,确定各候选基因的 CDS 序列,根据基因的 CDS 序列使用在线工具 Primer3 web(<https://primer3.ut.ee/>)进行引物设计;通过 Phytozome Blast 鉴定引物特异性后,送北京擎科生物科技股份有限公司进行引物合成,引物序列见表 1。

表 1 内参基因及其对应的引物

Tab. 1 Reference genes and their corresponding primers

基因符号 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	基因登录号 Accession No.	扩增长度/bp Length	引物扩增效率/% Efficiency	决定系数 $R^2$ Correlation $R^2$	参考文献 References
<i>TUB</i>	F: gttgaggaaactgttctgga R: tgcactcatctgcattctcc	Manes.08G061700	180	105.5	0.997	[15]
<i>Nascent</i>	F: tttgaaagtctgctgcagagg R: tgaagcggatctgaacaacc	Manes.09G005100	192	100.7	0.997	[18]
<i>GTPb</i>	F: ggtggtaacaaggcagaca R: tgagtcggatctgcaagcc	Manes.09G086600	169	102.4	0.993	[19]
<i>ACT</i>	F: ttcgtcaaggtgctgtga R: gccctctcatttctgcaat	Manes.13G086400	149	106.7	0.999	[20]
<i>EF1a</i>	F: tgaaccaccctggtcagattgaa R: aacttggctccttctcaagctct	Manes.15G054800	139	109.4	0.998	[21 - 22]

**1.2.4 内参基因引物标准曲线的建立** 对每一对内参基因引物制作对应的标准曲线,计算相应引物的扩增效率。以 ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照,用于检测实验过程中的试剂或者人为污染。所有样品重复 3 次。采用耶拿荧光定量 PCR qTOWER384G (Analytik Jena)进行 qRT-PCR 实验,根据测定的 *Ct* 值和对应的不同稀释梯度模板浓度经线性回归(其斜率值即为 slope),计算得各候选基因的引物

扩增效率( $E=10^{-1/slope}$ )及决定系数  $R^2$ 。

**1.2.5 荧光实时定量 PCR** 采用耶拿荧光定量 PCR qTOWER384G (Analytik Jena)进行 qRT-PCR 实验,每个反应均包含正向和反向引物各 2 μL (10 μmol·L<sup>-1</sup>),不同稀释倍数的 cDNA 模板 5 μL (20 ng·μL<sup>-1</sup>), 10 μL 2× SYBR Greenq PCR Mix (2× SYBR Green qPCR Mix, 思科捷),加 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL 反应体系。每个反应体系进行 3 次重复。

qRT-PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 随后进行 94 °C 变性 10 s, 60 °C 延伸 34 s, 循环 40 次的二步法程序。在每个实验结束时, 使用默认参数在 60 ~ 94 °C 以 0.3 °C 的增量持续 60 s 的周期进行熔解曲线分析。

