

不同光周期和温度处理下桂花内参基因的筛选

王千千, 蒋琦妮, 付建新, 董 彬, 赵宏波

(浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州, 311300)

摘要: 光周期和温度处理能够影响桂花 *Osmanthus fragrans* 的基因表达水平和花芽分化过程, 通过实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析基因表达已成为研究这些过程机制的重要手段, 而筛选出适合光周期和温度处理的内参基因在研究桂花分子机制中尤为重要。为了得到不同光周期和温度处理下桂花中稳定的内参基因, 以桂花品种‘佛顶珠’*O. fragrans* ‘Foding Zhu’当年生枝条的第2或第3对幼叶为材料, 以 *OfACT*, *OfEF1 α* , *OfIDH*, *OfRAN1*, *OfTUB*, *OfUBC2* 和 *Of18S* 等7个基因作为候选内参基因, 利用 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper 3个软件对候选内参基因的表达稳定性进行比较分析; 以昼夜节律相关基因 *GIGANTEA (GI)* 对筛选出的最佳内参基因进行验证。结果表明: 在不同处理条件下, 桂花叶片中 *OfRAN1* 和 *OfIDH* 为最佳内参基因, *Of18S* 的稳定性最差(geNorm 分析结果显示 *OfRAN1* 和 *OfIDH* 的稳定值为 0.347, 而 *Of18S* 的稳定值为 0.601; NormFinder 显示 *OfRAN1* 和 *OfIDH* 的稳定值为 0.135 和 0.206, 而 *Of18S* 为 0.474; BestKeeper 显示 *OfRAN1* 的稳定值为 0.80, *OfIDH* 为 0.133, 而 *Of18S* 为 0.474); *GI* 基因的相对表达水平分析表明(昼夜节律基因 *GI* 的表达模式为在白天累积并在夜间下降), 在7个内参基因及 *OfRAN1* 和 *OfIDH* 的基因组合中, 使用 *OfRAN1* 和 *OfIDH* 的内参基因组合可获得 *GI* 基因更为精确的基因表达结果。综上所述, *OfRAN1* 和 *OfIDH* 内参基因组合是桂花在不同光周期和温度处理下最佳内参基因组合。这为桂花分子机制研究奠定基础。图2表3参31

关键词: 植物学; 桂花; 内参基因; qRT-PCR; *GI* 基因

中图分类号: S685.13 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2019)05-0928-07

Screening reference genes of *Osmanthus fragrans* with differing photoperiod and temperature treatments

WANG Qianqian, JIANG Qini, FU Jianxin, DONG Bin, ZHAO Hongbo

(School of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Photoperiod and temperature treatment can affect the gene expression level and flower bud differentiation process of *Osmanthus fragrans*. Analysis of gene expression by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) has become an important means to study the mechanism of these processes and it is especially important to screen for an internal reference gene suitable for photoperiod and temperature treatment. To screen reference genes in *O. fragrans* using different photoperiod and temperature treatments, the young leaves of *O. fragrans* ‘Foding Zhu’ were used as materials. The *O. fragrans* treatment conditions were 14 h D (light)/10 h N (dark) +26 °C, 14 h D /10 h N +19 °C, 10 h D /14 h N +26 °C and 10 h D /14 h N +19 °C, light intensity 100%, relative humidity 60%–80%. After treatment for 40 days, the second or third young leaves of the current shoots were taken every 4 h from 8:00 in the morning frozen in the liquid nitrogen and stored at –80 °C. The seven genes, including *OfACT*, *OfEF1 α* , *OfIDH*, *OfRAN1*, *OfTUB*, *OfUBC2*, and *Of18S*, were chosen as candidate reference genes. qRT-PCR was used to screen the reference genes, and GeNorm, NormFinder, and BestKeeper were used to analyze the stability of the candidate reference genes and screen out the best ones.

