

番茄不同组织及不同激素处理下内参基因的筛选

缪蝶[#], 张舒心, 王鹏^{*}

(海南大学 热带农林学院, 海南海口, 570228 中国)

摘要: 番茄 (*Solanum lycopersicum*) 是遗传学和分子生物学的研究模型。近年来, 番茄内参基因的筛选已有较多的研究报道, 但关于外源植物激素处理的种类较少, 因此, 本研究尝试筛选番茄在不同外源植物激素处理和不同组织部位中稳定表达的内参基因。为筛选番茄不同组织部位及植物激素处理下稳定表达的内参基因, 以 *DANJ*、*EF-1 α* 、*ACT*、*UBI*、*APT*、*CAC*、*TIP41* 和 *RPL8* 作为候选内参基因, 在生长素、赤霉素、脱落酸、细胞分裂素、水杨酸、油菜素内酯、乙烯和不同组织部位 8 种试验条件下, 利用 geNorm、NormFinder、BestKeeper、Delta CT 和 RefFinder 等算法对候选内参基因的稳定性进行综合评估, 并通过生长素响应基因 *SIGH3.4* 对内参基因的稳定性进行验证。结果显示, *APT* 是生长素、赤霉素、脱落酸、油菜素内酯处理和不同组织部位中表达最稳定的内参基因, *UBI* 是全部样品中、细胞分裂素和水杨酸处理下最稳定的内参基因; *TIP41* 是乙烯处理下表达最稳定的内参基因。最后, 以综合排名较稳定的 *APT* 作为内参基因时发现, *SIGH3.4* 基因的表达水平在生长素 (IAA) 处理条件下显示出相似的趋势, 而稳定性较差的 *RPL8* 基因未能对目的基因的表达量进行准确校正。该研究结果可为后续番茄响应外源激素处理的基因表达网络分析和分子调控机制研究提供理论支撑。

关键词: 番茄; 激素; 内参基因; qRT-PCR; 基因表达分析

中图分类号: S641.2 文献标志码: A 文章编号: 1674 – 7054(2026)02 – 0327 – 13

缪蝶, 张舒心, 王鹏. 番茄不同组织及不同激素处理下内参基因的筛选[J]. 热带生物学报(中英文), 2026, 17(2): 327–339. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.20240140 CSTR: 32425.14.j.cnki.rdsxb.

20240140



实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 因其重复性、特异性和灵敏度等方面的优点, 常被研究人员用于评估目的基因的表达水平^[1-2]。在利用 qRT-PCR 检测目的基因的表达水平时, 需选择稳定表达的内参基因作为内源性的参照基因对结果进行校正, 以降低样本之间的差异^[3]。因此, 内参基因的表达应在所需检测的全部样本中是稳定的, 且不受试验条件的影响。近年的研究表明, 不同试验条件或不同植物组织部位中稳定表达的内参基因有差异^[4-5]。例如, 柳杉 (*Cryptomeria japonica*) 在脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 处理下, 稳定表达的内参基因为 *ACT*, 但在赤霉素 (Gibberellins, GA)、水杨酸 (Salicylic acid, SA) 和茉莉酸甲酯 (Methyl jasmonate, MeJA)

处理下 *ACT* 的稳定性较差^[6]; 管花肉苻蓉 (*Cistanche tubulosa*) 不同组织部位中表达最稳定的内参基因是 *DNAJ*, 但在 ABA 和 GA 处理下, *DNAJ* 的稳定性不如 *EF-1 α* ^[7]。上述研究结果表明, 随着试验条件的变化稳定内参基因的表达也可能会出现波动, 因此, 需要根据不同的试验条件筛选稳定的内参基因。

植物的生长发育和环境适应性受多种植物激素的综合调控。例如, 生长素响应因子 (auxin response factor, ARF) 通过生长素 (auxin, IAA) 和 GA 信号串扰共同调控番茄果实成熟^[8]; ARF7 通过 IAA 和 SA 信号串扰调控拟南芥的侧根发育以响应病原菌的入侵^[9]; 基因 *BZRI* (brassinazole-resistant 1) 通过油菜素内酯 (brassinosteroid, BR)



收稿日期: 2024-09-04

修回日期: 2024-11-20

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (No.324RC457); 海南省教育厅研究生创新项目 (Nos.Qhys2023-247、Qhys2023-249)

[#]第一作者: 缪蝶 (2000–), 女, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: 2332708189@qq.com

^{*}通信作者: 王鹏 (1993–), 男, 副教授, 博士生导师。研究方向: 作物抗病抗逆分子生物学, E-mail: wp136@hainanu.edu.cn

和 GA 信号串扰调节水稻的生长发育^[10]。上述研究表明,植物激素信号途径的关键基因可能受到多种植物激素信号的调控。因此,在分析和验证植物激素响应基因的表达水平时,应优先选择在多种植物激素处理条件下表达水平均较为稳定的内参基因^[11-12]。

番茄(*Solanum lycopersicum*)是遗传学和分子生物学的研究模型。近年来,番茄内参基因的筛选已有较多的研究报道,但关于外源植物激素处理的种类较少。例如,白圣懿等^[13]的研究仅针对 ABA、MeJA 和 SA 等 3 种外源植物激素处理下的稳定内参基因进行了筛选;韩晓雪等^[14]对番茄不同组织部位中内参基因的稳定性进行了筛选,但研究内容未涉及不同外源植物激素处理条件,因此仍需筛选番茄在不同外源植物激素处理和不同组织部位中稳定表达的内参基因。基于此,本研究以番茄不同组织部位及 IAA、GA、ABA、细胞分裂素(cytokinin, CTK)、SA、BR 和乙烯(ethylene, ETH)7 种植物激素为处理条件,以 *DANJ*、*EF-1 α* 、*ACT*、*UBI*、*APT*、*CAC*、*TIP41* 和 *RPL8* 作为候选内参基因,利用 geNorm、NormFinder、BestKeeper、Delta CT 和 RefFinder 等算法综合评估候选内参基因的稳定性,研究结果可为后续番茄响应外源激素处理的基因表达网络分析和分子调控机制研究提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料和培养条件 本试验中的番茄品种为“Alisa Craig”(AC)。番茄种子用 5%(v/v)的次氯酸钠溶液消毒 5 min,无菌水清洗 3 次,再用 75%(v/v)的乙醇消毒 30 s,无菌水清洗 3 次。番茄种子在无菌培养皿中萌发后,将发芽的种子转移到 1/4 强度的霍格兰营养液中生长。置于光周期为光/暗=12 h/12 h、温度为(24 ± 1) °C 的培养箱中。

1.2 激素处理和样品采集 选择 14 d 龄长势一致且健康的水培番茄幼苗进行处理,外源植物激素的处理浓度参考 Xu 等^[12]的方法,使用 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA、0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BR 及 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ETH,参考 Omena-Garcia 等^[15]的方法,使用 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA,参考 Hu 等^[16]的方法,使用 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA,参考 Lu 等^[17]的方法,使用 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

CTK。参考 Albuquerque 等^[18]的方法收集不同处理组 0、3 和 6 h 番茄的根、茎和叶片组织提取 RNA 并反转录为 cDNA,然后将同一处理条件下的根、茎和叶片组织的 cDNA 按照时间段等量混合用于 qRT-PCR 分析。不同组织部位的样品为收集的正常水培条件下番茄的根、茎和叶片组织样品。每个处理均重复 3 次。样品置于液氮中,−80 °C 冰箱保存备用。