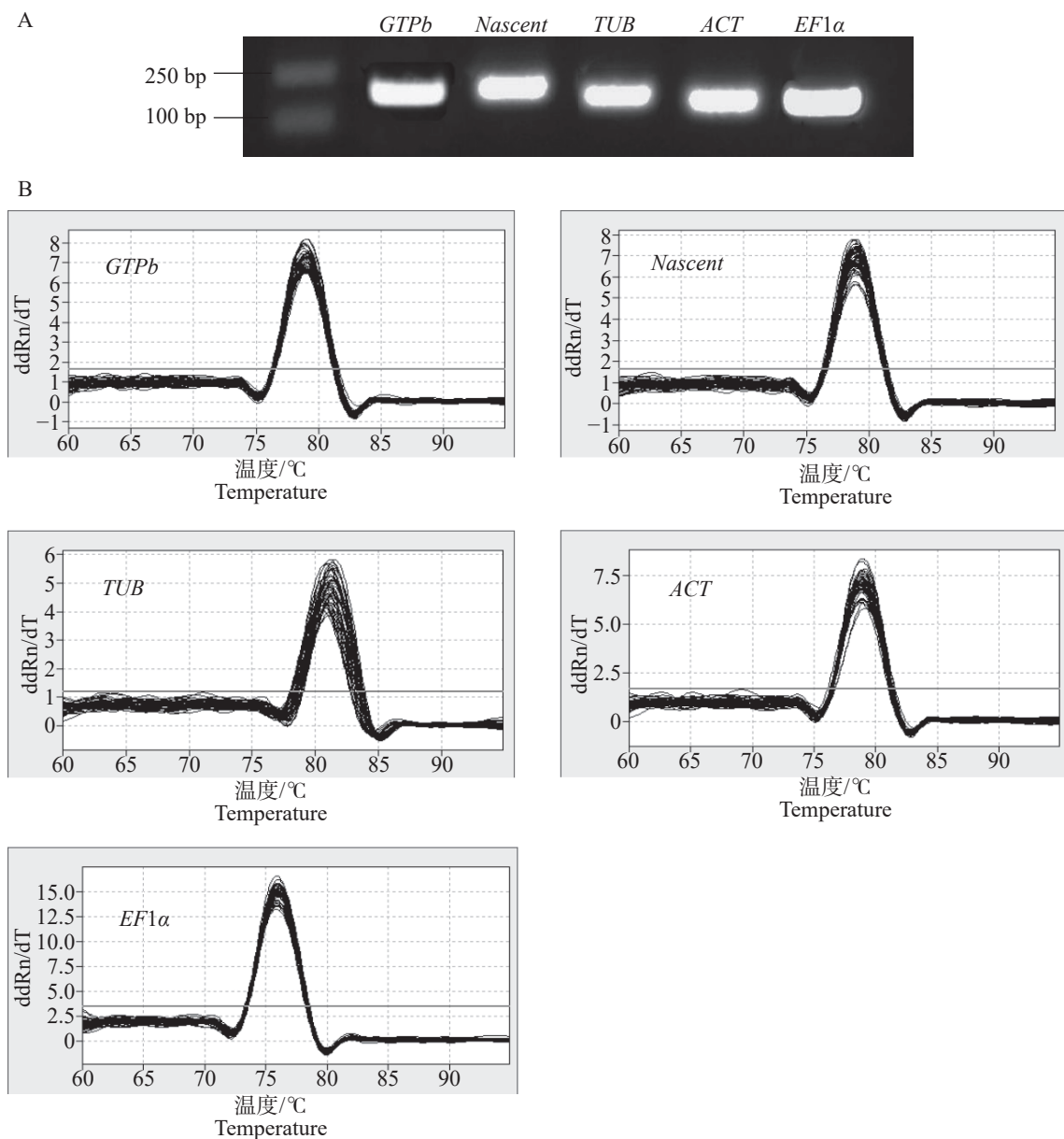
## 2 结果与分析

### 2.1 内参基因引物检测

以 *Xpm* 侵染木薯 ‘JG1301’ 和 ‘SC9’ 叶片不同时间点 cDNA 等量混合作为模板, 进行普通 PCR 扩增。利用 PCR 对内参基因引物特异性进行检测, 在 2%(w) 琼脂糖凝胶

电泳中, 内参基因扩增产物在 100 ~ 250 bp 间, 且目标条带单一, 无非特异性条带和引物二聚体, 扩增片段条带大小符合预期 (图 1-A)。以 *Xpm* 侵染木薯 ‘JG1301’ 和 ‘SC9’ 叶片后不同时间点的 cDNA 为模板, 经过 qRT-PCR 扩增后, 对候选扩增片段的溶解曲线进行分析, 结果表明, 所选择的 5 个木薯候选内参基因引物特异性好, 无杂峰, 可用于后续内参基因稳定性研究 (图 1-B)。

通过 5 个木薯候选内参基因引物的标准曲线得到引物的扩增效率和决定系数, 结果表明, 所选择的 5 个木薯候选内参基因荧光定量引物扩增效



A. 内参基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测; B. 5 个候选内参基因 qRT-PCR 溶解曲线。

A. Detection of internal reference gene PCR products by agarose gel electrophoresis; B. Melting curve analysis of five candidate.

