

• 药材与资源 •

天麻内参基因的系统筛选及天麻素合成途径基因的表达分析

苏慧君¹, 时娅森¹, 田芳³, 毛家婧¹, 罗鸣², 苗玉焕^{1,2}, 李晓华^{1,2}, 刘大会^{1,2*}, 苏威^{1,2*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065

3. 罗田县人民医院, 湖北 黄冈 438600

摘要: 目的 利用 RNA-Seq 数据筛选天麻 *Gastrodia elata* 稳定表达的通用内参基因, 并分析天麻素合成途径相关基因的表达模式, 为天麻分子生物学研究提供技术支撑。方法 收集了天麻剑麻阶段块茎、茎、花的转录组数据集, 以及接菌后 4 个不同发育时期的转录组数据集共 2 个 RNA-Seq 数据集。通过分别计算 2 个数据集的 Transcripts Per Million (TPM) 表达矩阵, 并采用 M 值结尾均值(trimmed mean of M-values, TMM)方法进行标准化, 获得最终的表达量文件 genes.TMM.TPM.matrix。以变异系数(coefficient of variation, CV)均小于 0.05 为阈值, 从 2 个表达量文件中共同筛选出稳定表达基因作为候选内参基因, 并基于本地 PrimerServer2 软件包设计特异性引物。利用实时荧光定量 PCR 分别检测候选基因在天麻块茎不同发育时期及组织部位的表达水平, 使用 delta-CT、geNorm、NormFinder、BestKeeper 及 RefFinder 软件进行稳定性综合评价。同时, 以筛选获得的最优内参基因分析天麻素合成途径上的 6 个关键酶基因的表达模式。结果 *Gelre1* 基因在不同组织部位及发育时期样品中表达最稳定, 可作为本研究条件下天麻 qRT-PCR 分析的适宜内参基因。以该基因为内参, 6 个天麻素合成途径关键酶基因在不同发育时期组织部位的表达模式存在明显差异, 其中多数基因在块茎发育中后期均高表达。结论 提出了一套基于 RNA-Seq 数据的天麻内参基因系统筛选流程, 为后续天麻素生物合成途径的分子机制研究及功能基因验证奠定了基础。

关键词: 天麻; RNA-Seq; 内参基因; 天麻素; 基因表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)18-7388-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.18.025

Systematic screening of reference genes and expression analysis of genes involved in gastrodin biosynthesis pathway in *Gastrodia elata*

SU Huijun¹, SHI Yasen¹, TIAN Fang¹, MAO Jiajing¹, LUO Ming², MIAO Yuhuan^{1,2}, LI Xiaohua^{1,2}, LIU Dahui^{1,2}, SU Wei^{1,2}

1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China

3. Peoples Hospital of Luotian County, Huanggang 438600, China

Abstract: Objective To screen stable reference genes in *Gastrodia elata* and analyze the expression patterns of key enzyme genes in the gastrodin biosynthesis pathway, providing reliable normalization tools for molecular studies of *G. elata*. **Methods** Two transcriptome datasets, encompassing various tissues (tubers, stems, and flowers) at the jian-ma stage and four developmental stages post-inoculation, were integrated. Expression matrices were constructed using Transcripts Per Million (TPM) and normalized via the TMM method. Candidate reference genes were screened based on a coefficient of variation (CV) threshold of < 0.05, and specific primers were designed using the PrimerServer2 package. The expression levels of these candidates across different tissues and developmental stages were validated by qRT-PCR. Stability was comprehensively evaluated using delta-Ct, geNorm, NormFinder, BestKeeper, and RefFinder. Furthermore, the identified optimal reference gene was used to normalize the expression of six key enzyme genes in the gastrodin biosynthesis pathway. **Results** *Gelre1* exhibited the highest stability across all samples, serving as a universal

收稿日期: 2026-02-03

基金项目: 湖北省中医药创新发展联合基金培育项目(2026AFC0923); 国家自然科学基金项目(32500333); 湖北省中医药管理局中医药创新团队项目(ZY2025J002); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302)

作者简介: 苏慧君, 硕士研究生, 研究方向为中药资源。E-mail: shj13545708117@163.com

*通信作者: 苏威, 讲师, 研究方向为中药资源及其品质研究。E-mail: suwei123@hbucm.edu.cn

刘大会, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源及其品质研究。E-mail: liudahui@hbucm.edu.cn

reference gene for various tissues and developmental stages of *G. elata*. Expression analysis revealed distinct patterns for the six key enzyme genes, with most showing high expression levels during the mid-to-late stages of tuber development. **Conclusion** This study establishes a systematic workflow for reference gene screening in *G. elata* based on RNA-Seq data, providing a reliable foundation for further research into the molecular mechanisms and functional validation of genes in gastrodin biosynthesis.

