

李维欢,吴小媚,武志健,等. 青花菜自交不亲和和相关内参基因筛选与应用[J]. 江苏农业科学,2025,53(2):34-43.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.02.005

青花菜自交不亲和和相关内参基因筛选与应用

李维欢, 吴小媚, 武志健, 陈芳珍, 王军伟, 黄 科

[湖南农业大学园艺学院/蔬菜生物学湖南省重点实验室/园艺作物种质创新与新品种选育教育部工程研究中心/

农业农村部园艺作物(蔬菜、茶叶等)基因资源评价利用重点实验室,湖南长沙 410128]

摘要:为研究青花菜自交不亲和反应过程中最适内参基因与自交不亲和相关基因的表达,以青花菜自交不亲和系 BOP04-28-16 开花期分别取不同器官、花的不同组织部位、不同发育时期的花蕾和不同授粉时期柱头 4 个组合为试验材料,利用实时荧光定量 PCR 技术及 3 个 RT-qPCR 分析软件 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 检测了 17 个候选内参基因分别在 4 个组合中的表达水平。结果表明,在不同组织部位中的稳定内参基因为 *UBC7*、*Actin-1*、*UBC9*;在花不同部位中稳定的内参基因为 *DNAJ*、*Tubα-3*;在不同发育时期花蕾中稳定的内参基因为 *Actin-7*、*UBC7*、*Actin-3*;在 4 个不同授粉时期柱头中稳定的内参基因为 *Actin-7*、*His*。综合分析认为,*UBC7* 和 *Actin-7* 为青花菜 SI 中最适合的内参基因组合,并以其分别分析青花菜柱头 S 位点受体激酶基因(*SRK*)在花不同组织部位和不同授粉时期柱头的表达水平进行验证筛选的可靠性,结果显示 *SRK* 基因在柱头中特异表达,并且与柱头的发育成熟性成正相关。研究结果为开展青花菜自交不亲和相关基因的表达特征分析提供了稳定的内参基因,为后续开展关键基因的挖掘、利用以及自交不亲和分子调控网络解析奠定了基础。

关键词:青花菜;自交不亲和;内参基因;*SRK*

中图分类号:S635.301 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2025)02-0034-10

青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica*)别称西蓝花,是十字花科芸薹属甘蓝种的变种,原产于地中

海东部沿岸地区,营养价值十分丰富,被誉为“蔬菜皇冠”^[1-2]。随着人们生活水平的日益提高,对青花菜产品的需求逐年增加。近 10 年来,我国青花菜播种面积已超过 10 万 hm²,年产量约 400 万 t,这在保持我国蔬菜周年供应和出口创汇方面起着关键作用^[3]。杂种优势是提高作物产量和品质的重要途径,开展青花菜杂种优势利用的研究,选育优质杂交种,是当前青花菜育种的主攻方向,其中利用自交不亲和系来生产杂种 1 代则是青花菜等十字花科作物杂种优势利用的重中之重^[4-5]。

收稿日期:2024-01-31

项目基金:国家自然科学基金(编号:32072585、32072568、32272747、32272709);国家重点研发计划(编号:2022YFF1003000、2022YFE0108300)。

作者简介:李维欢(1998—),女,陕西咸阳人,硕士研究生,主要从事青花菜分子生物学研究。E-mail:1715783347@qq.com。

通信作者:黄 科,博士,教授,主要从事十字花科蔬菜研究。E-mail:huangkeqy@hotmail.com。

[28] Kato K, Shoji T, Hashimoto T. Tobacco nicotine uptake permease regulates the expression of a key transcription factor gene in the nicotine biosynthesis pathway[J]. *Plant Physiology*, 2014, 166(4): 2195-2204.

[29] Hu M Y, Zhang H B, Wang B W, et al. Transcriptomic analysis provides insights into the AUXIN RESPONSE FACTOR 6-mediated repression of nicotine biosynthesis in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. *Plant Molecular Biology*, 2021, 107(1/2): 21-36.

[30] Mizusaki S, Kisaki T, Tamaki E. Phytochemical studies on the tobacco alkaloids: Part IX. Question for nornicotine as a precursor of nicotine[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1965, 29(8): 719-723.

[31] Hayashi S, Watanabe M, Kobayashi M, et al. Genetic manipulation of transcriptional regulators alters nicotine biosynthesis in tobacco [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2020, 61(6): 1041-1053.

[32] Wen L Y, Fukuda M, Sunada M, et al. Guanine nucleotide exchange factor 2 for Rab5 proteins coordinated with GLUP6/GEF regulates the intracellular transport of the proglutelin from the Golgi apparatus to the protein storage vacuole in rice endosperm [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(20): 6137-6147.

[33] 孔维松, 向海英, 宋春满, 等. 一种敲除烟草 *NtLNPI* 基因获得叶形改变且低烟碱含量烟草的方法及应用: CN116217685A [P]. 2023-06-06.

[34] 许亚龙, 陈千思, 谢小东, 等. 烟草烟碱相关 miRNA 筛选及验证 [J]. *烟草科技*, 2021, 54(2): 10-17.