图 1 内参基因引物检测

Fig. 1 Reference gene primer detection

率在 100.7%~109.4%, 扩增效率最高的基因是 *EF1 $\alpha$* , 引物扩增效率为 109.4%, 引物扩增效率最低的是 *Nascent* 基因, 扩增效率为 100.7%。5 个引物的决定系数  $R^2$  在 0.993~0.999 间, 决定系数最高的基因是 *ACT* 基因, 决定系数为 0.999, 决定系数最低的是 *GTPb* 基因, 决定系数为 0.993(表 1)。

**2.2 内参基因表达丰度分析** 对 5 对木薯内参基因引物以 *Xpm* 侵染抗病品种‘JG1301’和感病品种‘SC9’木薯叶片后不同时间点的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 实验, 通过检测其表达量得到对应的 *Ct* 值。*Ct* 值与基因的表达丰度成反比, *Ct* 值越大, 基因的表达丰度越低, 反之 *Ct* 值越小, 则基因的表达丰度越高。从图 2 可知, 5 个木薯候选内参基因中表达丰度最高的基因是 *EF1 $\alpha$* , *Ct* 值在样本检测中为 18.46~22.48; 表达丰度最低的基因是 *TUB*, *Ct* 值在样本检测中为 22.30~26.89。

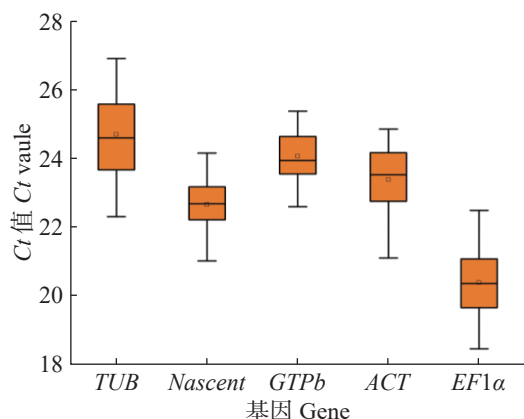


图 2 5 个候选内参基因 *Ct* 值分布

Fig. 2 *Ct* value distribution of five candidate reference genes

注: 横跨该框的线表示中位数。箱部上方-上四分位数, 箱部下方-下四分位数, 上下误差线表示最大值和最小值。

Note: The line across the box represents the median. Upper part of the box-upper quartile, lower part of the box-lower quartile. The upper and lower error bars indicate the maximum and minimum values.

## 2.3 基因表达稳定性分析

**2.3.1 Delta Ct 分析** Delta Ct 算法是用平均标准差( $mSD$ )来评价内参基因的稳定性。 $mSD$  值的大小能够反映内参基因的稳定性, 数值越小代表内参基因越稳定, 越大则越不稳定。通过 Delta Ct 方法计算 5 个木薯候选内参基因的稳定性可知, 5 个候选内参基因的  $mSD$  排序为  $TUB > EF1\alpha > ACT > GTPb > Nascent$ , 其中  $mSD$  最大的是 *TUB*, 其  $mSD$  为 1.18;  $mSD$  最小的是 *GTPb*, 其  $mSD$  为 0.75, 表明稳定性最好的是 *Nascent* 基因, 稳定