Key words: *Gastrodia elata* Blume; RNA-Seq; reference genes; gastrodin; gene expression

实时荧光定量 PCR (quantitative real time PCR, qRT-PCR) 技术是研究药用植物基因表达差异的重要手段, 具有灵敏度高、特异性强、重复性好等优点, 已广泛应用于中药活性成分生物合成途径的分子机制解析。然而, qRT-PCR 结果的准确性高度依赖于合适稳定的内参基因 (reference genes, RGs) 进行归一化。若内参基因表达不稳定, 将直接导致目的基因相对表达量的偏差^[1-3], 甚至得出错误结论。传统内参基因如肌动蛋白 (*Actin*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)、泛素结合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, *UBC*) 等虽被广泛使用, 但在不同物种、组织部位、发育时期或胁迫条件下往往表现出显著的表达变异, 无法满足所有实验需求^[4-6]。近年来, 随着 RNA-Seq 技术的快速发展, 利用大规模公共转录组数据系统筛选稳定表达基因已成为鉴定属内通用内参基因的有效策略。该方法可通过变异系数 (coefficient of variation, CV) 筛选稳定表达基因, 并基于 ortholog 共识序列设计跨物种通用引物, 具有客观、高效、广谱适用等优势^[7]。

天麻 *Gastrodia elata* Blume 为兰科天麻属多年生草本植物, 其块茎是著名中药材, 具有息风止痉、平肝潜阳的功效, 主治头痛眩晕、肢体麻木、小儿惊风等症^[8-9]。天麻素 (gastrodin) 是天麻的主要活性成分, 属于酚苷类化合物, 具有显著的神经保护^[10]和改善认知功能^[11]等临床疗效, 是天麻品质评价的核心指标。近年来, 研究者通过转录组和代谢组联合分析, 初步挖掘了天麻素生物合成途径中的部分关键酶基因 (如苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸 4-羟化酶、尿苷二磷酸葡萄糖转移酶等), 但这些基因的表达模式分析仍依赖传统内参基因, 缺乏系统、稳定的内参基因支撑, 导致不同研究间结果可比性较差^[12-14]。目前, 尚未见基于 RNA-Seq 大数据在天麻属内系统筛选通用内参基因的报道, 也缺乏以稳定内参基因为基础对天麻素合成途径关键酶基因进行全发育时期、不同组织部位表达模式的全面解析。

本研究以天麻不同组织部位及发育时期的 RNA-Seq 数据集为材料, 采用 edgeR 中的 M 值的

结尾均值 (trimmed mean of M-values, TMM) 方法进行标准化, 通过 CV 值筛选稳定表达基因, 结合 qRT-PCR 验证与 RefFinder 综合评价, 提出一套适用于天麻的内参基因筛选流程。同时, 利用筛选获得的最适内参基因, 系统分析天麻素合成途径关键酶基因在不同发育时期及组织部位的表达模式。该研究旨在为天麻分子生物学研究提供稳定可靠的内参基因, 并为阐明天麻素生物合成调控网络奠定基础。

1 材料和仪器

1.1 样品

本研究所用天麻种麻接种蜜环菌后 4 个不同发育时期 [0 d (记为 AB)、30 d (记为 BF1)、60 d (记为 SB1)、90 d (记为 SB2)] 和 3 个不同组织部位 (箭麻阶段的块茎、茎、花) 样本, 均来源于湖北省随州市洛阳镇, 经湖北中医药大学刘大会教授鉴定为兰科植物天麻 *G. elata* Blume。每个样本设置 3 个生物学重复。所有样本采集后立即液氮速冻, 保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

1.2 试剂与仪器

总 RNA 提取试剂盒 (SteadyPure 植物 RNA 提取试剂盒, 货号 AG21024), cDNA 合成试剂盒 (反转录预混型试剂盒, 货号 AG11728) 均购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; 荧光定量试剂盒 (2× Universal SYBR Green Fast qPCR Mix kit, 货号 RK21203) 购自武汉爱博泰克生物技术有限公司。

JXFSTPRP-64L 型组织研磨仪 (上海净信实业发展有限公司); NanoDrop One 型超微量分光光度计 (赛默飞世尔科技有限公司); DYY-6D 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); Archimed R4 型荧光定量 PCR 仪 (上海泽泉科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 天麻 RNA-Seq 数据的收集、质控与比对

本研究以国家生物信息中心 GSA 数据库的天麻不同组织部位 (PRJNA688757) 和本课题组所测天麻块茎不同发育时期的 RNA-Seq 数据作为原始分析数据, 主要分析流程如下: 使用 fasterq-dump 和 pigz 命令将 SRA 数据格式转换为 FASTQ 格式; 使

用 fastp 对原始 reads 进行过滤和质控, 去除接头和低质量 reads; 使用 hisat2-build 构建参考基因组 index, hisat2 将 clean reads 比对到天麻参考基因组, Samtools 将比对后的 sam 格式文件转换为体积更小的 bam 格式文件; 利用 FeatureCounts 统计各基因组的原始 read counts, 基于基因长度和测序深度计算 TPM (transcripts per million) 值, 用于评价基因表达丰度; 同时利用 edgeR 软件中的 TMM 方法对原始 counts 矩阵进行标准化处理, 获得最终的表达量文件 genes.TMM.TPM.matrix。

参考 Xie 等^[7]建立的基于 RNA-Seq 数据筛选属水平通用内参基因的方法, 结合本研究样本表达分布特征, 以 $\text{TPM} \geq 40$ 保证候选基因具有较高表达丰度, 以 $\text{CV} \leq 0.05$ 保证其在不同样本间具有较低表达波动, 从 2 个表达量文件中共同筛选出稳定