收稿日期: 2018-10-10; 修回日期: 2019-01-20

基金项目: 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2016C02056-12)

作者简介: 王千千, 从事园林植物遗传育种和分子生物学研究。E-mail: 1527103473@qq.com。通信作者: 赵宏波, 教授, 博士, 从事观赏植物遗传育种和植物繁殖生态研究。E-mail: 183876004@qq.com

Finally, the circadian rhythm gene *GIGANTEA* (*GI*) was used to verify the best reference genes. Results showed that *OfRAN1* and *OfIDH* had the highest stability (GeNorm showed that the stable value of *OfRAN1* and *OfIDH* were 0.347, while *Of18S* was 0.601; NormFinder showed that the stable value of *OfRAN1* and *OfIDH* were 0.135 and 0.206, while *Of18S* was 0.474; BestKeeper showed that the stable value of *OfRAN1* was 0.800 and *OfIDH* was 0.133, while *Of18S* was 0.474), which meant they were the best reference genes for the different conditions and *Of18S* had the worst stability (The greater the stability value, the worse the stability). The relative expression level of *GI* balanced by seven reference genes and the genetic combinations of *OfRAN1* and *OfIDH* meant more accurate expression results (The expression pattern of circadian rhythm gene *GI* is accumulated during the day and falls at night). In summary, the genetic combinations of *OfRAN1* and *OfIDH* were the best combination of reference genes used to study the molecular mechanism of *O. fragrans* under different photoperiod and temperature treatments. [Ch, 2 fig. 3 tab. 31 ref.]

Key words: botany; *Osmanthus fragrans*; reference gene; qRT-PCR; *GI*

桂花 *Osmanthus fragrans* 是中国十大传统名花之一，深受人们喜爱。不同学者已经从桂花的花芽分化^[1-3]、开花机制^[4-5]、花色呈现^[6-7]、花香释放^[8-9]等不同层面展开了研究。随着分子水平研究的不断深入，利用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析基因的表达已成为研究这些过程机理的重要手段，而筛选得到适合不同研究的内参基因格外重要。研究认为^[10-11]，内参基因并不存在通用性，不同处理、不同组织中内参基因的表达水平都会发生改变^[12]；选用一种内参基因无法准确反映不同植物组织、同一组织不同处理下的基因表达水平^[13-14]。因此，根据具体的实验材料和处理条件筛选合适的内参基因十分必要^[15]。光周期和温度处理能对桂花的基因表达水平、花芽分化进程等产生影响。研究表明^[4,16]：长日照和相对低温都能够加快桂花花芽分化进程，而短日照条件下桂花的花芽分化相对较慢，低温或高温都会抑制桂花的花芽分化。本研究在不同光周期和温度条件下对桂花常用的 7 个候选内参基因进行比较分析，筛选最佳内参基因，为后期研究光周期和温度影响桂花开花的机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为多年生‘佛顶珠’*O. fragrans* ‘Foding Zhu’盆栽植株，种植于浙江农林大学桂花资源圃。设置 4 个处理：长日照高温(光照/黑暗=14 h/10 h, 26 °C)，长日照低温(光照/黑暗=14 h/10 h, 19 °C)，短日照高温(光照/黑暗=10 h/14 h, 26 °C)和短日照低温(光照/黑暗=10 h/14 h, 19 °C)，光照强度为 100%，相对湿度为 60%~80%。实验材料在上述环境中培养 40 d。处理结束后从 8:00 起，每隔 4 h 取当年生枝条的第 2 片或第 3 片嫩叶，液氮速冻，放于-80 °C保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 每样品取 50~100 mg，充分研磨后按照 RNAprep pure Plant Kit (天根，北京)说明书步骤提取各样品 RNA。通过紫外分光光度计和质量浓度为 1%的琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 浓度和品质。以所提样品 RNA 为模板，按照 Reverse Transcriptase M-MLV(Takara，大连)说明书合成 cDNA 第 1 条链，合成后于-20 °C储存备用。

1.2.2 候选内参基因的选择和特异性引物设计 从桂花转录组数据库中选择肌动蛋白基因(*OfACT*)、延伸因子 1 α 蛋白基因(*OfEF1 α*)、NADP-异柠檬酸脱氢酶基因(*OfIDH*)、GTP 结合蛋白 RNA1 基因(*OfRNA1*)、 β 微管蛋白基因(*OfTUB*)、泛素结合酶 E2 基因(*OfUBC2*)和 18S 核糖体 RNA 基因(*Of18S*)^[12,17]等 7 个使用较多的内参基因作为候选内参基因。采用 SYBR green II 荧光染料嵌合法进行内参基因的筛选，设计候选内参基因的引物，通过 Bioxman 和 Primer Premier 5 软件对引物进行校验，并利用 Primer-BLAST 进行检测以确认引物序列的特异性。选用的引物序列由上海捷瑞生物工程有限公司合成(表 1)。