性最差的是 *TUB* 基因(表 2)。

表 2 Delta Ct 软件分析结果

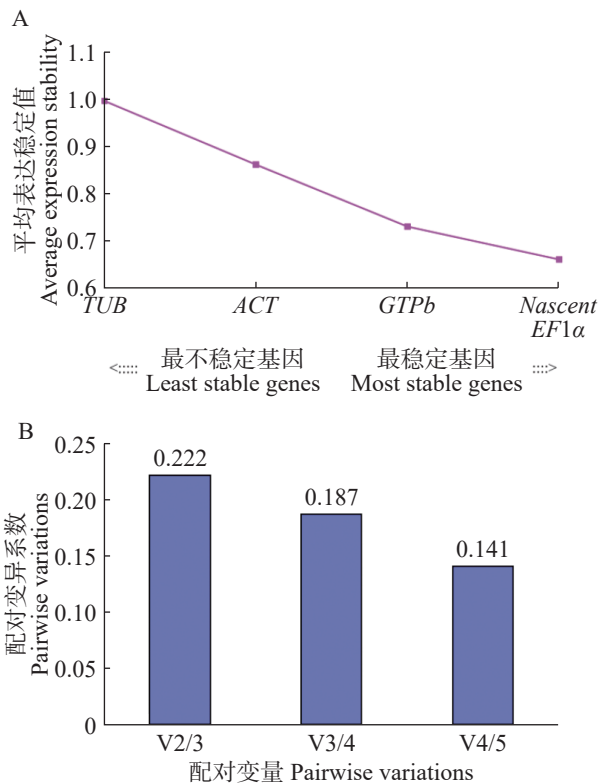
Tab. 2 Results of Delta Ct Software

基因 Gene	平均标准差 $mSD$	排名 Ranking
<i>Nascent</i>	0.75	1
<i>GTPb</i>	0.77	2
<i>ACT</i>	0.92	3
<i>EF1<math>\alpha</math></i>	1.00	4
<i>TUB</i>	1.18	5

**2.3.2 GeNorm 分析** GeNorm 程序是根据平均变异度  $M$  值来衡量基因的稳定性, 程序默认的取舍值为 1.5, 当  $M$  值 < 1.5 时, 基因被认为相对稳定,  $M$  值越低则表示基因越稳定。该程序采用成对比较法(pairwise comparison approach)计算出基因表达稳定性的  $M$  值, 根据 GeNorm 默认变异系数( $Vn/Vn+1$ )的值来确认最优的内参基因数目。当  $Vn/Vn+1 < 0.15$  时, 则认为最佳的内参基因数为  $n$  个, 若  $Vn/Vn+1 > 0.15$  还可引入 1 个新的内参基因后计算标准化因子的平均配对变异  $V$  值, 并根据  $Vn/Vn+1$  值来确定所需最适内参基因数目。

如图 3 所示, 5 个木薯内参候选基因的  $M$  值都小于 1.5(图 3-A), 但是表达稳定性有较大差异,  $M$  值排序为  $TUB > ACT > GTPb > EF1\alpha = Nascent$ , 其中,  $M$  值最大的是 *ACT*,  $M$  值为 1.00,  $M$  值最小的是 *EF1 $\alpha$*  和 *Nascent*,  $M$  值为 0.66, 说明稳定性最好的是 *EF1 $\alpha$*  和 *Nascent*, 稳定性最差的是 *TUB*。其中,  $V4/5$  配对变异系数为  $0.141 < 0.15$ (图 3-B), 说明最适的内参基因数 4 个, 不需要引入第 5 个基因进行校准。因此, 本实验中最优基因数组合为 4 个, 即 *EF1 $\alpha$* 、*Nascent*、*GTPb* 和 *ACT*。

**2.3.3 NormFinder 分析** 该程序基于模型分析, 获得内参基因的表达稳定值, 再根据稳定值大小来筛选出最合适的内参基因。NormFinder 程序根据候选内参基因的稳定值进行评价, 稳定值越高表示稳定性越差, 稳定值最小的基因, 则为最稳定的基因。结果表明 5 个木薯候选内参基因的稳定值排序为  $TUB > ACT > Nascent > GTPb > EF1\alpha$ , 其中稳定值最大的是 *TUB*, 稳定值为 0.714; 稳定值最小的是 *EF1 $\alpha$* , 稳定值为 0.348, 说明稳定性最好的是 *EF1 $\alpha$*  基因, 稳定性最差的是 *TUB* 基因(表 3)。



A. 内参基因稳定性; B. 配对变异分析。  
A. Reference gene stability; B. Pairwise variation analysis.

图 3 Genorm 分析  
Fig. 3 Genorm analysis

表 3 Normfinder 软件分析结果

Tab. 3 Results of Normfinder Software

基因 Gene	稳定值 Stable value	排名 Ranking
<i>EF1a</i>	0.348	1
<i>GTPb</i>	0.381	2
<i>Nascent</i>	0.444	3
<i>ACT</i>	0.520	4
<i>TUB</i>	0.714	5