表达基因作为候选内参基因。同时, 基于本课题组天麻转录组和代谢组数据筛选天麻素合成途径关键酶基因 6 个。

2.2 本地 PrimerServer 2 的搭建及候选内参基因的引物设计

在 Windows 系统开启 linux 子系统搭建 PrimerServer2 工具。主要步骤如下: 使用 git clone <https://github.com/billzt/PrimerServer2.git> 下载源代码; 安装 Python 3.7.1 及 Samtools; 进入 PrimerServer2 目录, 运行 python3-m venv 创建虚拟环境并激活; 执行 python3 setup.py develop 完成依赖安装; 运行 primerserver-config 生成配置文件并编辑指定数据目录; 配置完成之后运行 primerserver 2。利用本地 PrimerServer 2 设计特异性的荧光定量引物 (表 1、2), 由上海生物工程技术有限公司合成。

表 1 候选内参基因引物序列

Table 1 Primers of candidate reference genes

基因ID	引物名称	引物序列 (5'-3')	产物大小/bp	扩增效率/%
GelC01G00930	Gelref1_RT_1F	AAATTGCGGTTGCTTGCACA	114	92.32
	Gelref1_RT_1R	GATAGAGTCCTGTGCCAGCC		
GelC10G01010	Gelref2_RT_1F	CGATGCAATTCTTCTGGGCG	101	101.80
	Gelref2_RT_1R	TGAAAACCTTCTCCGCCTCC		
GelC14G00908	Gelref3_RT_1F	ACAGTCGCAGCCTTCTCTTC	90	96.42
	Gelref3_RT_1R	GATGTGAGGAGAGGGCACAG		
GelC17G00479	Gelref4_RT_1F	CAGGAGGTTCTCGGTGTTGG	143	98.24
	Gelref4_RT_1R	ACAGCAACTGGAGCCCATT		
GelC04G00408	Gelref5_RT_1F	TCCAAATTCCGGCATCAGCT	111	103.16
	Gelref5_RT_1R	GATCTGAAGATGGAGGCCCG		
GelC04G00837	Gelref6_RT_1F	TGGTGATGTGGAGGTTCTGC	153	100.00
	Gelref6_RT_1R	GATGCAGCTTCATCTTGGCG		
GelC04G01115	Gelref7_RT_1F	TCGTGTGCCTGGAGTTGTAC	93	105.52
	Gelref7_RT_1R	CCAGGTTTCGCAAAGGTGTTG		

表 2 天麻素合成相关基因引物序列

Table 2 Primers of genes involved in gastrodin biosynthesis pathway

基因名称	引物名称	引物序列 (5'-3')	产物大小/bp
苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL)	GelPAL1_RT_F	TTCTCAAGCTCATGACCTCCAC	130
	GelPAL1_RT_R	ACAGTGAGCGTTTCTTGGC	
	GelPAL2_RT_F	ATCCTTTGCAGAAGCCGAAG	147
	GelPAL2_RT_R	AAACGTCGATGAGCGGATTG	
糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferases, UGT)	GelUGT1_RT_F	AAGGCAGTGAAGCTTCGATG	94
	GelUGT1_RT_R	AGAGGGAACAGATGACCCATG	
	GelUGT2_RT_F	AAAATTGGAGTGGCCGTTGG	114
	GelUGT2_RT_R	CAACATTACAACCGCCTTCTCC	
	GelUGT3_RT_F	ATTGCGGGTGGAATTCTGTG	126
	GelUGT3_RT_R	ACAACCCCAATTCTCAGCAC	
	GelUGT4_RT_F	TCAACAACAAGCCCATCGAC	115
	GelUGT4_RT_R	AAGTTGTCGAGGAAGGAGTCG	

2.3 天麻总 RNA 提取和 cDNA 反转录

按照 RNA 提取试剂盒说明书提取天麻各组织总 RNA, 使用 NanoDrop 微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量和浓度。使用反转录预混型试剂盒进行 cDNA 合成, 按照试剂盒说明书, 配制反转录体系: 5×Evo M-MLV RT Reaction Mix 4 μL、gDNA Clean Reaction Mix 2 μL、总 RNA 1 μg、ddH₂O 补足至 20 μL。在 PCR 仪中进行反转录反应, 待反应结束后, 将获得的 cDNA 产物稀释 20 倍于-20℃保存备用。

2.4 候选内参基因的 qRT-PCR 反应

qRT-PCR 采用 2×Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 试剂盒, 反应体系为 20 μL: 2×SYBR qPCR Master Mix 10 μL, 上下游引物各 0.4 μL (10 μmol/L), cDNA 2 μL, dd H₂O 7.2 μL。Archimed R4 仪器上进行, 反应程序: 95℃预变性 30 s; 95℃变性 5 s, 60℃退火 30 s, 40 个循环。

2.5 候选内参基因扩增效率评估

将各组织部位 cDNA 等量混合后按 5 个梯度 (5⁰、5⁻¹、5⁻²、5⁻³、5⁻⁴) 稀释作为模板, 进行 qRT-PCR, 绘制标准曲线, 计算斜率 (*k*)、相关系数 (*R*²) 及扩增效率 ($E=10^{-1/k}-1$)。溶解曲线为单一峰则表明引物特异性良好。

2.6 候选内参基因的稳定性评价

根据 qRT-PCR 获得的 *C_t* 值, 利用 geNorm、NormFinder、BestKeeper 算法^[15]及 RefFinder^[16]在线工具对候选内参基因在不同发育时期及组织部位的表达稳定性进行综合评价, 筛选最适内参基因。