自交不亲和性 (self-incompatibility, SI) 是指植物能产生功能正常的有生育能力的雌雄配子,但是自花授粉后不能结籽的现象^[6-8]。青花菜属于严重自交不亲和作物,在青花菜亲本繁种过程中需要人工剥蕾授粉,极大地增加了种子生产的成本和劳动强度^[4-6]。随着我国对青花菜自主品种选育的日益重视,自交不亲和造成的青花菜亲本繁育问题越发制约青花菜育种进程,开展青花菜 SI 的相关分子机制研究尤为重要^[4-7]。芸薹属植物自交不亲和和方面的研究发现,自交不亲和反应的发生与雌蕊柱头组织的生长发育水平有着极为密切的关系^[8-11]。现有关于自交不亲和反应的报道中重要基因主要包括 2 个方面:一方面是雌性识别因子 S 位点受体激酶 (S-locus receptor kinase, SRK) 基因^[12],另一方面是雄性识别因子 S 位点富半胱氨酸蛋白 (S-locus cysteine-rich protein, SCR) 基因和 S 位点蛋白 11 (S-locus protein 11, SP11) 基因^[13]。有报道表明, S 位点糖蛋白 (S-locus glycoprotein, SLG) 基因和 SRK 等基因在柱头组织特异性表达,并且随着柱头组织的发育成熟表达量会显著上调^[13-18]。因此准确分析青花菜自交不亲和和相关基因在不同组织及柱头不同发育阶段的表达模式,对阐述相关基因在青花菜自交不亲和及柱头发育方面的功能是十分重要的。

实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 是一种用于评估基因表达量的通用技术,具有高重复性和高通量性^[19-20]。大量研究表明,内参基因的选择不是固定不变的,在试验材料及试验条件不同的情况下研究者所选择的内参基因也是有所不同的,选择的内参基因是否适合可极大程度地影响 RT-qPCR 分析结果的准确性^[21-24]。具体则需要根据不同物种、不同试验条件、不同组织器官和不同生长发育阶段等因素分别进行筛选和验证内参基因的可行性^[20]。已有研究结果揭示了 *TUB4*、*DNAJ*、*UBQ* 和 *GAPDH* 等内参基因涉及生物体的基本生化反应过程 (如中间代谢、蛋白翻译等),并且被普遍应用于各种植物之间的基因表达研究^[25-28]。然而多数报道指出内参基因的选择具有相对性和非稳定性^[24-28]。在十字花科蔬菜中,已有的研究显示甘蓝中适用的内参基因为 *Actin*、*Tip41* 和 *Tub-α6* 等,花椰菜中为 *SKIP16*、*ACT* 等^[29-33]。但是,笔者所在课题组前期的研究显示,适用于甘蓝的内参基因不适用于青花菜自交不亲和相关基因的定量表达分析,因此推测青花菜自交不亲和相关内参基因的选择与物种或

基因型密切相关^[29-34]。基于此,本研究在青花菜自交不亲和和识别反应中系统地对候选内参基因进行筛选和验证。

本研究根据已报道的内参基因和笔者所在课题组已建立的青花菜转录组数据库,选取 17 个常见候选内参基因^[21-34],使用 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 等 3 个内参基因筛选软件进行分析,比较了 17 个候选内参基因在 4 个组合 (青花菜不同器官、不同时期花蕾、花不同组织部位、不同授粉时期柱头) 中的表达情况^[35-37]。利用筛选得到的内参基因分析了青花菜自交不亲和反应中关键基因 *SRK* 的表达模式,验证了最佳内参基因的可靠性。研究结果以期阐明 SI 相关基因的表达模式以及揭示 SI 的分子机制研究提供参考,同时为自交不亲和的利用与克服提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为笔者所在课题组保存的青花菜高代自交系 BOP04-28-16,材料于 2022 年 10 月定植于湖南农业大学金山基地。在次年 4 月青花菜开花期,分别取不同器官 (根、茎、叶),花的不同组织部位 (花梗、花托、萼片、花瓣、花药、花丝、花期柱头、子房),不同发育时期的花蕾 (小于 5 mm、大于 5 mm、完全花),不同授粉时期柱头 (蕾期柱头、花期柱头、自花授粉 10 min 柱头、自花授粉 30 min 柱头) 为样品。

1.2 试验方法

1.2.1 试验材料总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 所有样品的总 RNA 提取参照湖南艾科瑞公司提供的 RNA 提取试剂盒的说明书进行。使用微量分光光度计对 RNA 的浓度与纯度进行检测,最后使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。cDNA 的合成参照湖南艾科瑞公司的 Evo M-MLV RT Premix for qPCR 反转录试剂盒的说明书进行。

1.2.2 候选内参基因引物设计 在 OligoArchitect™ Pyimer and probe Design 网页分别设计用于 RT-qPCR 的 *Actin-1*、*Actin-2*、*Actin-3*、*Actin-7*、*Tubα-6*、*TUBβ-4*、*UBC7*、*UBC9*、*UBQ*、*UKNI*、*CYP*、*DNAJ*、*EFα*、*EFβ*、*GAPDH*、*His*、*Tubα-3* 共 17 个候选内参基因及 *SRK* 基因引物。引物相关信息见表 1。