**2.3.4 BestKeeper 分析** BestKeeper 程序以内参基因 *Ct* 值的标准差(*SD*)来衡量基因的表达稳定性, *SD* 值越小, 表达越稳定, *SD* 临界值默认为 1, 当 *SD* 值>1 时, 说明该基因表达不稳定。采用重复配对相关分析和回归分析, 通过计算 *Ct* 值的标准偏差(*SD*)来确定稳定性较好的内参基因。结果表明, 5 个木薯候选内参的 *SD* 值均小于 1, *SD* 值排序为 *TUB* > *EF1a* > *ACT* > *GTPb* > *Nascent*, 其中 *SD* 值最大的是 *TUB*, *SD* 值为 0.97; *SD* 值最小的是 *Nascent*, *SD* 值为 0.61, 说明稳定性最好的是 *Nascent*, 稳定性最差的是 *TUB*(表 4)。

表 4 Bestkeeper 软件分析结果

Tab. 4 Results of BesKeeper Software

参数 Parameter	基因 Gene				
	<i>TUB</i>	<i>Nascent</i>	<i>GTPb</i>	<i>ACT</i>	<i>EF1a</i>
几何平均值[CP]	24.65	22.64	24.044	23.36	20.37
geo Mean [CP]	24.68	22.65	24.05	23.38	20.39
算术平均值[CP]	22.30	21.02	22.59	21.1	18.46
ar Mean [CP]	26.89	24.15	25.36	24.84	22.48
最小值[CP]	0.97	0.61	0.66	0.75	0.78
min [CP]	3.91	2.68	2.73	3.21	3.84
最大值[CP]	1.95	1.52	1.58	1.68	1.72
max [CP]					
标准差[± CP]					
SD [± CP]					
变异系数[% CP]					
CV [% CP]					
调节系数标准差[± x-fold]					
std dev [± x-fold]					

**2.3.5 RefFinder 分析** RefFinder 在线软件可以对上述 4 种算法分析所得到的结果进行综合排序, 赋予每个候选内参基因一个适当的权重, 然后计算出其几何平均值, 通过赋分综合排名, 得分越低越稳定, 筛选出表现最稳定的内参基因。结果显示 RefFinder 综合以上 4 种算法计算出来的稳定值排序为 *TUB* > *ACT* > *GTPb* > *Nascent* > *EF1a*, 其中稳定值最大的是 *TUB*, 稳定值为 5.00; 稳定值最小的是 *EF1a*, 稳定值为 1.41, 说明稳定性最好的是 *EF1a* 基因, 稳定性最差的是 *TUB* 基因(表 5)。

表 5 RefFinder 分析结果

Tab. 5 Results of RefFinder Software

基因 Gene	稳定值 Stable value	排名 Ranking
<i>EF1a</i>	1.41	1
<i>Nascent</i>	1.73	2
<i>GTPb</i>	2.21	3
<i>ACT</i>	3.72	4
<i>TUB</i>	5.00	5

### 3 讨论

木薯种植和生产领域中, CBB 是目前最为严重的木薯病害之一, 根据种植环境条件的不同, 引起的损失至高达 100%。因此, 充分挖掘木薯抗病基因已成为木薯产业亟待解决的问题之一, 而选择稳定的内参基因是木薯抗病基因挖掘的基

础。木薯中稳定的内参基因筛选已有部分报道,如 Moreno 等<sup>[19]</sup>研究了 5 对内参基因在木薯褐条病毒侵染木薯品种‘TMS60444’‘Ebwatneraka’和‘AR34’叶片中的稳定性,发现 *GTPb* 基因在感染木薯褐条病的条件下表达最稳定。Hu 等<sup>[18]</sup>研究了 26 对内参基因在木薯‘Ku50’‘SC124’‘Rongyong9’‘SC5’和‘Arg7’等品种中不同发育时期的叶片、块根、叶柄及花及干旱胁迫下的不同时间点叶片合计 21 个样本中的内参稳定性,发现 *Nascent* 基因在绝大多数情况下都稳定表达<sup>[18]</sup>。在哥伦比亚 *Xpm* 生理小种 UA681 和 CFBP1851 侵染感病木薯品种 60444 后受诱导表达的木薯基因功能研究中,Carlos 等<sup>[15]</sup>使用 *TUB* 基因作为内参基因,本研究所使用的 *Xpm* 生理小种 CHN 01 是在海南省分离得到的,将 *TUB* 作为候选内参基因研究 *Xpm* 生理小种 CHN 01 侵染木薯下 *TUB* 在木薯中表达是否稳定<sup>[23]</sup>。*ACT* 基因被认为是在拟南芥抗病研究中最稳定的内参基因<sup>[20]</sup>,本研究选择了序列相似度最高的木薯直系同源基因(Manes.13G086400, *ACT*)作为候选内参基因。*EF1α* 基因也被用于 CBB 抗病基因筛选的内参基因使用<sup>[21-22]</sup>。