2.7 天麻素合成途径关键酶基因表达分析

以筛选获得的最适内参基因对天麻素合成途径 6 个关键酶基因进行表达分析, 采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算相对表达量, 每个样本设置 3 个生物学重复。使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行单因素方差分析

(One-way ANOVA), 并绘图。

3 结果与分析

3.1 候选内参基因的筛选与功能注释

以 TPM 标准化后的表达量计算各基因的变异系数, 并结合 2 个 RNA-Seq 数据集 (块茎、茎、花转录组和块茎 4 个不同发育时期转录组) 的表达矩阵, 筛选出 TPM≥40 且 CV≤0.05 的候选内参基因 7 个, 分别命名为 *Gelref1*~*Gelref7* (表 3)。这些基因在不同发育时期和不同组织部位中的平均表达量及 CV 值见表 3, 均显示出极低的表达变异 (CV 为 0.02~0.05), 表明其表达高度稳定。

为进一步明确这些基因的潜在功能, 利用 EggNOG 数据库对其进行功能注释, 结果显示, *Gelref1* (GelC01G00930) 参与线粒体丙酮酸跨膜转运 (mitochondrial pyruvate transmembrane transport); *Gelref2* (GelC10G01010) 编码丙酮酸激酶 (pyruvate kinase); *Gelref3* (GelC14G00908) 为核糖体蛋白 (ribosomal protein); *Gelref4* (GelC17G00479) 涉及高尔基体囊泡融合 (vesicle fusion with Golgi apparatus); *Gelref5* (GelC04G00408) 参与 RNA 加工 (RNA processing); *Gelref6* (GelC04G00837) 参与有丝分裂姐妹染色单体黏连 (mitotic sister chromatid cohesion); *Gelref7* (GelC04G01115) 具有泛素激活酶活性 (ubiquitin-activating enzyme activity)。这些候选内参基因覆盖了 RNA 代谢、蛋白质降解、囊泡运输、能量代谢、线粒体转运、翻译及细胞周期等多个基础生物学过程, 与已报道内参基因的功能特征部分一致。例如, *Gelref7* 的泛素激活酶活性与经典内参基因 *UBC* (ubiquitin-conjugating enzyme) 高度相似, *Gelref3* 的核糖体蛋白功能与 *RPL* (ribosomal protein L) 一致, *Gelref2* 的丙酮酸激酶与 *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 同属能量代谢核心酶类, 而 *Gelref5* 的 RNA 加工功能也与 *EF-1α* 等常用内参基因参与的基础

表 3 候选内参基因在转录组中的表达水平

Table 3 Expression levels of candidate reference genes in transcriptome data

基因名称	基因ID	不同时期的平均相对表达量	不同部位的平均相对表达量	CV
<i>Gelref1</i>	GelC01G00930	86.40	46.72	0.03
<i>Gelref2</i>	GelC10G01010	161.42	153.47	0.05
<i>Gelref3</i>	GelC14G00908	60.96	47.99	0.04
<i>Gelref4</i>	GelC17G00479	103.98	137.33	0.05
<i>Gelref5</i>	GelC04G00408	56.86	61.32	0.02
<i>Gelref6</i>	GelC04G00837	47.30	58.30	0.03
<i>Gelref7</i>	GelC04G01115	100.47	107.72	0.04

翻译过程相吻合^[1, 2, 7]。这一功能特征的重叠进一步验证了所筛选候选内参基因的可靠性, 为后续 qRT-PCR 分析提供了候选基因。

3.2 天麻各组织总 RNA 质量分析

从天麻 4 个不同发育时期和 3 个不同组织部位中, 每个部分设置 3 个生物学重复, 共 21 个样本分别提取总 RNA。琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, 28S 和 18S rRNA 主条带清晰明亮、无明显拖尾或降解条带(图 1), 表明总 RNA 完整性良好。微量