1.3 RNA 的提取及 cDNA 合成 使用植物组织总 RNA 提取试剂盒(天根, N2730, 中国)提取番茄不同处理组的总 RNA,提取步骤按照试剂盒的说明书进行。使用 ToloScript 第一链 cDNA 合成试剂盒(ToLoBio, 中国上海)合成 cDNA,操作步骤参考说明书,cDNA 置于−20 °C 冰箱保存备用。

1.4 候选内参基因的引物合成 选择 DNAJ 蛋白(DnaJ-like protein/Protein binding/folding, DNAJ)、延伸因子(Elongation factor 1 - α , EF-1 α)、肌动蛋白(Actin, ACT)、泛素(Ubiquitin 3, UBI)、腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Adenine phosphoribosyltransferase, APT)、网格蛋白连接复合物介质(Clatrin adaptor complexes medium subunit, CAC)、相互作用蛋白(TIP41-like protein, TIP41)和 60S 核糖体蛋白(60S ribosomal protein L8, RPL8)等 8 个常见的内参基因作为候选内参,基因及引物序列来源于文献,引物由北京六合华大基因科技有限公司合成,详细信息见表 1。

1.5 内参基因引物特异性检测 以番茄不同组织的 cDNA 等量混合为模版,对 8 个候选内参基因进行 PCR 扩增,扩增反应体系 10.0 μL : 2 \times Taq Plus Master Mix(Dye Plus)5.0 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上、下游引物各 0.4 μL , 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ cDNA 模版 0.2 μL , RNase-Free ddH₂O 补足至 10.0 μL 。扩增程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 15 s, 以上 3 个步骤 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 待 PCR 反应完成之后,使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。以所有样本的 cDNA 为模板,根据 qRT-PCR 系统的熔解曲线进行引物特异性检测。每个样本 3 次重复。

1.6 qRT-PCR 检测 以所有样本的 cDNA 为模版在 qTower3 实时荧光定量 PCR 系统 (Analytikjena, GER)中使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(Vazyme)检测候

表 1 候选内参基因引物序列

Tab. 1 Primer sequences of candidate reference genes

基因 Gene	基因ID Gene ID	引物序列5'—3'(F and R) Primer sequence	参考文献 References
<i>DNAJ</i>	Solyc04g081530	GAGCACACATTGAGCCTTGAC CTTTGGTACATCGGCATTCC	[19]
<i>EF-1α</i>	Solyc05g693059	GATTGACAGACGTTCTGGTAAGGA ACCGGCATCACCATTCTTCA	[20]
<i>ACT</i>	Solyc03g078400	GTCCTCTCCAGCCATCCAT ACCACTGAGCACAATGTTACCG	[20]
<i>UBI</i>	Solyc11g056940	TCGTAAGGAGTGCCCTAATGCTGA CAATCGCCTCCAGCCTTGTTGTAA	[21]
<i>APT</i>	Solyc04g077970	GAACAGACAAGATTGAGATGCATGTA CCACGAGGGCACGTTCA	[20]
<i>CAC</i>	Solyc08g006960	CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG	[22]
<i>TIP41</i>	Solyc10g049850	ATGGAGTTTTTGTGATCTTCTGC GCTGCGTTTCTGGCTTAGG	[19]
<i>RPL8</i>	Solyc10g006580	CCGAAGGAGCTGTTGTTTGTA ACCTGACCAATCATAGCACGA	[22]

选内参基因的 Ct 值, 反应体系 15.0 μL : $2\times\text{Taq Plus Master Mix}$ 7.5 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正、反向引物各 0.3 μL , 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ cDNA 模版 1.0 μL , RNase-free ddH₂O 补足至 15.0 μL 。扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 45 s, 以上 2 个步骤进行 40 个循环, 60 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 15 s, 每个样本 3 次重复。

1.7 候选内参基因的稳定性分析 根据 qRT-PCR 得到的结果绘制候选内参基因 Ct 值的箱线图。候选内参基因的稳定性分析使用 geNorm、NormFinder、BestKeeper、Delta CT 等算法评估, 通过 RefFinder(<http://www.heartcure.com.au/reffinder/>) 在线程序综合分析候选内参基因的稳定性。

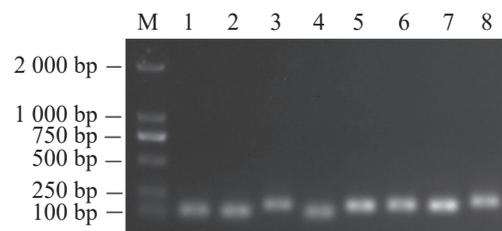
1.8 内参基因的稳定性验证 选择长势一致的 14 d 苗龄番茄幼苗, 将幼苗置于 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 的营养液中处理, 收集处理后 0、3 和 6 h 的番茄根、茎和叶部组织, 按照 1.3 的方法提取总 RNA 和合成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 根据 IAA 处理和不同组织中筛选的最稳定和最不稳定的基因为内参, 使用 qRT-PCR 仪检测样本中 *SIG3.4* 基因的表达情况, 体系和程序同 1.6, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算, 每个样本重复 3 次, 目的基因

引物序列参考 Chen 等^[23]。

1.9 数据分析 使用 Graphpad Prism 软件绘图; 使用 SPSS 26.0 软件进行显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因特异性扩增 以不同组织等量混合的 cDNA 为模板, 对 8 个候选内参基因进行 PCR 扩增, 并使用 1%(v/v) 的琼脂糖凝胶进行电泳检测扩增产物的特异性。如图 1 所示, 挑选的 8 个候选内参基因 PCR 的扩增产物条带单一, 无引物二聚体, 且 PCR 扩增片段的大小与预测一



1: *APT*; 2: *EF-1 α* ; 3: *RPL8*; 4: *ACT*; 5: *UBI*; 6: *DNAJ*; 7: *CAC*; 8: *TIP41*; M: DL2000.

图 1 候选内参基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of routine PCR amplification of candidate reference genes in tomato root, stem and leaf tissues