目前,木薯黄单胞菌侵染后的木薯内参基因稳定性研究较少,因此选择了上述 5 对文献报道的木薯基因 *GTPb*、*Nascent*、*TUB*、*ACT*、*EF1α* 作为后续内参基因。本研究采用了 Delta Ct、Genorm、NormFinder、BestKeeper 以及在线软件 Reffinder 对所选用的 5 对内参基因在木薯抗感品种(‘JG1301’和‘SC9’)不同接种时间点进行了稳定性打分,进一步筛选出在 *Xpm* 侵染木薯的条件下仍然能稳定表达的内参基因。结果表明,qRT-PCR 数据显示 5 个候选内参基因都有不同幅度的变化,研究发现,*Nascent* 基因在木薯不受外界胁迫的情况下可以稳定表达,但是在干旱胁迫下表达不稳定<sup>[18]</sup>,结合 *Nascent* 基因在 *Xpm* 侵染木薯叶片后在木薯叶片中稳定性排名第 2,说明外界生物与非生物胁迫影响了 *Nascent* 基因的表达量。*GTPb* 基因在 *Xpm* 侵染木薯叶片后表达稳定性综合排名第 3,而在木薯褐条病毒侵染木薯条件下较为稳定<sup>[19]</sup>,可能因为褐条病毒侵染机理与 *Xpm* 作为维管束病害的侵染机制不同,造成了 *GTPb* 基因在不同生物胁迫条件下的表达量变化差异。

Carlos 在木薯抗病基因研究中使用了 *TUB* 作

为内参基因,同时 Wei 等<sup>[24]</sup>在进行木薯耐盐研究中也使用 *TUB* 作为内参基因。Tong 等<sup>[25]</sup>研究发现,*TUB* 基因在桃的不同组织中表达稳定,Zhong 等<sup>[26]</sup>研究发现 *TUB* 基因在荔枝的不同组织和遮光处理下都能稳定表达,但是 Nicot 等<sup>[27]</sup>的研究表明,*TUB* 在马铃薯侵染晚疫病和冷胁迫实验中表达量不稳定。本研究结果表明,*TUB* 在 *Xpm* 侵染木薯后稳定性最差,说明 *TUB* 在木薯受到病原菌胁迫时表达不稳定。

*ACT* 基因能在栎树的不同组织中稳定<sup>[28]</sup>,*ACT* 也能在百合花不同发育时期和不同组织中稳定表达<sup>[29]</sup>,但 Nicot 等<sup>[27]</sup>研究发现,在马铃薯侵染晚疫病和盐处理下 *ACT* 基因在马铃薯叶片中表达最不稳定,Li 等<sup>[30]</sup>在甘薯内参基因筛选实验中发现,在病毒感染和非病毒感染的条件下甘薯叶片中的 *ACT* 基因表达量不稳定。本研究发现,*Xpm* 侵染木薯叶片后 *ACT* 基因在木薯叶片中表达不稳定,说明 *ACT* 基因虽然在多种植物中被广泛用作内参基因,但是不适合在部分薯类作物中当作内参基因。