1.2.3 荧光定量 PCR 分析 qRT-PCR 实验方法参考 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus)(Takara，大连)试剂盒。采用 20.0 μ L 的反应体系：其中双蒸水 6.4 μ L，上下游引物各 0.8 μ L，cDNA 模板 2.0 μ L，SYBR II 荧光染料 10.0 μ L。反应在 ABI 7300 实时 PCR 仪中进行，反应程序为：95 °C 下预变性 30

s; 95 °C下反应 5 s, 60 °C反应 31 s, 共 40 个循环; 95 °C下反应 15 s, 60 °C下反应 1 min, 95 °C下反应 30 s, 60 °C下反应 15 s^[17]。3 次生物学重复。

1.2.4 数据分析 用 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper 软件分别对 qRT-PCR 中所得样品的反应循环数(C_t 值)进行分析, 比较 7 个候选内参基因表达的稳定性, 并选择最佳内参基因。geNorm 软件以各候选内参基因在样品中的表达水平为依据, 计算各候选基因的表达稳定性(M), M 值越小越稳定; $M < 1.5$ 时认为是理想内参^[18-19]。geNorm 软件还可以根据候选内参基因标准化因子的配对差异性分析(V_n/V_{n+1})得出最佳内参基因的个数; 其中 V 表示配对差异值, n 表示内参基因个数。软件默认的(V_n/V_{n+1})值为 0.15, 当 $V_n/V_{n+1} < 0.15$ 时, 表明引入的 n 个内参基因已经稳定, 不需要引入($n+1$)内参基因, 当 $V_n/V_{n+1} > 0.15$ 时, 则需要引入($n+1$)个内参基因^[17,20]。因 geNorm 软件最终挑选出 2 个或 2 个以上的内参基因组合来校正数据, 所以 $n \geq 2$ 。为了了解引用 1 个内参基因的稳定性, 需要通过 NormFinder 和 BestKeeper 软件做进一步分析。NormFinder 软件对内参基因的筛选是基于方差分析的结果, 利用 ΔC_t 法计算候选内参基因表达的稳定性(S), 从而评估候选内参基因的表达稳定性; S 越小, 基因越稳定^[21]。BestKeeper 软件通过计算标准偏差(S_D)对候选内参基因的表达稳定性进行评价和排序, S_D 越小, 则该基因的稳定性越好; 若 $S_D > 1$, 则认为该基因不稳定^[20-21]。最后通过昼夜节律基因 GI 的相对表达水平, 对选择的最佳内参基因进行验证。

表 1 qRT-PCR 相关内参基因引物信息

Table 1 List of primers for qRT-PCR

基因简称	引物序列(5'→3')	退火温度/ °C	基因简称	引物序列(5'→3')	退火温度/ °C
<i>OjACT</i>	CCCAAGGCAAACAGAAAAAAT ACCCCATCACCAGAATCAAGAA	55.0	<i>OjTUB</i>	AGAAGGGATGGATGGAATGGA GTCTTCTTCGTCCTCGGCAGT	56.0
<i>OjEF1α</i>	CGTTTGCCACTTCAGGATGTCTA GTACCAGGTTTCAGGACTCCAGTTT	58.0	<i>OjUBC2</i>	TGTTGACAAAACCGATGGAAGGA GTGGAGTGTGGAGGATAAGGGTG	57.5
<i>OjIDH</i>	CTTGAAGCAGATGTGGAAGAGTC CTTTGTCCATCCTGGGACCAGTC	57.5	<i>Oj18S</i>	AGCCTGAGAAACGGCTACCAC ATACGCTATTGGAGCTGGAA	55.0
<i>OjRAN1</i>	AGAACCGACAGGTGAAGGCAA TGGCAAGGTACAGAAAGGGCT	57.5			