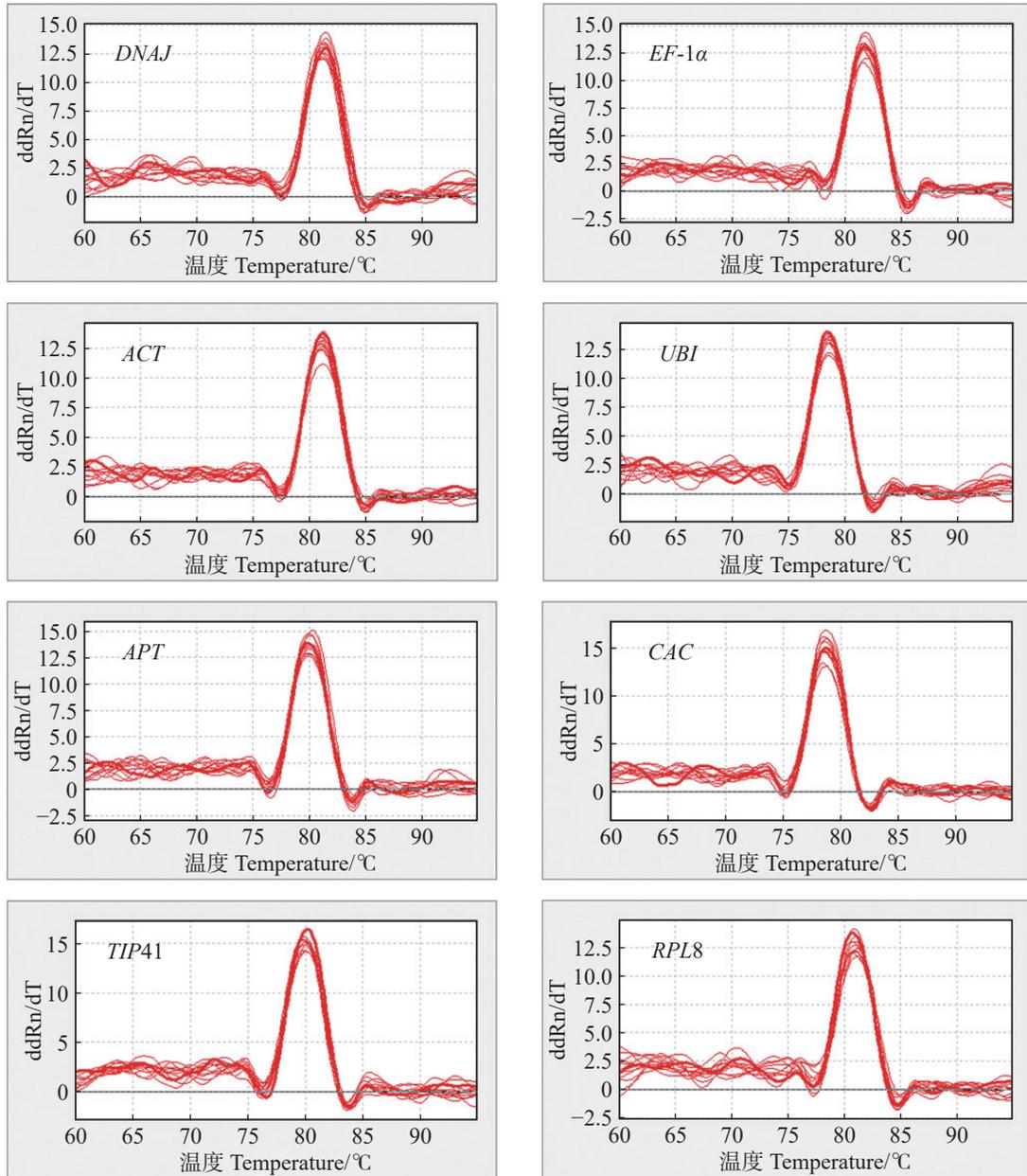


图 2 候选内参基因的熔解曲线

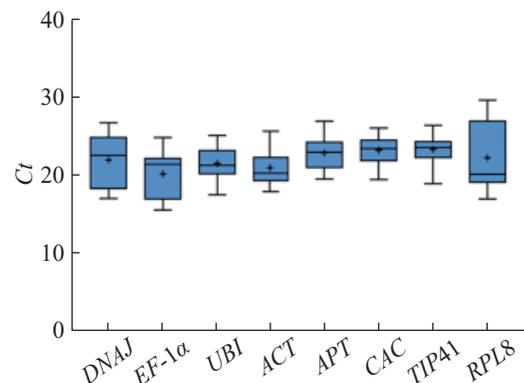
Fig. 2 Melting curve of tomato candidate reference genes

致。由图 2 可知, 8 个内参基因的熔解曲线都呈现单峰, 表明了候选内参基因引物具有较高的特异性和可靠性, 可进行后续实验。

2.2 不同处理下番茄幼苗候选内参基因表达的稳定性分析

2.2.1 C_t 值分析

根据所有样品中的 C_t 值分布情况绘制箱线图(图 3)。 C_t 值越低, 说明基因的表达丰度越高。8 个候选内参基因的 C_t 值范围为 15.42 ~ 29.55, 其中 *EF-1α* 的平均 C_t 值最低(平均 C_t 值 20.18), 表达丰度最高, *TIP41* 的表达丰度最低(平均 C_t 值 23.32)。*RPL8* 和 *DNAJ* 基因的波动范围较大, 在所有样品中表达均不稳定。其他基

图 3 所有样品中 8 个候选内参基因的 C_t 值Fig. 3 C_t values of 8 candidate reference genes in all the samples

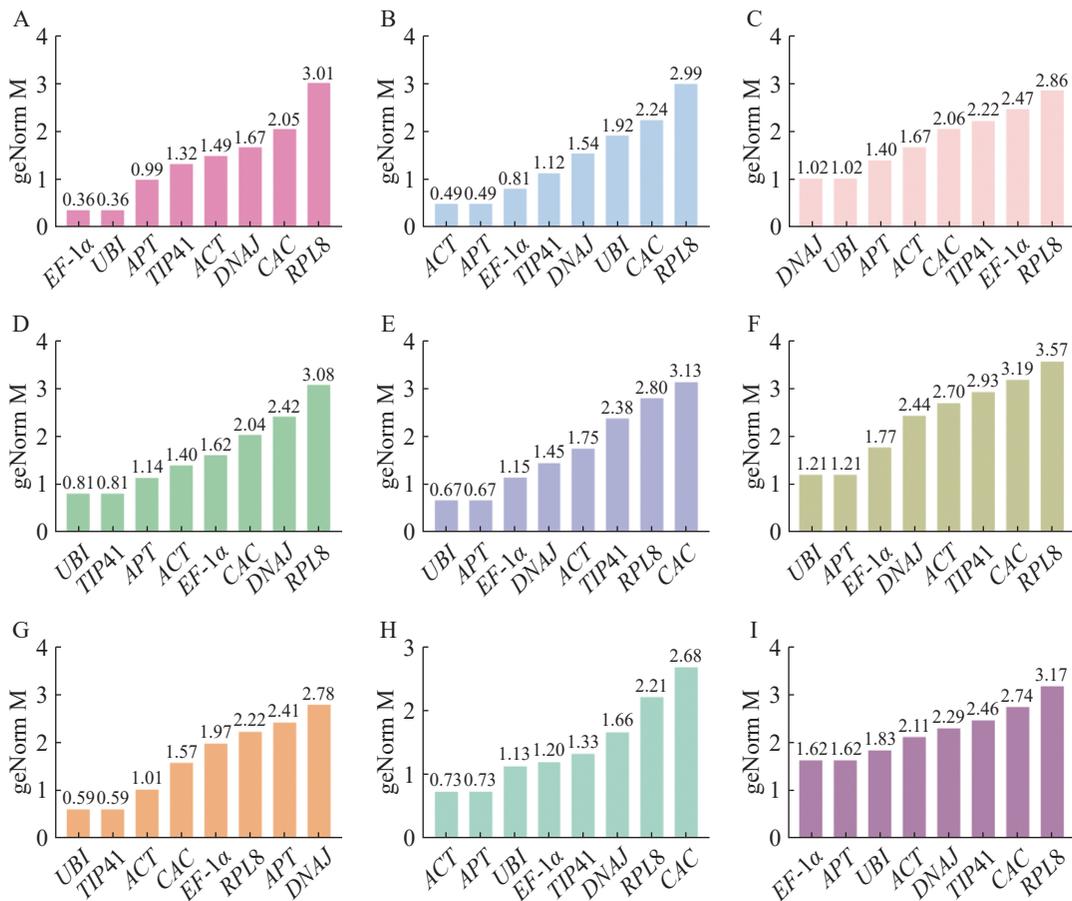
因的 *Ct* 值离散程度大体相同, 没有明显区别。

2.2.2 geNorm 和 NormFinder 分析 geNorm 分析是用 *M* 值(稳定值)评估内参基因的稳定性, 阈值为 1.5, 且 *M* 值越小稳定性越好^[24]。根据 geNorm 分析结果(图 4), 在生长素处理下 *EF-1 α* 和 *UBI* 表达最稳定; 赤霉素处理和不同组织中 *ACT* 和 *APT* 表达最稳定; 脱落酸处理下, *DNAJ* 和 *UBI* 表达最稳定; 细胞分裂素和乙烯处理下的最佳内参基因是 *UBI* 和 *TIP41*; 油菜素内酯和水杨酸处理下 *APT* 和 *UBI* 是最稳定的内参基因。在所有样品中, 候选内参基因的表达稳定性强弱排序为 *EF-1 α* = *APT* > *UBI* > *ACT* > *DNAJ* > *TIP41* > *CAC* > *RPL8*, *APT* 和 *EF-1 α* 是最稳定的内参基因。