Chang 等<sup>[21]</sup>和 Zheng 等<sup>[22]</sup>在进行 CBB 研究时均使用 *EF1α* 作为内参基因;Nicot 等<sup>[27]</sup>研究发现,在马铃薯晚疫病侵染下和冷胁迫下马铃薯叶片中表达最稳定的内参基因是 *EF1α*。Mascia 等<sup>[31]</sup>研究发现,*EF1α* 基因在菊苣叶片和根组织中的表达稳定性最高。唐枝娟等<sup>[32]</sup>研究发现,强弱致病力的白叶枯病菌 PXO99 和 PXO61 侵染下的水稻 *EF1α* 基因表达最稳定。本研究结果也表明,在 *Xpm* 侵染下,木薯 *EF1α* 基因在抗感木薯不同时间点表达量最为稳定。综合上述结果可知,在多种植物和多种外界胁迫下,*EF1α* 基因都能在植物叶片中稳定表达,可作为一个稳定的内参基因使用。本研究结果为木薯抗细菌性枯萎病相关抗病基因挖掘研究中稳定内参基因的使用奠定了理论基础

## 参考文献:

- [1] Nolan T, Hands R E, Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(3): 1559-1582. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>
- [2] Sowa S, Sozoniuk M, Toporowska J, et al. Validation of reference genes as an internal control for studying *Avena*

- sativa–*Puccinia coronata* interaction by RT-qPCR [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 14601. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18746-z>
- [3] Su B, Li Z, Liu H, et al. Identification and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in *Iris domestica* under Cd stress [J]. *Heliyon*, 2024, 10(17): e36923. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e36923>
- [4] Yang Y, Cao G, Tang L. Selection and validation of reference genes for qRT-PCR normalization in dayflower (*Commelina communis*) based on the transcriptome profiling [J]. *BMC Plant Biology*, 2024, 24(1): 1131–1143. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05853-4>
- [5] Vanguilder H D, Vrana K E, Freeman W M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis [J]. *BioTechniques*, 2008, 44(5): 619–626. <https://doi.org/10.2144/000112776>
- [6] Tang X, Zhang N, Si H, et al. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress [J]. *Plant Methods*, 2017, 13(1): 85. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0238-7>
- [7] Zhang J, He X, Zhou J, et al. Selection and verification of standardized reference genes of *Angelica dahurica* under various abiotic stresses by real-time quantitative PCR [J]. *Genes*, 2024, 15(1): 79–95. <https://doi.org/10.3390/genes15010079>
- [8] Jeong Y M, Mun J H, Lee I, et al. Distinct roles of the first introns on the expression of *Arabidopsis* profilin gene family members [J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(1): 196–209. <https://doi.org/10.1104/pp.105.071316>
- [9] 方佳, 濮文辉, 张慧坚. 国内外木薯产业发展近况 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(16): 353–361.
- [10] 梁露锋, 玉琼广, 刘洁. 木薯产业发展动态及展望前景 [J]. *大众科技*, 2011, 128(6): 128–130. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-1151.2011.06.057>
- [11] 严华兵, 叶剑秋, 李开绵. 中国木薯育种研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2015, 31(15): 63–70. <https://doi.org/10.11924/j.issn.1000-6850.casb14110159>
- [12] 刘佳, 张箭. 美洲木薯在非洲的引种和推广 [J]. *世界农业*, 2019, 14(2): 83–88.
- [13] 陈松笔, 蔡杰, 安飞飞, 等. 木薯育种现状及发展趋势 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2024, 54(10): 1833–1842.
- [14] Amelework A B, Bairu M W. Advances in genetic analysis and breeding of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): A review [J]. *Plants*, 2022, 11(12): 1617–1635. <https://doi.org/10.3390/plants11121617>
- [15] Carlos A Z-C, Cruz G D, Verdier V, et al. Cassava diseases caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* *cassavae* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(12): 1520–1537. <https://doi.org/10.1111/mpp.13094>
- [16] 李超萍, 时涛, 刘先宝, 等. 国内木薯病害普查及细菌性萎蔫病安全性评估 [J]. *热带作物学报*, 2011, 32(1): 116–121.
- [17] Carlota Z C, Moufid Y, López C E, et al. First report of cassava bacterial blight caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* in the amazonian forest of Ecuador [J]. *Plant Disease*, 2024, 108(6): 1879.
- [18] Hu M, Hu W, Xia Z, et al. Validation of reference genes for relative quantitative gene expression studies in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by using quantitative real-time PCR [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 680.
- [19] Moreno I, Gruitsem W, Vanderschuren H. Reference genes for reliable potyvirus quantitation in cassava and analysis of Cassava brown streak virus load in host varieties [J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 177(1): 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.06.013>
- [20] Czechowski T, Stitt M, Altmann T, et al. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(1): 5–17. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>
- [21] Chang Y, Bai Y, Wei Y, et al. CAMTA3 negatively regulates disease resistance through modulating immune response and extensive transcriptional reprogramming in cassava [J]. *Tree Physiology*, 2020, 40(11): 1520–1533. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa093>
- [22] Zheng L, Gao S, Bai Y, et al. NF - YC15 transcription factor activates ethylene biosynthesis and improves cassava disease resistance [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(9): 2424–2434. <https://doi.org/10.1111/pbi.14355>
- [23] Zhu S, Pan Y, Li K, et al. Complete genome sequence of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* strain CHN01, the causal agent of cassava bacterial blight [J]. *Plant Disease*, 2022, 106(3): 1039–1041. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-2016-A>
- [24] Wei Y, Shi H, Xia Z, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the WRKY gene family in cassava [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 25.
- [25] Tong Z, Gao Z, Wang F, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR [J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 71. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-71>
- [26] Zhong H Y, Chen J W, Li C Q, et al. Selection of reliable reference genes for expression studies by reverse transcription quantitative real-time PCR in litchi under different experimental conditions [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(4): 641–653. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0992-8>
- [27] Nicot N, Hausman J F, Hoffmann L, et al. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(421): 2907–2914. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>
- [28] Gao K, Khan Wu, Li J, et al. Identification and validation of reliable reference genes for gene expression stud-