2 结果和分析

2.1 RNA 品质及引物扩增效率检测

提取不同处理桂花样品的总 RNA, 经紫外分光光度计检测, 所有样品总 RNA 的吸光度值 [$D(260)/D(280)$ 和 $D(260)/D(230)$] 均为 1.8~2.1。将所有样品的 cDNA 等量混合后作为模板, 进行普通 PCR 和定量 PCR 检测。为检测引物的扩增效率, 设置 6 个 cDNA 浓度梯度(原液, 5^{-1} , 5^{-2} , 5^{-3} , 5^{-4} , 5^{-5} 原液), 根据 qRT-PCR 结果, 利用公式 $E=(10^{-1/s}-1) \times 100\%$ 得出基因的扩增效率(表 2), 其中: $E(\%)$ 表示扩增效率, s 表示曲线斜率。经计算, 扩增效率为 95%~110%, 相关系数为 0.993~0.998, 符合 qRT-PCR 的基本要求。

2.2 候选内参基因的转录水平分析

根据扩增效率, 将各样品的原始 cDNA 稀释 50 倍后作为模板进行 qRT-PCR。通过比较循环数(C_t)来评估各候选内参基因在所有样品中的转录水平(表 2), 候选内参基因平均 C_t 为 8.99~28.44, 其中 *Oj18S* 的 C_t 最小, 说明平均表达水平最高; *OjTUB* 最大, 说明平均表达水平最低; 其他候选内参基因平均表达水平差异则相对较小。

2.3 内参基因表达稳定性分析

geNorm 软件分析发现(表 3), 所有候选内参基因的稳定值均小于 1.5, 符合内参基因筛选的标准; 其中 *OjRAN1* 和 *OjIDH* 的稳定值相等且最小($M=0.347$), 在不同样品中表达最为稳定, 其次是 *OjACT* 基因($M=0.393$), *Oj18S* 稳定值最大($M=0.601$), 说明 *Oj18S* 表达稳定性最差。对候选内参基因的配对差异

表 2 7 个候选内参基因扩增参数

基因	C_t	扩增效率/%	曲线斜率	线性相关系数	条带长度/bp
<i>OfACT</i>	22.77 ± 0.55	103.66	-3.237 3	0.995 5	143
<i>OfeF1α</i>	20.61 ± 0.42	103.19	-3.247 8	0.995 7	89
<i>OfIDH</i>	23.59 ± 0.39	95.78	-3.453 8	0.997 7	118
<i>OfRNA1</i>	21.68 ± 0.07	95.43	-3.436 5	0.996 2	117
<i>OfTUB</i>	28.44 ± 0.40	107.49	-3.154 6	0.993 2	106
<i>OfUBC2</i>	25.73 ± 0.54	107.15	-3.161 8	0.994 5	75
<i>Of18S</i>	8.99 ± 0.55	108.15	-3.140 9	0.996 8	208

值测算可知(图 1): $V_{23}=0.126<0.15$, 表明引入 2 个内参基因已经稳定, 无需引入更多的内参基因。geNorm 软件分析结果表明, 最佳候选内参基因为 *OfRNA1* 和 *OfIDH*。

NormFinder 软件分析发现, *OfRNA1* 基因的表达稳定性最高, 其次是 *OfIDH*, *Of18S* 基因表达稳定最差, 与 geNorm 软件分析的结果一致(表 3)。BestKeeper 软件的分析结果显示(表 3), 在 7 个候选内参基因中, *OfIDH* 基因的表达稳定性最高, 其次是 *OfRNA1*, *Of18S* 基因的表达稳定性最差。分析结果尽管与 geNorm 和 NormFinder 软件的结果有些差异, 但最佳候选内参基因结果一致。

综合 3 个软件的分析结果可以得出, 不同处理条件下, *OfRNA1* 和 *OfIDH* 的表达稳定性均为最高, 可作为最佳内参基因, 而 *Of18S* 是表达稳定性最差的基因。