NormFinder 分析是通过方差分析(*S* 值)评估内参基因的稳定性, *S* 值越小稳定性越好^[25]。如图 5 所示, 在生长素、赤霉素、脱落酸和油菜素内酯处理下的最佳内参基因为 *APT*; 乙烯处理下

的最佳内参基因为 *ACT*; 不同组织中最稳定的内参基因为 *TIP41*。在所有样品中, *UBI* 是表达最稳定的内参基因, 同时也是细胞分裂素和水杨酸处理下最稳定的内参基因。

2.2.3 BestKeeper 分析 用 BestKeeper 软件测算 *SD* 值(标准偏差)和 *CV* 值(变异系数)来评估内参基因表达的稳定性, *SD* 值和 *CV* 值越小, 内参基因的稳定性越高^[26]。从表 2 可知, 在赤霉素和水杨酸处理下 *SD* 值和 *CV* 值最小的内参基因为 *CAC*; 脱落酸处理和不同组织中 *SD* 值和 *CV* 值最小的内参基因分别是 *ACT* 和 *APT*; 其余处理下 *SD* 值和 *CV* 值最小的内参基因均为 *TIP41*。此外, BestKeeper 软件还可以对内参基因的 *Ct* 值测算相关性系数(*r*), *SD* 值和 *CV* 值越小且 *r* 值较高的内参基因越稳定^[27]。在脱落酸处理下 *ACT* 的 *r* 值为 0.652; 不同组织中 *APT* 的 *r* 值为 0.991; 其余处理下排名最高的内参基因 *r* 值均较低, 但最终排名需

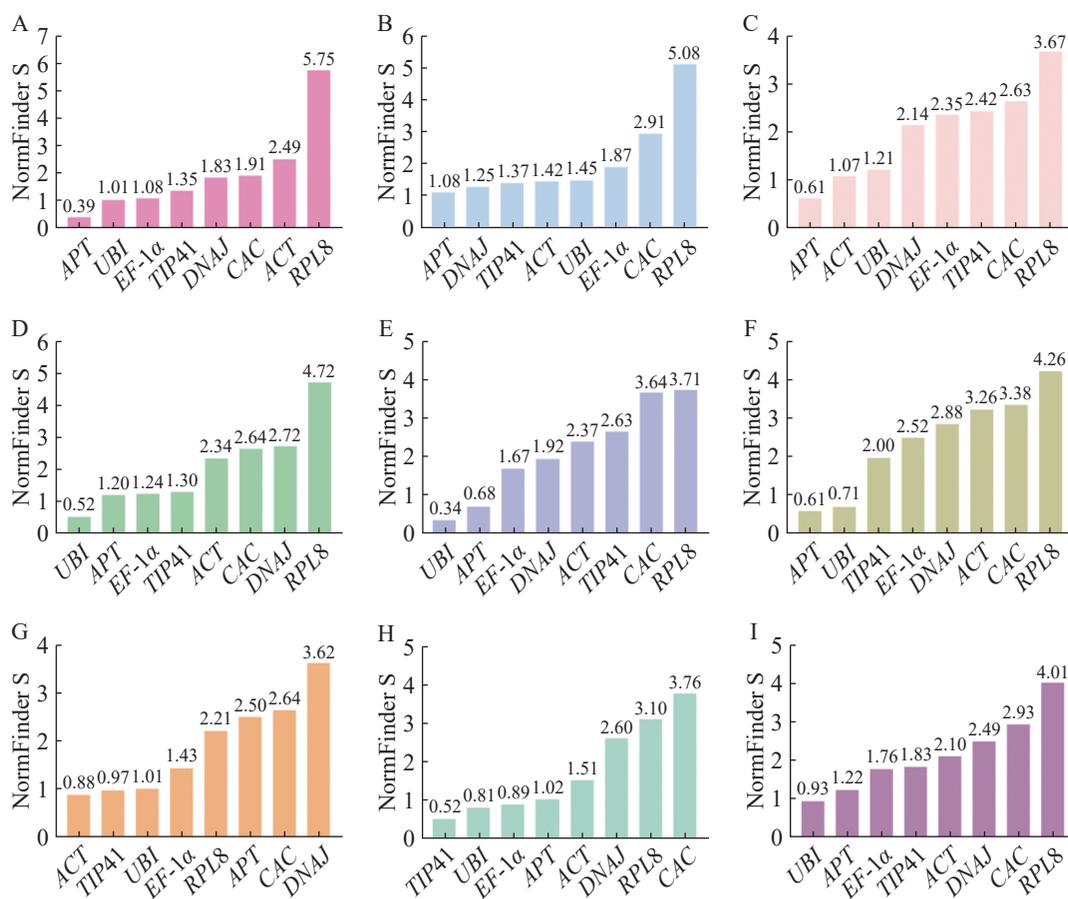


A. 生长素处理; B. 赤霉素处理; C. 脱落酸处理; D. 细胞分裂素处理; E. 水杨酸处理; F. 油菜素内酯处理; G. 乙烯处理; H. 不同组织; I. 所有样品。

A. Auxin treatment; B. Gibberellin treatment; C. Abscisic acid treatment; D. Cytokinin treatment; E. Salicylic acid treatment; F. Brassinosteroid treatment; G. Ethylene treatment; H. Different plant parts; I. All the samples.

图 4 geNorm 分析不同处理下番茄幼苗中候选内参基因的稳定性

Fig. 4 geNorm analysis of stability of candidate internal reference genes in tomato seedlings under different treatments



A. 生长素处理; B. 赤霉素处理; C. 脱落酸处理; D. 细胞分裂素处理; E. 水杨酸处理; F. 油菜素内酯处理; G. 乙烯处理; H. 不同组织; I. 所有样品。

A. Auxin treatment; B. Gibberellin treatment; C. Abscisic acid treatment; D. Cytokinin treatment; E. Salicylic acid treatment; F. Brassinosteroid treatment; G. Ethylene treatment; H. Different plant parts; I. All the samples.