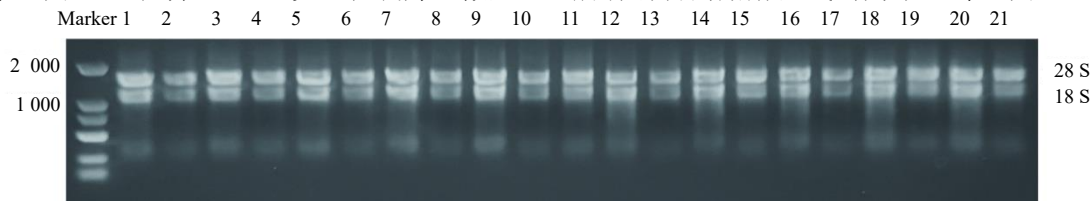


图 1 天麻不同组织总 RNA 质量检测

Fig. 1 Quality assessment of total RNA from different tissues of *G. elata*

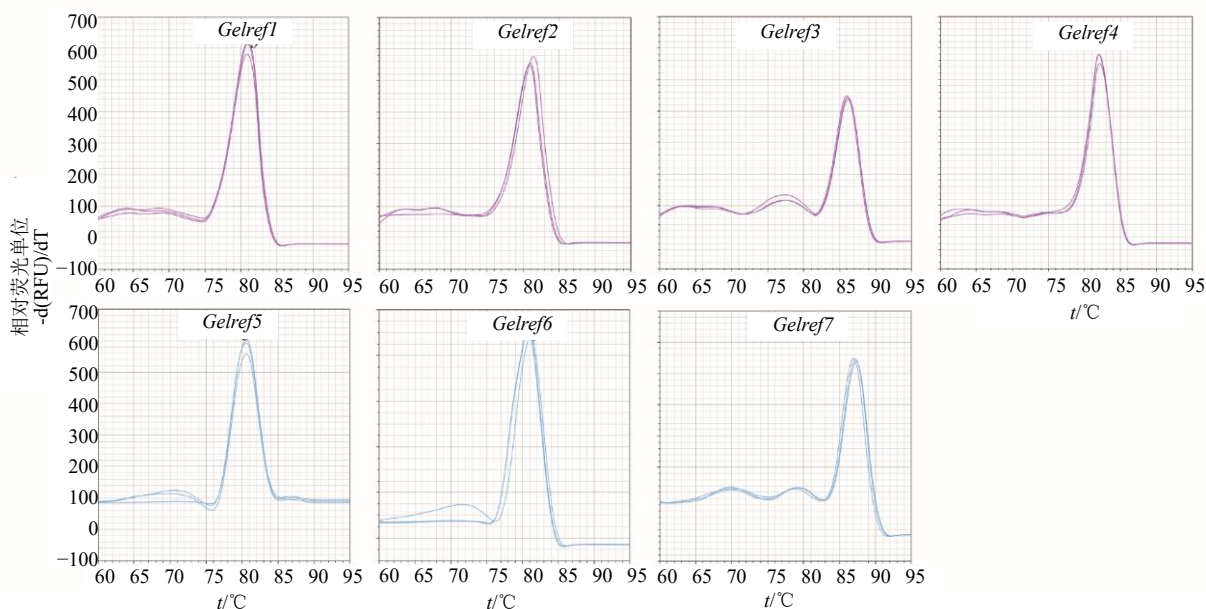


图 2 候选内参基因的熔解曲线

Fig. 2 Melting curves of candidate reference genes

物特异性高, 可用于后续实验。

3.4 候选内参基因的表达水平分析

以天麻块茎不同发育时期和组织部位的 cDNA 为模板, 对 7 个候选内参基因 (*Gelref1*~*Gelref7*) 进行 qRT-PCR 检测。结果显示, 7 个候选内参基因的 C_t 值整体分布在 18.51~25.09(图 3), 表明其表达量处于中等丰度水平。*Gelref1* 的 C_t 值波动最小(20.66~21.99), 平均 C_t 值最低且变异幅度最小, 显示出最高的表达稳定性;*Gelref2* 的 C_t 值次之

分光光度计检测结果显示, 所有样本总 RNA 浓度为 130~300 ng/ μ L, A_{260}/A_{280} 为 1.89~2.23, 表明 RNA 浓度适中且纯度较高, 可满足后续 cDNA 合成及 qRT-PCR 实验要求。

3.3 候选内参基因的扩增效率与线性分析

以混合 cDNA 进行 5 倍梯度稀释作为模板进行 qRT-PCR, 绘制标准曲线。结果显示 7 个候选内参基因的扩增效率为 92.32%~105.52%(表 1)。另外, 所有引物的熔解曲线均为单一峰(图 2), 表明引

(20.08~22.15); 而 *Gelref3* 的 C_t 值波动相对较大(20.73~25.09)。不同发育时期和不同组织部位间, 7 个候选内参基因的 C_t 值趋势基本一致, 未出现显著的组织特异性或时期特异性差异(图 3)。以上结果表明, 7 个候选内参基因在所测试的实验条件下均具有较好的表达稳定性, 其中 *Gelref1* 表达最为稳定。

3.5 候选内参基因的稳定基因分析

利用 geNorm、NormFinder、delta- C_t 算法以及 RefFinder 在线工具, 对 7 个候选内参基因 (*Gelref1*~



图 3 候选内参基因 C_t 值的分布箱线图

Fig. 3 Boxplot of C_t values distribution for candidate reference genes

表 4 不同组织中内参基因稳定性的综合评价 (geNorm、NormFinder、delta- C_t 、RefFinder)

Table 4 Comprehensive evaluation of reference gene stability in different tissues using geNorm, NormFinder, delta- C_t , and RefFinder

内参基因	geNorm		NormFinder		delta- C_t		RefFinder综合评价	
	M	排序	M	排序	SD	排序	基因稳定性	排序
<i>Gelref1</i>	0.263	1	0.132	1	0.58	1	1.19	1
<i>Gelref2</i>	0.263	1	0.231	2	0.63	2	1.41	2
<i>Gelref3</i>	0.690	5	0.899	6	1.00	6	6.24	6
<i>Gelref4</i>	0.328	2	0.262	3	0.64	3	3.00	3
<i>Gelref5</i>	0.786	6	0.934	7	1.03	7	6.44	7
<i>Gelref6</i>	0.451	3	0.543	4	0.78	4	4.43	4
<i>Gelref7</i>	0.588	4	0.674	5	0.85	5	4.73	5

排名第 1; *Gelref2* 和 *Gelref4* 分别位居第 2 和第 3。

RefFinder 综合评价结果显示, *Gelref1* 的基因稳定性指数最低 (1.19), 综合排名第 1; *Gelref2* 次之 (1.41), 排名第 2; *Gelref4* 排名第 3 (3.00); 而 *Gelref5* 的稳定性指数最高 (6.44), 综合排名最后 (表 4)。综上所述, 以上 4 种算法的评价结果表明 *Gelref1* 在不同发育时期和不同组织部位中表达最为稳定, 可作为天麻最适内参基因。