1.2.3 候选内参基因片段的 PCR 扩增 以 cDNA 为模版,利用所设计的候选内参基因引物进行 PCR

表 1 候选内参基因引物信息

基因名称	引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)
<i>Actin-1</i>	<i>Actin1</i> - F/ <i>Actin1</i> - R	GCAGACCGTATGAGCAAAGA/GGAGGTGCAACCACCTTAAT	56.74/54.05
<i>Actin-2</i>	<i>Actin2</i> - F/ <i>Actin2</i> - R	ATCGAGCATGGTGTGTGAG/GGCCTTTGGGTTGAGAGGAG	56.38/57.46
<i>Actin-3</i>	<i>Actin3</i> - F/ <i>Actin3</i> - R	ATGGAACATCGTCCTCAGTGGTG/AGTGCTGAGGGATGCCAAGATG	59.93/61.05
<i>Actin-7</i>	<i>Actin7</i> - F/ <i>Actin7</i> - R	GGAGCTGAGAGATTCCGTTG/GAACCACCACTGAGGACGAT	57.23/55.77
<i>CYP</i>	<i>CYP</i> - F/ <i>CYP</i> - R	ATGGCGTTTCCTAAAGTT/AATTCTCAGCAGTCTTGG	55.05/54.12
<i>DNAJ</i>	<i>DNAJ</i> - F/ <i>DNAJ</i> - R	AACACAGCCAGAAGATTA/CTGAATGACGAAGACTATATC	57.81/58.92
<i>EFα</i>	<i>EFα</i> - F/ <i>EFα</i> - R	ATGGTGATGCTGGTATGG/TCCTTCTTGCAACGCTCTT	57.09/55.64
<i>EFβ</i>	<i>EFβ</i> - F/ <i>EFβ</i> - R	GAAGAGAGAGCTGCTCCGT/GCTTCTTCATGTCAGTCTCA	55.38/57.01
<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i> - F/ <i>GAPDH</i> - R	TCCACCATTGATTCTTCTCTG/TCAGCCAAATCAACAACCTCTC	50.60/50.24
<i>His</i>	<i>His</i> - F/ <i>His</i> - R	GAAGAAGCCTCACCGTTA/CGAACAGACCCACAAGATA	51.22/55.75
<i>Tubα-3</i>	<i>Tubα3</i> - F/ <i>Tubα3</i> - R	GGAGCTTACTGCCTCGAAC/AAAGTGTGAAAGCGTCGTG	59.25/54.08
<i>Tubα-6</i>	<i>Tubα6</i> - F/ <i>Tubα6</i> - R	GCACACTGATGTCTCCATCC/CATCGAACCTCAGAGAAGCA	52.67/51.06
<i>TUBβ-4</i>	<i>TUBβ-4</i> - F/ <i>TUBβ-4</i> - R	AACAGTACAGTGCCTTGA/GACCTCCTTAGTGCTAAG	54.03/54.60
<i>UBC7</i>	<i>UBC7</i> - F/ <i>UBC7</i> - R	GCGTTACCATTATCGGACCT/TAGGATGCCACATGTCTGAA	48.90/51.21
<i>UBC9</i>	<i>UBC9</i> - F/ <i>UBC9</i> - R	GGAAGACATGTTTCATTGGCAGG/ATACTTTTGGGTCCAGGTCCGAG	52.17/52.31
<i>UBQ</i>	<i>UBQ</i> - F/ <i>UBQ</i> - R	CTAAGAGGAGGTATCATTGAG/AGACGAGCATAACACTTG	51.70/49.11
<i>UKNI</i>	<i>UKNI</i> - F/ <i>UKNI</i> - R	TCTATACTTCTCATGTGCTTA/CTCATCCAACCTCACCATT	49.56/50.89
<i>SRK</i>	<i>SRK</i> - F/ <i>SRK</i> - R	TCTTATTCTTACTGTGACCTAACCC/CACCGCTGACTGTTCTTG	54.16/54.55

扩增,PCR 反应体系与反应条件参照试剂盒 MegaFi Fidelity 2 × PCR MasterMix 说明书进行,PCR 产物最后使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,并分析产物大小,确定引物特异性。

1.2.4 RT-qPCR 分析 RT-qPCR 分析包括候选内参基因和 *SRK* 基因 2 个部分,*SRK* 基因的 RT-qPCR 分析基于筛选获得的内参基因进行开展。RT-qPCR 分析操作参照湖南艾科瑞公司的 SYBR® Green Pro *Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒说明书进行。每个样品进行 3 次技术重复。

1.2.5 数据分析 候选内参基因的表达稳定性利用 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 等 3 款软件进行统计分析^[35-37]。GeNorm 和 NormFinder 软件需要输入 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 值,即将 C_q 值转换为相对表达量进行分析;BestKeeper 软件则是以输入原始数据(C_q 值)分析^[38]。3 款软件最后都是根据分析结果对各候选基因的稳定性进行排名,筛选出最适内参基因。分析结果使用 LightCycler® 96 SW 1.1 软件、Minitab Statistical Software 软件、Microsoft Excel 软件、Photoshop CS5 Portable 软件进行数据处理及作图。

2 结果与分析

2.1 青花菜花蕾、柱头及不同组织部位总 RNA 提取 分别提取不同器官(根、茎、叶),花的不同组织

部位(花梗、花托、萼片、花瓣、花药、花丝、花期柱头、子房),不同发育时期的花蕾(小于 5 mm、大于 5 mm、完全花),不同授粉时期柱头(蕾期柱头、花期柱头、自花授粉 10 min 柱头、自花授粉 30 min 柱头)的总 RNA。如图 1 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,所提取柱头总 RNA 的 18S 条带及 28S 条带清晰,未发现明显降解现象,适用于后续试验。