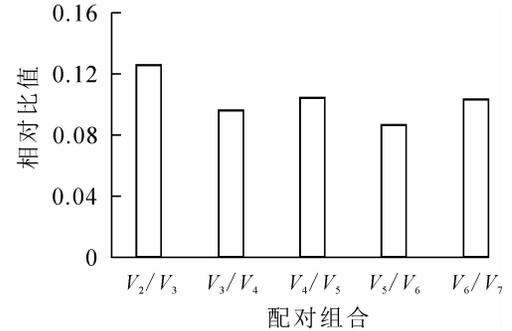


图 1 geNorm 软件分析候选内参基因的配对差异值

Figure 1 Pairwise variation of candidate reference genes as calculated by geNorm

表 3 不同软件分析 7 个候选内参基因表达稳定性

基因名称	geNorm 分析		NormFinder 分析		BestKeeper 分析	
	稳定值	排序	稳定值	排序	稳定值	排序
<i>OfACT</i>	0.393	2	0.232	3	0.288	3
<i>OfeF1α</i>	0.524	5	0.390	6	0.497	6
<i>OfIDH</i>	0.347	1	0.206	2	0.133	1
<i>OfRNA1</i>	0.347	1	0.135	1	0.180	2
<i>OfTUB</i>	0.479	4	0.361	5	0.372	5
<i>OfUBC2</i>	0.422	3	0.343	4	0.346	4
<i>Of18S</i>	0.601	6	0.474	7	0.611	7

2.4 桂花 *GI* 基因对最佳内参基因稳定性的验证

GIGANTEA 基因(*GI*)是光周期途径的重要调控基因, 其表达呈现明显的昼夜节律。选用桂花昼夜节律相关基因 *GI* 对候选内参基因进行验证, 可提高内参基因筛选的准确性, 保证最佳内参基因对光周期途径基因表达水平的校准作用。选择 *OfRNA1/OfIDH*, *OfRNA1*, *OfIDH* 以及其他候选内参基因对 *GI* 基因的相对表达水平进行校准(图 2), 结果显示: 相比其他内参基因, 不同处理下 *OfRNA1/OfIDH* 校准的 *GI* 基因的表达模式表现为光照条件下积累, 黑暗条件下降低的周期性表达, 符合 *GI* 基因的昼夜表达规律。说明 3 个内参基因筛选软件对候选内参基因筛选的结果是正确的, 即 *OfRNA1* 和 *OfIDH* 基因可作为桂花不同光周期和温度处理的最佳内参基因。

3 讨论

荧光定量 PCR 因其众多优点被广泛运用于基因表达的研究中, 成为量化基因转录表达, 揭示基因表达规律的有效方法^[22-23]; 但引用适当的内参基因对 qRT-PCR 的结果进行校准是非常必要的^[20]。理想