为了进一步验证内参基因筛选结果的可靠性, 为了进一步验证候选内参基因筛选结果的可靠性, 分别选择综合排名最高的稳定内参基因 *Gelref1* 和综合排名最低的不稳定内参基因 *Gelref5* 作为对照 (图 4、5), 对 *GelPAL1* 和 *GelUGT1* 的表达模式进行验证。以 *Gelref1* 基因作为内参基因时, *GelPAL1* 和 *GelUGT1* 在块茎不同生长发育时期整体呈现上调表达趋势, 与转录组结果一致; 而以 *Gelref5* 基因作为内参基因时, *GelPAL1* 和 *GelUGT1* 的表达模式与转录组结果不一致。通过以上结果分析确认了 *Gelref1* 基因可作为天麻不同生长发育时期组织部位的最佳内参基因。

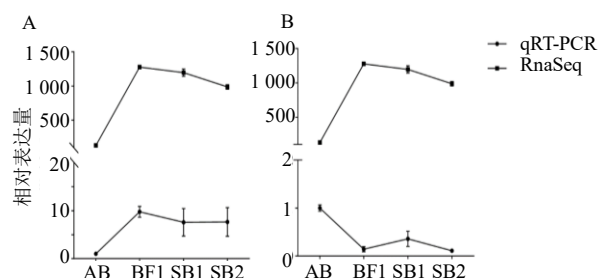
3.6 天麻素合成途径相关基因的表达分析

基于课题组前期获得的天麻块茎不同发育时

Gelref7) 在不同发育时期组织部位中的表达稳定性进行综合评价 (表 4)。

geNorm 分析结果显示, 所有候选基因的平均表达稳定值 (M) 均小于 1.5, 符合内参基因稳定性要求。其中 *Gelref1* 和 *Gelref2* 的 M 值最低 (均为 0.263), 并列第一; *Gelref4* 次之 (M=0.328); *Gelref5* 的 M 值最高 (0.786), 稳定性相对较差。

NormFinder 分析进一步显示, *Gelref1* 的 M 值最小 (0.132), 排名第 1; *Gelref4* (M=0.262) 和 *Gelref2* (M=0.231) 分别排名第 2 和第 3。delta- C_t 算法结果与 NormFinder 高度一致, *Gelref1* 的 SD 值最低 (0.58),



A-以 *Gelref1* 为参照; B-以 *Gelref5* 为参照, 下图同。

A-*Gelref1* as the reference; B-*Gelref5* as the reference, same as below.

图 4 *GelPAL1* 基因在块茎不同发育时期的表达验证
Fig. 4 Expression validation of *GelPAL1* in *G. elata* tubers at different developmental stages

期转录组和代谢组数据, 采用加权基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 构建基因-代谢物关联网络。以天麻素含量为目标代谢物, 筛选与其显著相关 ($|r| > 0.8$, $P < 0.05$) 的共表达模块, 并结合功能注释结果, 获得一批可能参与天麻素生物合成的候选基因。进一步依据苯丙烷代谢途径和糖基化修饰途径的功能注释信息, 从候选基因中筛选出 6 个关键酶基因进行表达验证, 包括 2 个苯丙氨酸解氨酶基因 (*GelPAL1*、*GelPAL2*) 和 4 个糖基转移酶基因 (*GelUGT1*~

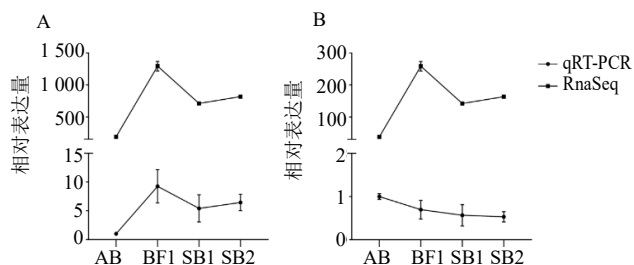
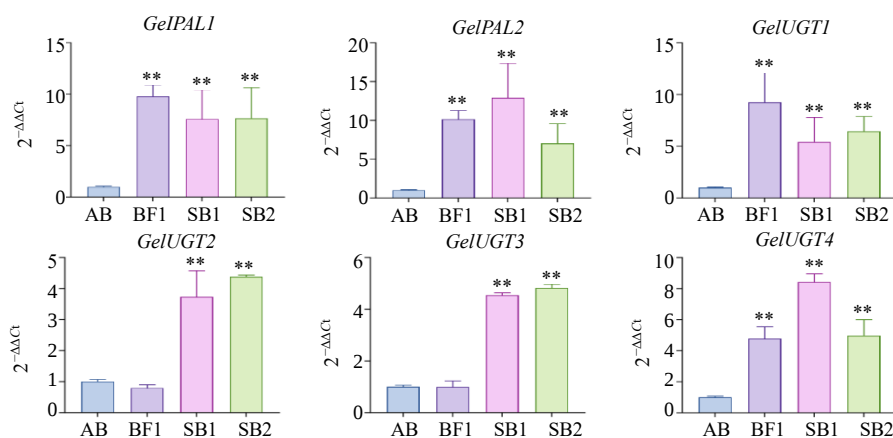