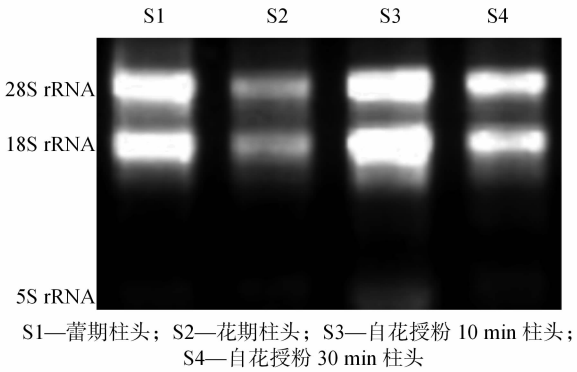


图1 青花菜柱头总 RNA 凝胶电泳检测

2.2 候选内参基因的 PCR 扩增分析

采用所提取叶片总 RNA 通过反转录获得 cDNA 后,以叶片 cDNA 为模板对所设计的 17 对候选内参基因引物分别进行 PCR 扩增,最后利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果(图 2)显示所设计候选内参基因引物扩增出的条带清晰可见,并且单一无杂带,适用于 RT-qPCR 的分析。

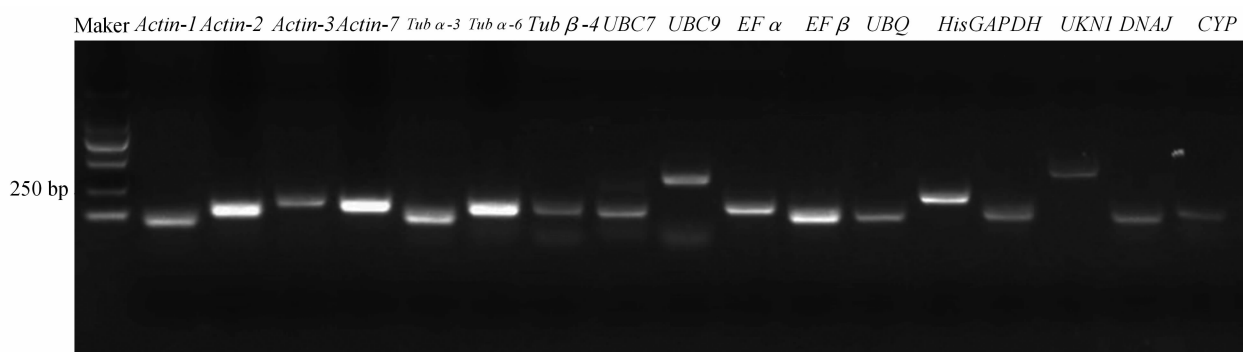
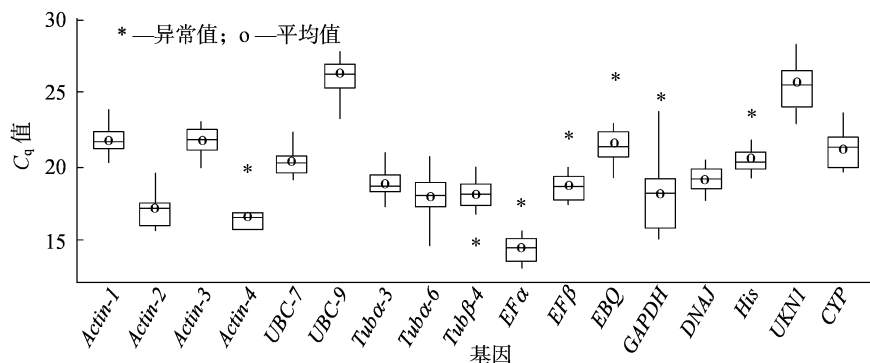


图2 17个候选内参基因的PCR扩增产物

2.3 候选内参基因的 RT-qPCR 表达分析

分别对 17 个候选内参基因进行 RT-qPCR 检测,结果显示在所有样品中,17 个候选内参基因的熔解曲线峰值明显且单一,且扩增曲线良好,可以满足 RT-qPCR 的要求。候选内参基因的表达量用 C_q 值表示, C_q 值与基因的表达量成负相关,即 C_q

值越大,表达量越小。如图 3 所示,内参基因的 C_q 值在 13~27 之间,整体上 $UBC9$ 的表达量较低(高 C_q 值),而 $EF\alpha$ 表达量较高(低 C_q 值)。大多数候选内参基因的表达量 C_q 值分布比较集中,特别是 $Actin-1$ 、 $Actin-7$ 、 $UBC7$ 等,说明其表达较为稳定。