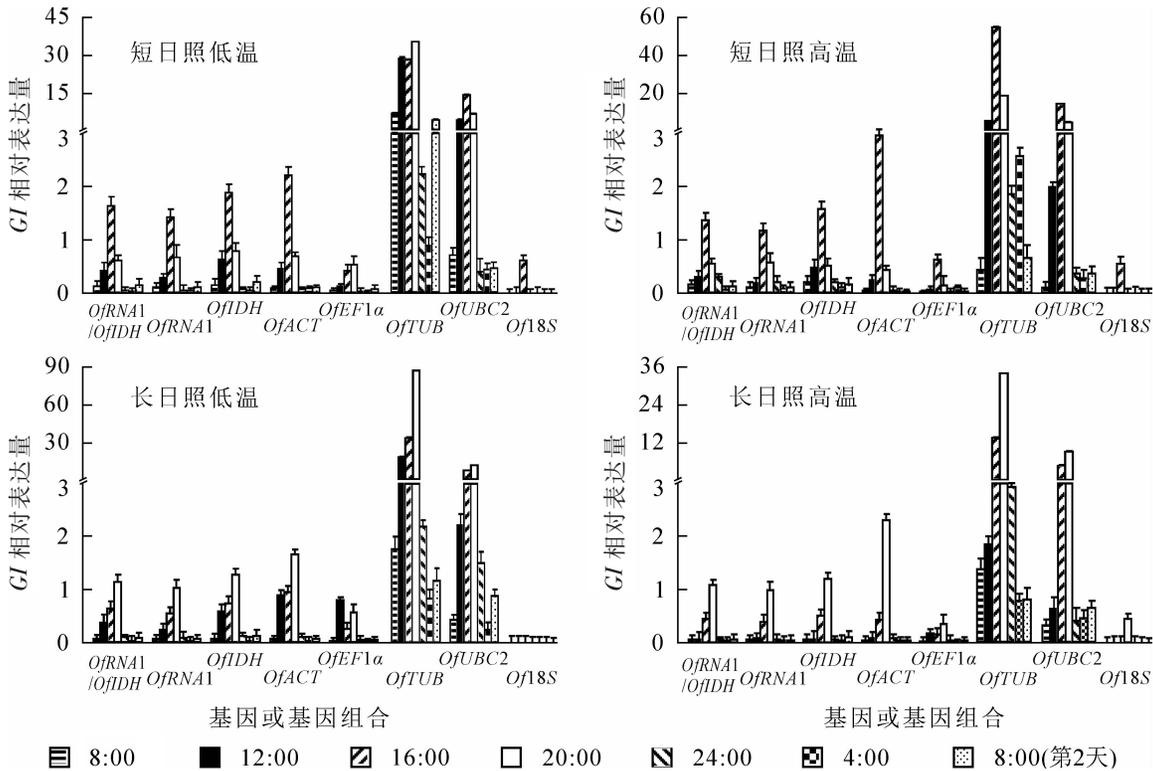


图2 不同内参基因或组合校正桂花不同条件下GI基因的相对表达

Figure 2 Relative expression levels of GI in different conditions using different reference genes or reference gene combination for normalization

内参基因在不同组织、不同发育阶段、不同生长条件下均能稳定表达^[17,24]，但事实上并没有哪一个基因能够满足所有条件^[25]。因此，根据不同实验材料和处理条件，筛选出合适的、特定的内参基因是确保实验成功的必要条件。

研究发现^[26]：选用2个或更多内参基因组合可以提高内参基因校准的精确度，弱化单一内参基因带来的不准确性。RAN(ras-related nuclear protein)是小G蛋白的一类，在细胞生理进化中起到重要的作用，它的很多同源基因是不同光周期、温度条件下常用的内参基因^[12,17]。IDH的同源基因被证实为不同温度条件下桉树 *Eucalyptus robusta* 的最佳内参基因^[27]；ACT和18S同源基因分别可作为不同光周期^[28]、温度条件^[29]下大豆 *Glycine max* 的内参基因；EF1α和TUB基因可作为不同光周期、温度条件下玉米 *Zea mays* 的内参基因^[30]；UBC2的同源基因可作为不同温度条件下欧芹 *Petroselinum crispum* 的内参基因^[31]。本研究选用了桂花中常用的7个候选内参基因，对其在不同光周期和温度处理下嫩叶中的表达稳定性进行研究；利用geNorm, NormFinder和BestKeeper等3个常用于内参基因筛选的软件进行评估，发现这7个候选内参基因在所有样品中表达稳定性的排序基本相同，均显示OfRNA1和OfIDH基因是最稳定的2个内参基因，将两者进行组合可以准确的校准不同处理下桂花叶片中目的基因的表达水平；而Of18S表达最不稳定，在所有实验材料中都存在较高的表达丰度，因而不适合作为本研究的内参基因。

光周期和温度途径在调控植物成花过程中发挥重要作用。筛选得到的桂花不同光周期和温度条件下的内参基因，能够为研究桂花在不同温度和光周期处理条件下的成花机制提供参考依据，为了解相关成花基因表达模式提供保障。

4 参考文献

[1] 李瑾. 桂花花芽分化的研究[D]. 开封：河南大学, 2007.
 LI Jin. Study on The Flower Bud Differentiation of *Osmanthus fragrans* Lour. [D]. Kaifeng: Henan University, 2007.
 [2] 邱芳, 张波, 史玉敏, 等. 不同龄期桂花花芽分化期间矿质元素和可溶性糖含量的变化[J]. 安徽农业科学, 2012, 41(24): 10024 - 10026.
 QIU Fang, ZHANG Bo, SHI Yumin, et al. Changes of mineral elements and the soluble sugar content at flower bud