图 5 NormFinder 分析不同处理下番茄幼苗中候选内参基因的稳定性

Fig. 5 NormFinder analysis of stability of candidate internal reference genes in tomato seedlings under different treatments

表 2 BestKeeper 分析结果

Tab. 2 BestKeeper analysis results

生长素 Auxin				赤霉素 Gibberellin				排名 Rank
基因 Gene	SD	CV	r	基因 Gene	SD	CV	r	
<i>TIP41</i>	0.86	3.68	0.311	<i>CAC</i>	0.73	3.07	0.001	1
<i>CAC</i>	1.06	4.52	0.001	<i>TIP41</i>	1.10	4.66	0.668	2
<i>APT</i>	1.11	5.39	0.778	<i>APT</i>	1.93	8.73	0.840	3
<i>UBI</i>	1.94	9.36	0.924	<i>ACT</i>	1.96	9.29	0.788	4
<i>EF-1α</i>	2.06	10.65	0.942	<i>UBI</i>	2.33	10.85	0.845	5
<i>ACT</i>	2.24	10.66	0.433	<i>EF-1α</i>	2.69	13.32	0.857	6
<i>DNAJ</i>	2.75	12.47	0.985	<i>DNAJ</i>	2.82	13.07	0.994	7
<i>RPL8</i>	4.35	19.59	0.180	<i>RPL8</i>	4.73	21.43	0.593	8
细胞分裂素 Cytokinin				脱落酸 Abscisic acid				排名 Rank
基因 Gene	SD	CV	r	基因 Gene	SD	CV	r	
<i>TIP41</i>	0.52	2.12	0.001	<i>ACT</i>	0.32	1.60	0.652	1
<i>UBI</i>	0.62	2.87	0.299	<i>CAC</i>	0.84	3.46	0.001	2
<i>CAC</i>	1.35	5.79	0.001	<i>TIP41</i>	1.08	4.68	0.001	3
<i>APT</i>	1.36	6.21	0.528	<i>APT</i>	1.49	6.68	0.999	4
<i>EF-1α</i>	1.81	8.95	0.948	<i>UBI</i>	1.90	8.72	0.852	5
<i>ACT</i>	2.11	9.61	0.422	<i>DNAJ</i>	2.09	9.81	0.691	6
<i>DNAJ</i>	2.95	12.61	0.989	<i>EF-1α</i>	3.06	14.77	0.996	7
<i>RPL8</i>	3.81	16.59	0.312	<i>RPL8</i>	3.82	16.68	0.801	8

表 2 续表 2 Tab.2 Continued

油菜素内酯 Brassinolide				乙烯 Ethylene				排名 Rank
基因 Gene	<i>SD</i>	<i>CV</i>	<i>r</i>	基因 Gene	<i>SD</i>	<i>CV</i>	<i>r</i>	
<i>TIP41</i>	0.78	3.57	0.001	<i>TIP41</i>	0.41	1.83	0.001	1
<i>CAC</i>	1.47	6.57	0.001	<i>UBI</i>	0.51	2.43	0.001	2
<i>APT</i>	1.77	7.82	0.986	<i>ACT</i>	0.94	4.70	0.416	3
<i>UBI</i>	2.04	9.57	0.906	<i>CAC</i>	1.50	6.75	0.001	4
<i>DNAJ</i>	2.49	11.83	0.512	<i>RPL8</i>	1.75	7.84	0.345	5
<i>ACT</i>	2.60	12.06	0.267	<i>EF-1α</i>	1.77	8.54	0.910	6
<i>EF-1α</i>	3.34	16.02	0.988	<i>APT</i>	2.44	10.62	0.785	7
<i>RPL8</i>	4.28	19.29	0.739	<i>DNAJ</i>	2.90	13.08	0.598	8

水杨酸 Salicylic acid				不同组织 Different tissues				排名 Rank
基因 Gene	<i>SD</i>	<i>CV</i>	<i>r</i>	基因 Gene	<i>SD</i>	<i>CV</i>	<i>r</i>	
<i>CAC</i>	1.43	6.07	0.001	<i>APT</i>	1.23	5.03	0.991	1
<i>TIP41</i>	1.65	7.04	0.001	<i>CAC</i>	1.32	5.87	0.001	2
<i>UBI</i>	1.67	7.69	0.984	<i>ACT</i>	1.83	9.13	0.712	3
<i>APT</i>	1.94	8.62	0.987	<i>UBI</i>	1.94	8.72	0.926	4
<i>ACT</i>	1.94	8.90	0.420	<i>TIP41</i>	2.21	9.87	0.770	5
<i>DNAJ</i>	2.31	10.96	0.765	<i>EF-1α</i>	2.28	11.92	0.964	6
<i>EF-1α</i>	2.56	12.64	0.931	<i>RPL8</i>	2.91	13.70	0.541	7
<i>RPL8</i>	3.79	17.38	0.754	<i>DNAJ</i>	3.69	16.03	0.998	8

所有样品 All Samples				排名 Rank
基因 Gene	<i>SD</i>	<i>CV</i>	<i>r</i>	
<i>TIP41</i>	1.17	5.01	0.194	1
<i>CAC</i>	1.37	5.92	0.001	2
<i>UBI</i>	1.68	7.80	0.839	3
<i>ACT</i>	1.82	8.68	0.466	4
<i>APT</i>	1.88	8.46	0.803	5
<i>EF-1α</i>	2.50	12.41	0.894	6
<i>DNAJ</i>	2.86	13.03	0.782	7
<i>RPL8</i>	3.68	16.56	0.550	8

注: 所有样品表示不同组织和不同外源植物激素处理下的样品。

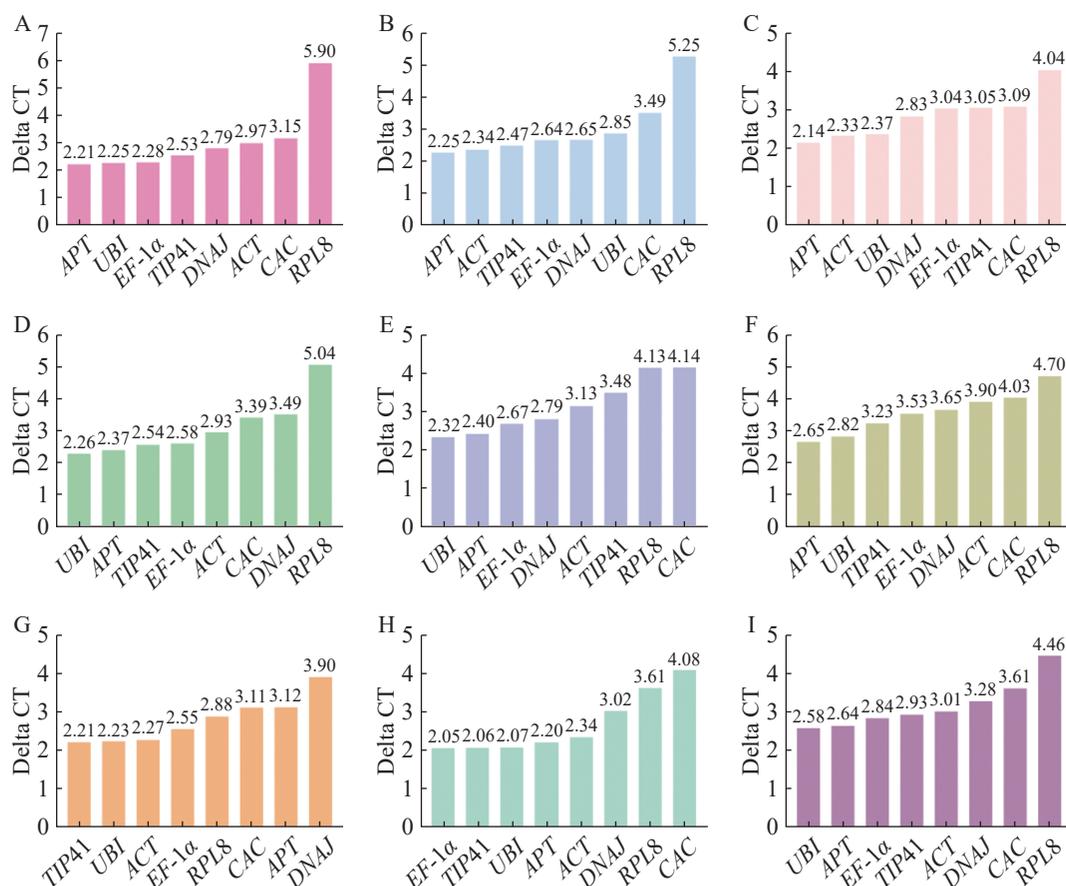
Note: All samples represent those under different plant parts and different exogenous plant hormone treatments.