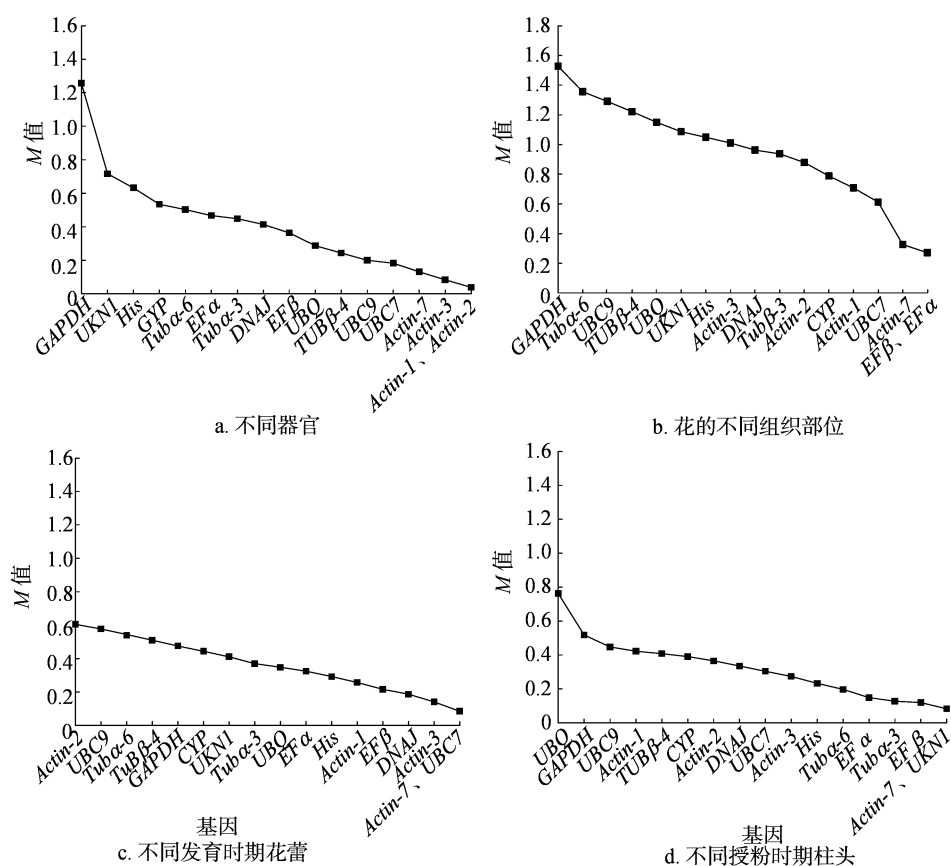
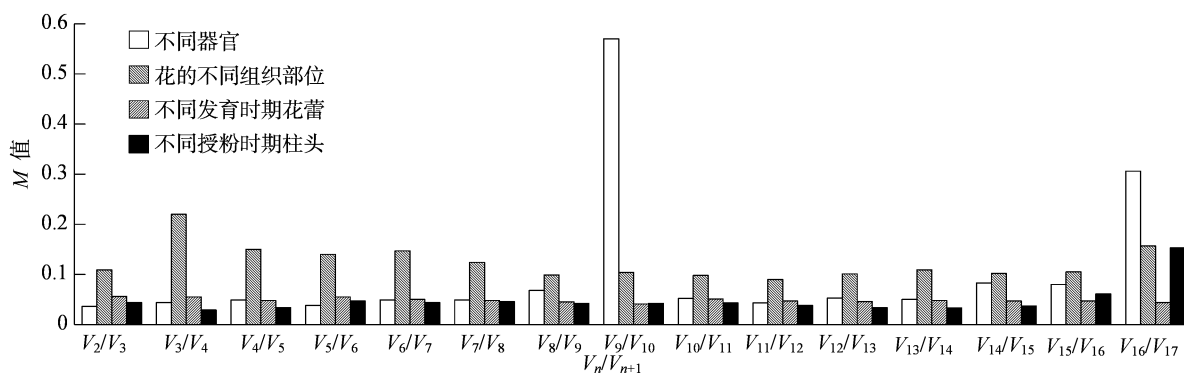
图3 17个内参基因的 C_q 值分布箱线图

2.4 候选内参基因表达稳定性的统计分析

2.4.1 GeNorm 软件分析 GeNorm 软件判断标准:表达相对稳定的内参基因其平均表达稳定指数 M 值小于 1.5,且 M 值越小,表达越稳定,反之则表达不稳定^[38]。图 4-a 中的结果表明,在青花菜不同器官中 $Actin-1$ 、 $Actin-2$ 是表达较为稳定的内参基因;在花的不同组织部位中 $EF\alpha$ 和 $EF\beta$ 是表达较为稳定的内参基因;在不同发育时期花蕾中 $Actin-7$ 和 $UBC7$ 是表达较为稳定的内参基因;在不同授粉时期柱头中 $Actin-7$ 和 $UKN1$ 是表达较为稳定的内参基因。GeNorm 软件可以通过计算出的配对变异值 V_n/V_{n+1} 来选择最适内参基因数目,判定标准为当 $V_n/V_{n+1} < 0.15$ 时,则最合适内参基因的数量是 n 个,反之则需要 $n+1$ 个^[38]。图 5 中结果显示,花的不同组织部位组合的 V_2/V_3 比值小于 0.15,表明该组合最适内参基因的数目为 2 个。

2.4.2 NormFinder 软件分析 NormFinder 软件计算原理与 GeNorm 软件相似,但该软件只能筛选出一个最合适的内参基因^[38]。由表 2 可知, NormFinder 软件得出在不同组织部位中最稳定的内参基因是 $UBC9$;在花的不同部位中最稳定的内参基因是 $Actin-1$;在不同发育时期花蕾中最稳定的内参基因为 $Actin-7$;在不同授粉时期柱头中最稳定的内参基因为 $UBC7$ 。