- ies in *Koelreuteria paniculata* [J]. *Genes*, 2022, 13(5): 714–725. <https://doi.org/10.3390/genes13050714>
- [29] Li X, Cheng J, Zhang J, et al. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression in *Lilium davidii* var. *unicolor* for real time quantitative PCR [J]. *Plos One*, 2015, 10(10): 28–43.
- [30] Li G, Sun X, Zhu X, et al. Selection and validation of reference genes in virus-infected sweet potato plants [J]. *Genes*, 2023, 14(7): 1477–1488. <https://doi.org/10.3390/genes14071477>
- [31] Mascia T, Santovito E, Gallitelli D, et al. Evaluation of reference genes for quantitative reverse - transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(6): 805–816. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00646.x>
- [32] 唐枝娟, 刘秦, 肖晓蓉, 等. 白叶枯病菌感染下的水稻内参基因稳定性[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(1): 300–306.

## Screening and Evaluation of Reference Genes in Cassava upon Infection by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

Li Ciyun<sup>1,2#</sup>, Yang Jing<sup>2</sup>, Lu Dongying<sup>2</sup>, Yang Jianfei<sup>2</sup>, Yang Qi<sup>2</sup>,  
Wang Fei<sup>1</sup>, Chen Yinhua<sup>2</sup>, Niu Xiaolei<sup>1\*</sup>

(1. School of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 57205, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China)

**Abstract:** In order to screen for stable expression of cassava reference genes in cassava leaves infected with *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), we used *Xpm* resistant variety ‘G1301’ and susceptible variety ‘SC9’ cassava leaves as research materials. Samples were collected from cassava leaves of ‘G1301’ and ‘SC9’ at 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 72 h, and 120 h after *Xpm* infection, and the stability of the commonly used reference genes *Nascent*, *EF1a*, *ACT*, *GTPb*, and *TUB* was determined. The results showed that there were differences in the expression levels of five reference genes after *Xpm* infection in the leaves of ‘G1301’ and ‘SC9’. Delta CT, GeNorm, NormFinder, BestKeeper and RefFinder software were used to rank the stability of these candidate reference genes. We found that the most stable reference gene expressed in *Xpm*-infected leaves is *EF1a*. This study identified the stable internal reference genes expressed during *Xpm* infection in cassava leaves, laying the foundation for studying gene expression in response to *Xpm* infection and exploring disease resistance genes.

**Keywords:** cassava bacterial blight; *Manihot esculenta*; reference gene; qRT-PCR

(责任编辑: 潘学峰)