图 5 天麻 *GelUGT1* 基因在块茎不同发育时期的表达验证
Fig. 5 Expression validation of *GelUGT1* in *G. elata* tubers at different developmental stages

GelUGT4)。 *GelPAL* 基因催化苯丙氨酸生成反式肉桂酸，是天麻素合成的起始步骤； *GelUGT* 基

因则负责 4-羟基苯甲醇的糖基化，最终生成天麻素。

以筛选获得的最适内参基因 (*Gelref1*) 为对照，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 6 个关键酶基因的相对表达量。在块茎 4 个不同发育时期 (AB、BF1、SB1、SB2) 中，6 个基因的表达模式也呈现明显的时间特异性 (图 6)。 *GelPAL1*、 *GelPAL2*、 *GelUGT1* 和 *GelUGT3* 均在发育中期至后期 (BF1、SB1、SB2) 显著上调表达 ($P < 0.01$)； *GelUGT2* 和 *GelUGT4* 在 SB2 和 SB1 时期表达量最高，分别为 AB 时期的 4.38 倍和 8.43 倍 ($P < 0.01$)。在不同组织部位 (块茎、茎、花) 中表达模式存在显著差异 (图 7)。 *GelPAL1* 和

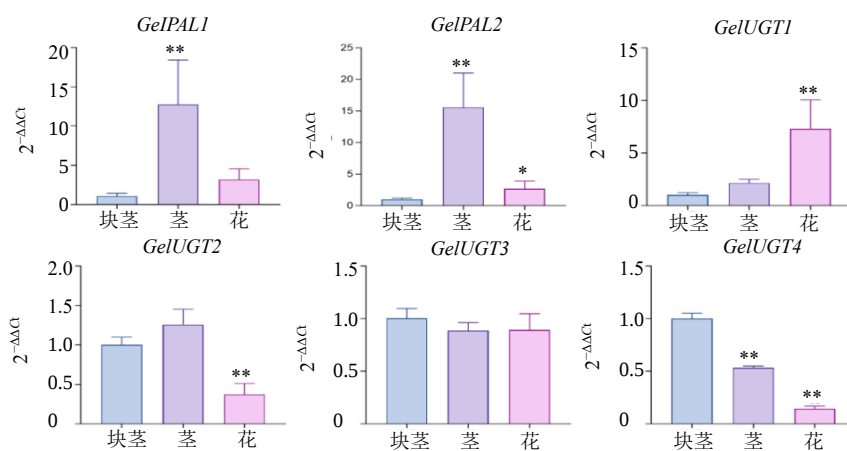


*表示与 AB 时期相比差异显著 ($P < 0.05$)； **表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ indicate significant and highly significant differences compared with the AB stage, respectively.

图 6 天麻素生物合成途径关键酶基因在天麻块茎不同发育时期中的表达模式

Fig. 6 Expression patterns of key genes involved in gastrodin biosynthesis during different developmental stages of *G. elata* tubers



*表示与块茎时期相比差异显著 ($P < 0.05$)； **表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ indicate significant and highly significant differences compared with the tuber stage, respectively.

图 7 天麻素生物合成途径关键酶基因在天麻不同组织中的表达模式

Fig. 7 Expression patterns of key genes involved in gastrodin biosynthesis in different tissues of *G. elata*

GelPAL2 在茎中表达量最高,分别为块茎的 12.75 倍和 15.57 倍 ($P<0.01$); *GelUGT1* 在花中显著高表达 ($P<0.01$),为块茎的 7.30 倍; *GelUGT4* 在块茎中表达量最高,而在茎、花中显著下调 ($P<0.01$)。

以上结果表明,天麻素合成途径关键酶基因主要在茎和块茎发育中后期高表达,与天麻素在成熟块茎中大量积累的趋势高度一致,为后续功能验证和调控网络解析提供了重要依据。

4 讨论

合适稳定的内参基因是 qRT-PCR 分析中进行标准化和校正的关键,是药用植物功能基因表达研究的基础^[3-4]。传统内参基因如 *ACTIN*、*GAPDH*、*UBC* 等虽被广泛应用于中药材分子水平研究,但在不同物种、组织部位、发育时期及胁迫条件下常表现出显著的表达变异,导致目的基因相对表达量偏差^[5-6]。本研究创新性地采用 2 个独立 RNA-Seq 数据集(块茎、茎、花转录组和块茎 4 个不同发育时期转录组),通过 TPM 表达矩阵计算结合 TMM 标准化,筛选 CV 均小于 0.05 的基因作为候选内参基因,提出了一套适用于天麻属的通用内参基因系统筛选流程。该方法避免了传统候选基因的主观性^[7],通过本地 PrimerServer2 软件包设计特异性引物,显著提升了内参基因筛选的科学性。

本研究筛选的 *Gelrefl* 基因在天麻接菌后不同发育时期及组织部位(箭麻块茎、茎、花)中均表现出最高的表达稳定性(RefFinder 综合排名第 1)。该基因的稳定表达特性与其在能量代谢等基础生物过程中的核心功能密切相关,与广西莪术 *EF2* 基因^[2]、异形南五味子 *UBC* 基因^[1]在各自体系中的表现一致。与传统内参基因相比, *Gelrefl* 基因的表达量中等、 C_t 值波动更小,充分证明了基于 RNA-Seq 大数据筛选内参基因的优越性。