- differentiation of *Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour. on different ages [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013, **41**(24): 10024 – 10026.
- [3] 王彩云, 高丽萍, 鲁涤非, 等. ‘厚瓣金桂’桂花花芽形态分化的研究[J]. 园艺学报, 2002, **29**(1): 52 – 56. WANG Caiyun, GAO Liping, LU Difei, *et al.* A study on morphological differentiation of flower bud of *Osmanthus fragrans* ‘Houban Jingui’ [J]. *Acta Horti Sin*, 2002, **29**(1): 52 – 56.
- [4] 王英, 张超, 付建新, 等. 桂花花芽分化和花开放研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2016, **33**(2): 340 – 347. WANG Ying, ZHANG Chao, FU Jianxin, *et al.* Progresses on flower bud differentiation and flower opening in *Osmanthus fragrans* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2016, **33**(2): 340 – 347.
- [5] 曹际云. 桂花不同栽培变种的成花条件及花器官发育的形态解剖学研究[D]. 济南: 山东大学, 2008. CAO Jiyun. *The Study on the Qualification of Floral Formation and Development of Floral Organs of Osmanthus fragrans* [D]. Ji’nan: Shandong University, 2008.
- [6] 韩远记. 桂花花色变异的机理和不同花色品种花瓣的 cDNA-AFLP 差异分析[D]. 开封: 河南大学, 2014. HAN Yuanji. *Mechanism of Flower Color Variation and cDNA-AFLP Analysis of 2 Clutivar with Different Flower Color in Osmanthus fragrans* [D]. Kaifeng: Henan University, 2014.
- [7] 母洪娜, 孙陶泽, 杨秀莲, 等. 两个桂花品种花色色素相关基因的差异表达[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2015, **39**(3): 183 – 186. MU Hongna, SUN Taoze, YANG Xiulian, *et al.* Differential expression of flower color related genes of *Osmanthus fragrans* Lour. ‘Chenghongdangui’ and ‘Zaoyingui’ [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2015, **39**(3): 183 – 186.
- [8] LI Fafang, HUANG Qizhi. Analysis of fragrance composition in three cultivars of *Osmanthus fragrans* Albus group flower by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Wuhan Univ J Nat Sci*, 2011, **16**(4): 342 – 348.
- [9] 侯丹, 付建新, 张超, 等. 桂花品种‘堰虹桂’‘玉玲珑’和‘杭州黄’的香气成分及释放节律[J]. 浙江农林大学学报, 2015, **32**(2): 208 – 220. HOU Dan, FU Jianxin, ZHANG Chao, *et al.* Flower scent composition of *Osmanthus fragrans* ‘Yanhong Gui’ ‘Yu Linglong’ and ‘Hangzhou Huang’, and their emission patterns [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2015, **32**(2): 208 – 220.
- [10] de OLIVEIRA L A, BRETON M C, BASTOLLA F M, *et al.* Reference genes for the normalization of gene expression in *Eucalyptus* species [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, **53**(2): 405 – 422.
- [11] PINTO F, PACHECO C C, FERREIRA D, *et al.* Selection of suitable reference genes for RT-qPCR analyses in cyanobacteria [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(4): e34983. doi: 10.1371/journal.pone.0034983.
- [12] ZHANG Chao, FU Jianxin, WANG Yiguang, *et al.* Identification of suitable reference genes for gene expression normalization in the quantitative real-time PCR analysis of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans* Lour.) [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(8): e0136355. doi: 10.1371/journal.pone.0136355.
- [13] ARTICO S, NARDELI S, BRILHANTE O, *et al.* Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, **10**(1): 49 – 60.
- [14] JAIN M, NIJHAWAN A, TYAGI A K, *et al.* Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **345**(2): 646 – 651.
- [15] 胡瑞波, 范成明, 傅永福. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择[J]. 中国农业科技导报, 2009, **11**(6): 30 – 36. HU Ruibo, FAN Chengming, FU Yongfu. Reference gene selection in plant real-time quantitative reserve transcription PCR (qRT-PCR) [J]. *J Agric Sci Technol*, 2009, **11**(6): 30 – 36.
- [16] 陆婷, 王艺光, 骆义波, 等. ‘四季桂’不同季节的花芽分化与发育比较[J]. 园艺学报, 2017, **44**(6): 1145 – 1156. LU Ting, WANG Yiguang, LUO Yibo, *et al.* Comparison on flower bud differentiation and development of different seasons in *Osmanthus fragrans* ‘Sijigui’ [J]. *Acta Horti Sin*, 2017, **44**(6): 1145 – 1156.
- [17] 付建新, 张超, 王艺光, 等. 桂花组织基因表达中荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 浙江农林大学学报, 2016, **33**(5): 727 – 733. FU Jianxin, ZHANG Chao, WANG Yiguang, *et al.* Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) normalization in the gene expression of sweet osmanthus tissue [J]. *J Zhejiang A&F U-*