2.4.3 BestKeeper 软件分析 BestKeeper 软件分析判定原则为相关系数越大、标准偏差和变异系数越小、内参基因稳定性越好,反之,稳定性越差;当标准偏差 > 1 时,则该内参基因表达不稳定^[38]。此软件分析 17 个候选基因稳定性结果为在不同组织部位中表达较为稳定的是 $Actin-3$ 和 $UBC9$ (表 3);在花的不同部位中表达较为稳定的是 $Actin-3$ 和 $DNAJ$ (表 4),有 7 个基因: $UKN1$ 、 $UBC9$ 、 UBQ 、 $EF\beta$ 、

图4 不同组织候选内参基因的 M 值图5 不同组织候选内参基因的 V_n/V_{n+1} 值

$TUB\beta-4$ 、 $Tub\alpha-6$ 、 $GAPDH$, 不符合内参基因稳定性要求, 即标准偏差大于 1; 在不同发育时期的花蕾中表达较为稳定的是 His 和 UBQ (表 5); 在不同授粉时期柱头中表达较为稳定的是 $DNAJ$ 和 $Tub\alpha-6$ (表 6), 有 2 个基因 $GAPDH$ 和 UBQ 不符合内参基因稳定性要求。

综合分析显示, $GeNorm$ 软件和 $NormFinder$ 软件分析结果相近, 最稳定的基因组合为 $UBC7$ 和 $Actin-7$ 。BestKeeper 软件分析结果稍有不同, 表达稳定的内参基因为 $Actin-3$ 和 $DNAJ$, 但 $UBC7$ 排名

也仅次于最优选。3 款软件中也得到一致的最差结果: $GAPDH$ 和 $Actin-2$, 说明其最不适合作为青花菜 SI 的内参基因。综合 3 款软件的分析结果, 认为 $UBC7$ 和 $Actin-7$ 为青花菜 SI 中最适合内参基因组合。

2.5 SRK 在不同组织和不同发育时期柱头的表达分析

SRK 等基因在柱头组织特异性表达, 并且会随着柱头组织的发育成熟表达量显著上调^[39-41]。因此为验证筛选到的内参基因的可行性, 笔者所在课

表 2 利用 NormFinder 软件对 17 个候选内参基因的统计分析

排名	不同组织部位		花的不同部位		不同发育时期花蕾		不同授粉时期柱头	
	名称	稳定值	名称	稳定值	名称	稳定值	名称	稳定值
1	<i>UBC9</i>	0.0	<i>Actin - 1</i>	0.3	<i>Actin - 7</i>	0.0	<i>UBC7</i>	0.0
2	<i>UBC7</i>	0.0	<i>DNAJ</i>	0.3	<i>Actin - 3</i>	0.0	<i>Actin - 3</i>	0.1
3	<i>Actin - 3</i>	0.0	<i>Tubα - 3</i>	0.4	<i>UBC7</i>	0.1	<i>TUBβ - 4</i>	0.1
4	<i>UBQ</i>	0.1	<i>Actin - 2</i>	0.4	<i>DNAJ</i>	0.1	<i>His</i>	0.1
5	<i>Actin - 1</i>	0.1	<i>CYP</i>	0.4	<i>EFβ</i>	0.1	<i>Actin - 2</i>	0.2
6	<i>Actin - 2</i>	0.1	<i>Actin - 3</i>	0.5	<i>Actin - 1</i>	0.2	<i>Actin - 1</i>	0.2
7	<i>Actin - 7</i>	0.1	<i>UBC7</i>	0.5	<i>Tubα - 3</i>	0.2	<i>CYP</i>	0.2
8	<i>TUBβ - 4</i>	0.4	<i>His</i>	0.6	<i>His</i>	0.3	<i>Tubα - 6</i>	0.2
9	<i>EFβ</i>	0.4	<i>Actin - 7</i>	0.7	<i>EFα</i>	0.3	<i>UBC9</i>	0.3
10	<i>EFα</i>	0.4	<i>UKNI</i>	0.7	<i>UBQ</i>	0.3	<i>EFβ</i>	0.3
11	<i>Tubα - 6</i>	0.4	<i>EFα</i>	0.7	<i>UKNI</i>	0.4	<i>UKNI</i>	0.3
12	<i>Tubα - 3</i>	0.4	<i>EFβ</i>	0.8	<i>TUBβ - 4</i>	0.4	<i>Actin - 7</i>	0.3
13	<i>CYP</i>	0.5	<i>UBQ</i>	0.9	<i>CYP</i>	0.5	<i>DNAJ</i>	0.3
14	<i>DNAJ</i>	0.5	<i>UBC9</i>	1.0	<i>Tubα - 6</i>	0.5	<i>Tubα - 3</i>	0.4
15	<i>His</i>	0.8	<i>TUBβ - 4</i>	1.1	<i>UBC9</i>	0.5	<i>EFα</i>	0.4
16	<i>UKNI</i>	1.0	<i>Tubα - 6</i>	1.2	<i>GAPDH</i>	0.5	<i>GAPDH</i>	0.7
17	<i>GAPDH</i>	3.6	<i>GAPDH</i>	1.8	<i>Actin - 2</i>	0.5	<i>UBQ</i>	1.8