进一步以筛选获得的最适内参基因 *Gelrefl* 为对照,分析天麻素合成途径 6 个关键酶基因(*GelPAL1*、*GelPAL2*、*GelUGT1*~*GelUGT4*)的表达模式,结果显示,6 个基因在不同组织部位(块茎、茎、花)和天麻接菌后块茎 4 个发育时期中均呈现显著的组织特异性和发育时期特异性(图 1、2)。其中 *GelPAL1* 和 *GelPAL2* 在茎中表达量最高 ($P<0.01$)。同时,在块茎发育过程中, *GelPAL1*、*GelPAL2*、*GelUGT1* 和 *GelUGT3* 均在发育中期至后期(BF1、SB1、SB2)显著上调表达。上述表达模式与天麻素作为主要活性成分在成熟块茎中大量积累的趋势

高度一致^[18-19]。这一结果与广西莪术萜类合成关键酶基因在块根/根茎发育中后期高表达的规律相似^[2]。值得注意的是,天麻素生物合成途径涉及 PAL、C4H、HBS、ADH 及 UGT 等多个关键酶。其中 PAL 催化苯丙氨酸脱氨生成反式肉桂酸,是苯丙烷代谢途径的入口酶; C4H 进一步催化肉桂酸羟化反应; UGT 则负责 4-羟基苯甲醇的糖基化修饰,最终形成天麻素。本研究筛选获得的 *GelPAL1*、*GelPAL2* 及 *GelUGT1*~*GelUGT4* 在块茎发育过程中呈现显著阶段性表达特征,表明这些基因可能共同参与天麻素积累过程。

综上,本研究建立的基于 RNA-Seq 数据的天麻属内参基因筛选流程,具有客观、高效、广谱适用等特点,为天麻分子生物学研究提供了稳定可靠的内参基因。同时,以 *Gelrefl* 基因为内参解析的天麻素合成途径关键酶基因表达模式,为阐明天麻素生物合成调控网络、分子辅助育种及品质提升奠定了坚实基础。未来可进一步结合基因功能验证和代谢组学数据,深入解析天麻素生物合成途径的关键调控节点,为天麻道地药材的分子机制研究提供理论支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 朋冬琴,罗蜜蜜,郭欣慰,等.当归实时荧光定量 PCR 内参基因筛选 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 269-278.
- [2] 李德华,程波,叶力夏提·达那别克,等.基于特异性 PCR 鉴别维药蜘蛛香及其混淆品 [J]. 中草药, 2025, 56(24): 9165-9171.
- [3] Bustin S A, Benes V, Garson J A, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(4): 611-622.
- [4] Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, et al. The lack of a systematic validation of reference genes: A serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants [J]. *Plant Biotechnol J*, 2008, 6(6): 609-618.
- [5] Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, et al. Normalization of qRT-PCR data: The necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(2): 487-493.
- [6] Ahmed U, Xie Q, Shi X P, et al. Development of reference genes for horticultural plants [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 2022, 41(3): 190-208.
- [7] Xie Q, Ahmed U, Qi C, et al. A protocol for identifying

- universal reference genes within a genus based on RNA-Seq data: A case study of poplar stem gene expression [J]. *For Res*, 2024, 4: e021.
- [8] 蒲钧逸, 顾宇星, 黄微, 等. 基于网络药理学、分子对接及分子动力学模拟技术探讨天麻治疗脑梗死的作用机制 [J]. *现代药物与临床*, 2026, 41(1): 58-69.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 123-124.
- [10] 雷小湖, 李志平, 刘书磊, 等. 天麻及其上市药品的组方规律与临床应用研究进展 [J]. *中草药*, 2026, 57(7): 2787-2798.
- [11] 李波, 熊仕英, 王丽, 等. 天麻素延长秀丽隐杆线虫寿命及改善衰老相关神经退行性疾病的影响 [J]. *世界中医药*, 2026, 21(1): 47-52.
- [12] 陈春光, 米华玲. 天麻素生物合成途径相关基因的分析 [J]. *植物生理学报*, 2021, 57(9): 1819-1828.
- [13] 徐德宏, 崔培梧, 罗怀浩, 等. 天麻素生物合成的研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51(22): 5877-5883.
- [14] Liu B C, Chen J Y, Zhang W J, *et al.* The gastrodin biosynthetic pathway in *Pholidota chinensis* Lindl. revealed by transcriptome and metabolome profiling [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 1024239.
- [15] 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]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(6): 509-515.
- [16] Andersen C L, Jensen J L, Ørntoft 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 Res*, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [17] 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 Biol*, 2002, 3(7): RESEARCH0034.
- [18] Shan T Y, Yin M Z, Wu J X, *et al.* Comparative transcriptome analysis of tubers, stems, and flowers of *Gastrodia elata* Blume reveals potential genes involved in the biosynthesis of phenolics [J]. *Fitoterapia*, 2021, 153: 104988.
- [19] Liu Q, Wu Z Q, Gao Y G, *et al.* GeARF5/GeIAA33-GeSWEET14 module balances the secondary metabolic biosynthesis to increase the yield and quality in *Gastrodia elata* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2026, 68(4): 1155-1175.

[责任编辑 时圣明]