要综合 *SD* 值和 *CV* 值分析。因此, 在赤霉素和水杨酸处理下最稳定的内参为 *CAC*; 脱落酸处理下最稳定的内参为 *ACT*; 不同组织中最稳定内参为 *APT*; 其余处理下最稳定的内参均为 *TIP41*。

2.2.4 Delta CT 分析结果 Delta CT (ΔCt) 法是根据基因表达差异的可重复性对候选基因稳定性进行排序, 计算公式为 $Q = E\Delta Ct$, Delta CT 值越小, 内参基因稳定性越好^[28]。分析结果(图 6)表明, 在

生长素、赤霉素、脱落酸和油菜素内酯处理下, *APT* 均能稳定表达; 乙烯处理下的最佳内参基因为 *TIP41*; 不同组织中表达最稳定的内参基因为 *EF-1 α* 。在所有样品中、细胞分裂素和水杨酸处理下 *UBI* 表达最稳定。

2.2.5 候选内参基因表达稳定性的综合分析 geNorm、NormFinder、BestKeeper、Delta CT 等 4 种算法的结果有一定的偏差, 是 4 种算法的原理



A. 生长素处理; B. 赤霉素处理; C. 脱落酸处理; D. 细胞分裂素处理; E. 水杨酸处理; F. 油菜素内酯处理; G. 乙烯处理; H. 不同组织; I. 所有样品。
A. Auxin treatment; B. Gibberellin treatment; C. Abscisic acid treatment; D. Cytokinin treatment; E. Salicylic acid treatment; F. Brassinosteroid treatment; G. Ethylene treatment; H. Different plant parts; I. All the samples.

图 6 Delta CT 分析结果

Fig. 6 Delta CT analysis results

和程序不同导致。因此,本研究利用 RefFinder 在线程序对这 4 种算法进行综合评估。由表 3 可知,在生长素、赤霉素、脱落酸、油菜素内酯处理下和不同组织中 *APT* 表达最稳定;乙烯处理下表达最稳定的内参基因为 *TIP41*;在所有样品中、细

胞分裂素和水杨酸处理下最稳定的内参基因为 *UBI*。

2.3 内参基因的稳定性验证 IAA 作为促进和影响植物发育及生理变化的激素,几乎影响着植株形态发育的全过程^[29]。*GH3* 基因是早期响应 IAA 的关键基因之一^[30]。以 IAA 处理和不同组织中,综合排名最稳定的内参基因 *APT* 和最不稳定

表 3 候选内参基因表达稳定性综合分析结果

Tab. 3 Comprehensive analysis results of the expression stability of candidate reference genes

处理 Treatment	综合排名 Comprehensive ranking	排序 Sort	处理 Treatment	综合排名 Comprehensive ranking	排序 Sort
生长素 Auxin	<i>APT</i>	1	油菜素内酯 Brassinolide	<i>APT</i>	1
	<i>UBI</i>	2		<i>UBI</i>	2
	<i>EF-1α</i>	3		<i>TIP41</i>	3
	<i>TIP41</i>	4		<i>EF-1α</i>	4
	<i>CAC</i>	5		<i>DNAJ</i>	5
	<i>DNAJ</i>	6		<i>CAC</i>	6
	<i>ACT</i>	7		<i>ACT</i>	7
	<i>RPL8</i>	8		<i>RPL8</i>	8

续表 3 Tab. 3 Continued

处理 Treatment	综合排名 Comprehensive ranking	排序 Sort	处理 Treatment	综合排名 Comprehensive ranking	排序 Sort
赤霉素 Gibberellin	<i>APT</i>	1	乙烯 Ethylene	<i>TIP41</i>	1
	<i>ACT</i>	2		<i>UBI</i>	2
	<i>TIP41</i>	3		<i>ACT</i>	3
	<i>CAC</i>	4		<i>EF-1α</i>	4
	<i>DNAJ</i>	5		<i>CAC</i>	5
	<i>EF-1α</i>	6		<i>RPL8</i>	6
	<i>UBI</i>	7		<i>APT</i>	7
	<i>RPL8</i>	8		<i>DNAJ</i>	8
细胞分裂素 Cytokinin	<i>UBI</i>	1	水杨酸 Salicylic acid	<i>UBI</i>	1
	<i>TIP41</i>	2		<i>APT</i>	2
	<i>APT</i>	3		<i>EF-1α</i>	3
	<i>EF-1α</i>	4		<i>DNAJ</i>	4
	<i>ACT</i>	5		<i>TIP41</i>	5
	<i>CAC</i>	6		<i>CAC</i>	6
	<i>DNAJ</i>	7		<i>ACT</i>	7
	<i>RPL8</i>	8		<i>RPL8</i>	8
脱落酸 Abscisic acid	<i>APT</i>	1	不同组织 Different tissues	<i>APT</i>	1
	<i>ACT</i>	2		<i>TIP41</i>	2
	<i>UBI</i>	3		<i>EF-1α</i>	3
	<i>DNAJ</i>	4		<i>UBI</i>	4
	<i>CAC</i>	5		<i>ACT</i>	5
	<i>TIP41</i>	6		<i>CAC</i>	6
	<i>EF-1α</i>	7		<i>DNAJ</i>	7
	<i>RPL8</i>	8		<i>RPL8</i>	8
所有样品 All Samples	<i>UBI</i>	1			
	<i>APT</i>	2			
	<i>EF-1α</i>	3			
	<i>TIP41</i>	4			
	<i>ACT</i>	5			
	<i>CAC</i>	6			
	<i>DNAJ</i>	7			
	<i>RPL8</i>	8			

注: 所有样品表示不同组织和不同外源植物激素处理下的样品。

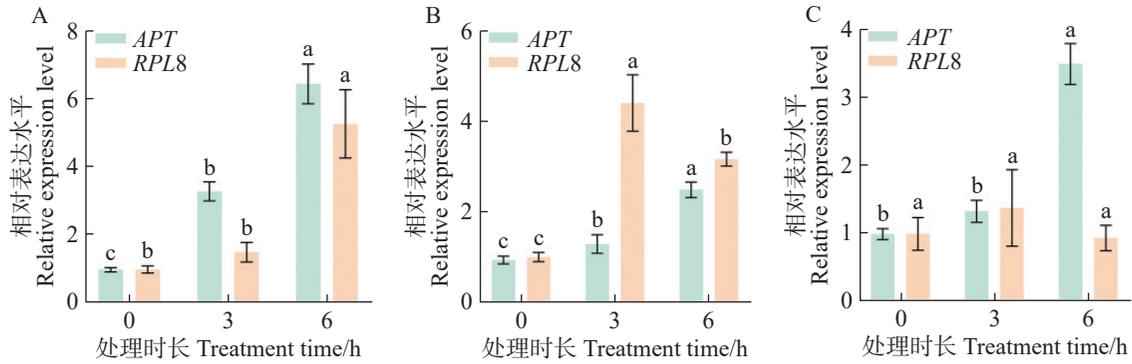
Note: All samples represent those under different plant parts and different exogenous plant hormone treatments.