- niv*, 2016, **33**(5): 727 – 733.
- [18] WEI Libin, MIAO Hongmei, ZHAO Ruihong, *et al.* Identification and testing of reference genes for sesame gene expression analysis by quantitative real-time PCR [J]. *Planta*, 2013, **237**(3): 873 – 889.
- [19] DIE J V, ROMÁN B, NADAL S, *et al.* Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions [J]. *Planta*, 2010, **232**(1): 145 – 153.
- [20] 涂礼莉, 张献龙, 刘迪秋, 等. 棉花纤维发育和体细胞胚发生过程中实时定量 PCR 内对照基因的筛选[J]. 科学通报, 2007, **52**(20): 2379 – 2385.
TU Lili, ZHANG Xianlong, LIU Diqiu, *et al.* Suitable internal control genes in qRT-PCR normalization in cotton fiber development and somatic embryogenesis [J]. *Chin Sci Bull*, 2007, **52**(20): 2379 – 2385.
- [21] LI Haiyan, DONG Yuanyuan, YANG Jing, *et al.* *De novo* transcriptome of safflower and the identification of putative genes for oleosin and the biosynthesis of flavonoids [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(2): e30987. doi: 10.1371/journal.pone.0030987.
- [22] 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.
- [23] BUSTIN S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems [J]. *J Mol Endocrinol*, 2002, **29**(1): 23 – 39.
- [24] 尹静, 任春林, 詹亚光, 等. 可用于实时荧光定量 PCR 标准化的白桦内参基因[J]. 植物生理学通讯, 2010, **46**(10): 1061 – 1066.
YIN Jing, REN Chunlin, ZHAN Yaguang, *et al.* Selection of internal control genes for real-time RT-PCR normalization in white birch (*Betula platyphylla* Suk.) [J]. *Plant Physiol Commun*, 2010, **46**(10): 1061 – 1066.
- [25] van GUILDER H D, VRANA K, FREEMAN W A. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis [J]. *BioTechniques*, 2008, **44**(5): 619 – 626.
- [26] 杨晶, 卢玉彬, 迟孟涵, 等. 红花种子不同发育时期内参基因表达稳定性分析[J]. 中草药, 2017, **48**(9): 1845 – 1850.
YANG Jing, LU Yubin, CHI Menghan, *et al.* Analysis on stability of reference genes in different developmental stages of seeds from *Carthamus tinctorius* [J]. *Chin Tradit Herbal Med*, 2017, **48**(9): 1845 – 1850.
- [27] MOURA J C, ARAÚJO P, BRITO M S, *et al.* Validation of reference genes from *Eucalyptus* spp. under different stress conditions [J]. *BMC Res Notes*, 2012, **5**: 634.
- [28] 胡瑞波. 大豆 *FT/TFL1* 基因克隆、表达模式及功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
HU Ruibo. *Molecular Cloning, Expression Profiles and Functional Analysis of FT/TFL1 Genes in Soybean (Glycine max)* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009.
- [29] 李琼琼. 大豆 *NCED1* 基因及其启动子的克隆、表达载体的构建及植物转化[D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.
LI Qiongqiong. *Cloning, Construction of Plant Expression Vector and Transformation of GmNCED1 Gene and Promoter from Glycine max* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2012.
- [30] 齐月爱. 玉米在非生物胁迫和激素处理条件下实时荧光定量 PCR 内参基因的选择[D]. 成都: 四川农业大学, 2012.
LIN Yueai. *Reference Gene Selection for Quantitative Real-time PCR in Maize Treated with Abiotic Stresses and Hormones* [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2012.
- [31] 宋雄. 欧芹不同逆境条件下适宜内参基因的筛选[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
SONG Xiong. *Screening Suitable Reference Genes under Different Stresss Conditions in Parsley* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.