题组对 *SRK* 基因在不同组织和不同发育时期柱头中的表达进行了分析。当以稳定内参基因 *Actin - 7* 分析 *SRK* 的表达时,结果显示 *SRK* 在柱头组织中特异表达,且表达量与柱头熟性成正相关,当以 *UBC7* 作为内参基因时,*SRK* 表现出相似的表达模式(图 6)。但是当以最不稳定的 *Actin - 2* 和 *GAPDH* 作为内参基因时,*SRK* 在蕾期柱头高表达,显著高于花期柱头,与柱头熟性成负相关(图 7),与已报道 *SRK* 基因的表达模式不吻合。上述结果说明,在青花菜自交不亲和相关基因的荧光定量 PCR 研究中,采用 *Actin - 7* 和 *UBC7* 作为内参基因进行分析是可靠的。

3 讨论与结论

青花菜自交不亲和相关基因表达模式分析中,选择合适的内参基因是得到准确的定量分析结果的重要前提^[31-37]。有报道显示,内参基因的选择会随着物种或组织的变化而有着不同的选择,如青花菜花蕾发育过程中稳定的内参基因是 *XLOC_000400/XLOC_008536* 和 *XLOC_039609/XLOC_021473*,抵御逆境胁迫中的稳定内参基因是 *XLOC_010342* 和 *XLOC_007980*^[42-43];甘蓝柱头发育过程中稳定的内参基因是 *Tubα - 6*、*Actin*,非生物胁迫试验条件下适应的内参基因是 *EF1a*、*GAPC2* 和

SAND^[32,44-45]。然而,上述内参基因不适用笔者所在课题组前期青花菜 SI 相关基因的荧光定量,具体表现为不同 SI 基因的表达模式分析结果显示其不同组织的表达特异性不显著以及在 SI 识别反应前后表达量无明显差异等。因此本研究系统地在青花菜中对相关候选内参基因进行了统计分析。结果显示,在近缘物种相关研究中稳定的内参基因对于青花菜而言并不是最优选,如 *Actin - 1*、*Actin - 2*、*DNAJ*、*UKNI*、*Actin - 3* 及 *Tubα - 6* 等,其中 *Actin - 2* 验证为不稳定。因此在开展具有组织特异性基因表达特征分析时应基于本物种或组织预先开发适用的内参基因,而简单地引用其他物种的已有报道具有潜在的试验误差。本研究以青花菜自交不亲和系为材料,利用实时荧光定量 PCR 技术及 3 个 RT-qPCR 分析软件 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 检测了 17 个候选内参基因分别在 4 个组合中的表达水平,筛选获得了适用于青花菜自交不亲和相关基因的内参基因。

综合 GeNorm、NormFinder 及 BestKeeper 分析结果,认为在不同组织部位中的稳定内参基因为 *UBC7*、*Actin - 1*、*UBC9*,不稳定内参基因为 *GAPDH*、*UKNI*、*His*;在花的不同部位中稳定的内参基因为 *DNAJ*、*Tubα - 3*,不稳定的内参基因为 *GAPDH*、*Tubα - 6*、*TUBβ - 4*;在不同发育时期花蕾中稳定的

表 3 利用 BestKeeper 软件对青花菜不同组织部位 17 个候选内参基因相对表达量的统计分析结果

项目	Actin - 3	UBC9	UBC7	Actin - 1	Tubα - 6	Actin - 2	CYP	UBQ	Actin - 7	TUBβ - 4	EFβ	Tubα - 3	DNAJ	EFα	UKNI	His	GAPDH
样本数(个)	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
几何平均值	22.12	26.38	20.61	21.08	18.80	16.04	19.98	21.80	16.61	18.88	18.67	19.72	19.28	14.70	26.41	21.79	19.18
数组平均值	22.12	26.39	20.61	21.08	18.81	16.05	19.98	21.81	16.62	18.89	18.68	19.74	19.29	14.72	26.45	21.82	19.54
最小值	21.86	26.09	20.30	20.73	18.50	15.66	19.55	21.25	16.09	18.26	17.72	18.70	18.19	13.76	24.82	20.80	15.66
最大值	22.29	26.73	20.93	21.34	19.17	16.34	20.51	22.43	16.94	19.43	19.57	20.71	20.07	15.73	28.31	23.58	24.75
标准偏差	0.17	0.23	0.22	0.23	0.24	0.26	0.35	0.42	0.35	0.42	0.64	0.69	0.74	0.67	1.24	1.17	3.48
变异系数(%)	0.78	0.87	1.05	1.08	1.29	1.60	1.77	1.91	2.13	2.20	3.43	3.50	3.83	4.54	4.69	5.38	17.79
排名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17