的内参基因 *RPL8* 对生长素响应基因 *GH3.4* 进行不同组织部位的表达分析。结果(图 7)表明, 在 IAA 的诱导下, 以稳定的 *APT* 为内参基因时, *SIGH3.4* 基因在番茄根、茎和叶片中的表达模式都呈上升趋势, 表达差异显著。以不稳定的 *RPL8* 为内参基因时, 根部表达模式呈上升趋势, 而茎部和

叶片的表达模式呈先上升后下降的趋势, 表达量明显变化。以上结果表明筛选出的稳定内参基因较准确和可靠。

3 讨论

3.1 不同试验条件下内参基因的稳定性的不同 qRT-



不同字母表示同一内参基因校正下 *SIGH3.4* 基因表达的差异显著性 ($P < 0.05$)。A. 根; B. 茎; C. 叶。

Different letters indicate significant differences in *SIGH3.4* gene expression under the same reference gene correction ($P < 0.05$) A. Root; B. Stem; C. Leaf.

图 7 外源 IAA 诱导下 *SIGH3.4* 基因的表达模式

Fig. 7 Expression patterns of *SIGH3.4* gene induced by exogenous IAA

PCR 是评价目的基因表达水平的重要技术手段, 而内参基因的稳定性是保证试验结果精确度的关键影响因素^[31]。同一物种在不同试验条件下或者不同组织中内参基因的稳定性也存在差异, 因此选择合适的内参基因来减少试验中的误差是极其重要的^[32]。例如, 宋雄^[33]发现欧芹 (*Petroselinum crispum*) 在 SA 处理下 *ACT* 和 *EF-1 α* 表达的稳定性最佳, 但本研究结果显示, 番茄在 SA 处理条件下 *ACT* 的稳定性不如 *EF-1 α* , 这与白圣懿等^[13]的报道一致。此外, 黄丽萍等^[34]的研究结果显示, *APT* 和 *UBI* 在香瓜茄不同组织中表达稳定性最好。在本研究中, *APT* 和 *UBI* 不仅在番茄不同组织中表达较稳定, 还在不同植物激素条件下表达最稳定, 而在紫花苜蓿中^[35], 不同植物激素条件下 *ACT* 的表达最稳定, 这进一步说明不同试验条件下稳定表达的理想内参基因并不存在。综上所述, 本研究根据多种植物激素处理和不同组织中各内参基因稳定性的综合排名, 发现 *APT* 和 *UBI* 的表达相对较稳定。

3.2 不同算法评估内参基因的稳定性 内参基因稳定性的筛选方法因其各自的原理和程序不同, 故得出的结果也不同。番茄自交系“Hawaii 7996”在接种青枯菌菌株 ‘RS 489’ 后进行内参基因的稳定性筛选, 在 geNorm 和 NormFinder 算法中最稳定的内参基因均为 *TIP41*, 而 BestKeeper 分析结果显示最稳定的内参基因为 *UBI*^[18]。本研究中, 在 geNorm、NormFinder 和 Delta Ct 算法中 SA 和 BR 处理下最稳定的内参基因均为 *APT* 和 *UBI*, 而 BestKeeper 分析结果显示最稳定的内参基因分别为 *CAC* 和 *TIP41*。geNorm、NormFinder

和 Delta Ct 的分析结果类似, 但是与 BestKeeper 分析略有差异, 这种现象也存在于石蒜属和无患子植物中^[4,36]。因此, 为了减小软件算法原理不同所造成的差异, 利用 RefFinder 在线程序进行综合分析, 从而综合评估出最稳定的内参基因^[37]。

3.3 稳定内参基因的验证 为了确定分析结果的准确性, 选择生长素响应基因 *GH3.4* 对筛选出的内参基因进行验证。*GH3* 基因编码的酰胺合成酶是生长素动态平衡的调节因子, *SIGH3.4* 基因在 IAA 处理和丛枝菌根 (AM) 真菌定植的根中被强烈诱导^[23,38]。通过 qRT-PCR 检测最稳定的内参基因 *APT* 和最不稳定的内参基因 *RPL8* 对 *SIGH3.4* 基因的表达水平。结果显示, 在外源 IAA 处理下, 选择稳定的基因为内参时, *SIGH3.4* 基因在番茄不同组织中的表达趋势一致, 证明了所筛选的内参基因适用于分析 IAA 信号转导相关基因的表达水平。而选择不稳定的基因作为参考时, *SIGH3.4* 基因在茎部和叶片的表达量发生明显变化, 说明使用不稳定的内参导致基因表达的分析结果不可靠, 这与岳炜楠等^[35]、Liu 等^[39]的研究结果一致。因此, 在选择不同处理及不同组织样品内参基因时, 需要结合多种算法的综合分析结果并对结果进行验证, 以提高结果的准确性。

4 结论

本研究利用 geNorm、NormFinder、BestKeeper、Delta CT 以及 RefFinder 等算法对番茄不同组织及不同激素处理下内参基因的稳定性进行综合评估, 结果表明, 在 IAA、GA、ABA、CTK、SA、BR、

ETH 等 7 个激素处理条件下、不同组织部位及所有样品中, 均表达较稳定的内参基因为 *APT* 和 *UBI*。使用稳定的内参基因 *APT* 和不稳定的内参基因 *RPL8* 对筛选的结果进行验证, 发现选择稳定的内参基因可更准确展示目的基因的表达水平。综上所述, 本研究为后续番茄在不同激素条件下和不同组织中筛选合适的内参基因提供了一定的理论参考。

参考文献:

- [1] 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. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>
- [2] Gachon C, Mingam A, Charrier B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(402): 1445–1454. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh181>
- [3] 张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲. 基因表达研究中内参基因的选择与应用 [J]. *植物生理学报*, 2014, 50(8): 1119–1125.
- [4] 蒋婷婷, 高燕会, 童再康. 石蒜属植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择 [J]. *园艺学报*, 2015, 42(6): 1129–1138.
- [5] Müller O A, Grau J, Thieme S, et al. Genome-Wide Identification and Validation of Reference Genes in Infected Tomato Leaves for Quantitative RT-PCR Analyses [J]. *Plos One*, 2015, 10 27;10(8): e0136499.
- [6] Zhang Y, Zhu L, Xue J, et al. Selection and Verification of Appropriate Reference Genes for Expression Normalization in *Cryptomeria fortunei* under Abiotic Stress and Hormone Treatments [J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(6): 791. <https://doi.org/10.3390/genes12060791>
- [7] 李铁铮, 王金铃, 刘晓, 等. 管花肉苁蓉实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择和验证 [J]. *植物生理学报*, 2021, 57(4): 969–981.
- [8] Hu J, Israeli A, Ori N, et al. The interaction between DELLA and ARF/IAA mediates crosstalk between gibberellin and auxin signaling to control fruit initiation in tomato [J]. *The Plant cell*, 2018, 30(8): 1710–1728. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00363>
- [9] Kong X, Zhang C, Zheng H, et al. Antagonistic Interaction between Auxin and SA Signaling Pathways Regulates Bacterial Infection through Lateral Root in *Arabidopsis* [J]. *Cell Rep*, 2020, 32(8): 108060. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108060>
- [10] Gao J, Chen H, Yang H, et al. A brassinosteroid responsive miRNA-target module regulates gibberellin biosynthesis and plant development [J]. *New Phytol*, 2018, 220(2): 488–501. <https://doi.org/10.1111/nph.15331>
- [11] 董汉松. 植物抗病防卫基因表达调控与诱导抗性遗传的机制 [J]. *植物病理学报*, 1996(4): 2–6.
- [12] Xu P, Fang S, Chen H, et al. The brassinosteroid-responsive xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 19 (*XTH19*) and *XTH23* genes are involved in lateral root development under salt stress in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2020, 104(1): 59–75.
- [13] 白圣懿, 王晓敏, 刘文娟, 等. 不同激素处理下番茄实时荧光定量聚合酶链反应内参基因的筛选 [J]. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)*, 2023, 49(1): 31–44.
- [14] 韩晓雪, 韩佳轩, 姜晶. 番茄在非生物胁迫下实时定量 RT-PCR 中内参基因的筛选 [J]. *分子植物育种*, 2015, 13(4): 822–831.
- [15] Rebeca Patricia Omena-Garcia, B A O M A, C D B M A, et al. Growth and metabolic adjustments in response to gibberellin deficiency in drought stressed tomato plants - ScienceDirect [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2019, 159: 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.011>
- [16] Hu E, Liu M, Zhou R, et al. Relationship between melatonin and abscisic acid in response to salt stress of tomato [J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 285(6): 110176.
- [17] Lu J, Guan P, Gu J, et al. Exogenous DA-6 Improves the Low Night Temperature Tolerance of Tomato Through Regulating Cytokinin [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 11: 599111. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.599111>
- [18] Albuquerque G M R, Fonseca F C A, Boiteux L S, et al. Stability analysis of reference genes for RT-qPCR assays involving compatible and incompatible *Ralstonia solanacearum*-tomato 'Hawaii 7996' interactions [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 18719. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97854-8>
- [19] Expósito-Rodríguez M, Borges A A, Borges-Pérez A, et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process [J]. *BMC Plant Biology*, 2008, 8(1): 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-131>
- [20] Alfenas-Zerbini P, Maia I G, Fávoro R D, et al. Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a potyvirus [J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2009, 22(3): 352–361. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-3-0352>
- [21] 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>
- [22] Choi S W, Hoshikawa K, Fujita S, et al. Evaluation of internal control genes for quantitative realtime PCR analyses for studying fruit development of dwarf tomato cultivar 'Micro-Tom' [J]. *Plant Biotechnol (Tokyo)*, 2018, 35(3): 225–235. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.0525a>
- [23] Chen X, Chen J D, Liao D H, et al. Auxin-mediated regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis: a role of *SIGH3.4* in tomato [J]. *Plant Cell & Environment*, 2022, 45(3): 955–968.
- [24] 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. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-reports0034>
- [25] 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 Research*, 2004, 64(15): 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- [26] 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. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
- [27] 吴悠, 冀宏宇, 邓淑雯, 等. 三褶虾脊兰花发育相关基因 RT-qPCR 内参基因的筛选 [J]. *园艺学报*, 2024, 51(9): 2063–2074. <https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2023-0954>
- [28] 李佳妮, 张姝, 张永杰. 布莱克韦尔虫草逆转录定量 PCR 内参基因的筛选 [J/OL]. *微生物学通报*, 1-12 [2024-06-20]. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.240343>.
- [29] 颜爽爽, 邱正坤, 余炳伟, 等. 植物生长素响应高温胁迫研究进展 [J]. *园艺学报*, 2020, 47(11): 2238–2246.
- [30] 园园, 恩和巴雅尔, 齐艳华. 植物 GH3 基因家族生物学功能研究进展 [J]. *植物学报*, 2023, 58(5): 770–782. <https://doi.org/10.11983/CBB22263>
- [31] Carisey A F, Mace E M, Saeed M B, et al. Nanoscale dynamism of actin enables secretory function in cytotolytic cells [J]. *Current Biology*, 2018, 28(4): 489–502. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.044>
- [32] Citri A, Pang Z P, Südhof T C, et al. Comprehensive qPCR profiling of gene expression in single neuronal cells [J]. *Nature Protocols*, 2011, 7(1): 118–127.
- [33] 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.
- [34] 黄丽萍, 李思鸿, 钟启文, 等. 香瓜茄多组织部位和病害胁迫条件下 qRT-PCR 内参基因的选择 [J]. *青海大学学报*, 2022, 40(3): 33–40.
- [35] 岳炜楠, 胥通玉, 苗佳敏, 等. 紫花苜蓿不同组织及不同激素处理下内参基因的筛选 [J/OL]. *草原与草坪*, 1-16 [2024-06-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/62.1156.S.20240521.1243.002.html>.
- [36] 徐圆圆, 赵国春, 郝颖颖, 等. 无患子 RT-qPCR 内参基因的筛选与验证 [J]. *生物技术通报*, 2022, 38(10): 80–89.
- [37] 巨秀婷, 何金娣, 张梦洁, 等. 郁金香不同组织内参基因筛选及稳定表达分析 [J]. *南方农业学报*, 2023, 54(11): 3174–3185.
- [38] Liao D, Chen X, Chen A, et al. The characterization of six auxin-induced tomato GH3 genes uncovers a member, *SIGH3.4*, strongly responsive to arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2015, 56(4): 674–687. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu212>
- [39] Liu H, Liu J, Chen P, et al. Selection and validation of optimal RT-qPCR reference genes for the normalization of gene expression under different experimental conditions in *lindera megaphylla* [J]. *Plants-Basel*, 2023, 12(1): 2185.

Screening of internal reference genes of tomato under different plant parts and hormone treatments

Miao Die[#], Zhang Shuxin, Wang Peng^{*}

(School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: *Solanum lycopersicum* is a model plant for research in genetics and molecular biology. Recently selection of tomato internal reference genes has been reported but with less types of exogenous hormones used for treatment. An attempt was hence made to select internal reference genes with stable expression in different tissues of tomato and under treatment with plant hormones. *DANJ*, *EF-1 α* , *ACT*, *UBI*, *APT*, *CAC*, *TIP41* and *RPL8* were used as candidate internal reference genes, and selected under the 8 experimental conditions: exogenous hormone treatment with auxin, gibberellin, abscisic acid, cytokinin, salicylic acid, brassinolide and ethylene and various plant parts. The stability of the candidate reference genes was comprehensively evaluated using algorithms such as geNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta CT and RefFinder. The stability of the reference genes was validated using the auxin-responsive gene *SIGH3.4*. The results showed that *APT* is the most stable reference gene expressed in auxin, gibberellin, abscisic acid, brassinosteroid treatment and various plant parts, that *UBI* is the most stable reference gene expressed in all samples under cytokinin and salicylic acid treatment, and that *TIP41* is the most stable reference gene expressed under ethylene treatment. Finally, when *APT*, which has a relatively stable comprehensive ranking, was used as an internal reference gene, it was found that the expression level of *SIGH3.4* gene showed a similar trend under IAA treatment conditions, while the less stable *RPL8* gene failed to accurately correct the expression level of the target gene. All these results may provide theoretical support for the analysis of gene expression networks and molecular regulatory mechanisms in the response of tomato to exogenous hormone treatment.

Keywords: tomato; hormone; internal reference genes; qRT-PCR; gene expression analysis

(责任编辑:叶 静)