表 4 利用 BestKeeper 软件对青花菜花的不同部位 17 个候选内参基因相对表达量的统计分析结果

项目	Actin - 3	DNAJ	Tubα - 3	Actin - 1	UKNI	Actin - 2	His	UBC9	CYP	UBC7	UBQ	EFβ	Actin - 7	EFα	TUBβ - 4	Tubα - 6	GAPDH
样本数(个)	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
几何平均值	21.68	19.58	19.03	22.28	26.00	17.44	20.35	25.33	21.82	20.28	21.26	19.16	17.01	14.89	17.98	18.07	18.14
数组平均值	21.69	19.59	19.05	22.31	26.04	17.47	20.38	25.36	21.86	20.31	21.30	19.21	17.06	14.95	18.03	18.16	18.31
最小值	20.88	18.13	17.92	20.32	22.91	15.65	19.20	23.16	19.87	19.17	19.26	17.41	15.47	13.14	15.05	14.66	14.98
最大值	22.71	20.63	21.00	23.97	27.86	19.56	22.01	27.07	23.72	22.35	23.01	22.10	19.85	17.69	20.10	20.81	23.79
标准偏差	0.46	0.52	0.71	0.84	1.05	0.73	0.88	1.13	0.99	0.96	1.09	1.05	0.95	0.85	1.06	1.33	1.92
变异系数(%)	2.13	2.66	3.73	3.78	4.02	4.20	4.29	4.44	4.54	4.71	5.12	5.47	5.55	5.71	5.88	7.30	10.47
排名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17

表 5 利用 BestKeeper 软件对青花菜不同发育时期的花蕾 17 个候选内参基因相对表达量的统计分析结果

项目	His	UBQ	UBC7	Actin - 3	Actin - 1	EFβ	EFα	Actin - 7	GAPDH	UBC9	DNAJ	UKNI	Tubα - 3	CYP	TUBβ - 4	Tubα - 6	Actin - 2
样本数(个)	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
几何平均值	20.17	21.20	19.51	20.41	21.81	17.91	13.71	15.70	15.95	25.66	18.36	24.89	18.09	20.38	17.17	17.05	16.32
数组平均值	20.17	21.21	19.51	20.41	21.81	17.91	13.71	15.71	15.95	25.66	18.36	24.90	18.10	20.39	17.18	17.07	16.34
最小值	19.95	20.87	19.19	19.94	21.53	17.47	13.42	15.31	15.56	24.95	17.71	23.85	17.27	19.78	16.66	15.94	15.68
最大值	20.41	21.64	19.94	20.74	22.35	18.19	14.06	16.10	16.38	26.43	18.87	25.54	18.65	21.41	18.13	18.09	17.54
标准偏差	0.16	0.29	0.28	0.32	0.35	0.30	0.23	0.26	0.28	0.51	0.43	0.70	0.55	0.68	0.63	0.75	0.80
变异系数(%)	0.79	1.35	1.45	1.55	1.63	1.65	1.66	1.67	1.77	2.00	2.37	2.82	3.05	3.33	3.66	4.42	4.88
排名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17

表 6 利用 BestKeeper 软件对青花菜不同授粉时期柱头 17 个候选内参基因相对表达量的统计分析结果

项目	DNAJ	Tubα-6	His	UKNI	Actin-7	Tubα-3	EFβ	Actin-3	TUBβ-4	Actin-1	CYP	UBC7	UBC9	EFα	Actin-2	GAPDH	UBQ
样本数(个)	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
几何平均值	18.49	17.09	19.99	23.51	15.96	18.44	18.07	22.51	18.01	21.29	20.91	20.35	27.13	13.94	16.90	18.05	21.88
数组平均值	18.49	17.09	19.99	23.51	15.97	18.45	18.07	22.52	18.02	21.30	20.92	20.36	27.14	13.95	16.91	18.10	22.01
最小值	18.13	16.65	19.46	22.91	15.47	17.92	17.45	21.47	17.17	20.32	19.87	19.31	25.67	13.48	15.65	15.89	20.18
最大值	18.77	17.36	20.23	24.23	16.59	19.17	18.72	23.12	18.72	21.95	21.35	20.79	27.81	14.63	17.35	19.14	26.11
标准偏差	0.22	0.22	0.27	0.36	0.31	0.39	0.38	0.52	0.43	0.52	0.53	0.52	0.74	0.41	0.63	1.11	2.05
变异系数(%)	1.16	1.30	1.33	1.53	1.95	2.09	2.10	2.33	2.37	2.45	2.53	2.58	2.71	2.96	3.72	6.10	9.33
排名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17

内参基因为 *Actin-7*、*UBC7*、*Actin-3*,不稳定的内参基因为 *Actin-2*、*Tubα-6*、*UBC9*;在不同授粉时期柱头中稳定的内参基因为 *Actin-7*、*His*,不稳定的内参基因为 *UBQ*、*GAPDH*、*Actin-2*。在数据分析过程中,发现依据 3 个内参基因筛选软件直接得出的结果,无法直接选择出最稳定的内参基因。有研究显示 GeNorm 软件和 NormFinder 软件有时可以得到大体一致的结果,有时也会得到差别很大的结果^[46-48]。在本研究中,GeNorm 软件和 NormFinder 软件筛选出稳定内参基因基本一致(*Actin-7* 和 *UBC7*)。BestKeeper 软件得出了不同结果(表达稳定的内参基因为 *Actin-3* 和 *DNAJ*),但 *UBC7* 的排名也仅次于 *Actin-3* 和 *DNAJ*。值得注意的是 3 款软件一致认为不稳定内参基因是 *GAPDH* 和 *Actin-2*。因此本研究综合考虑了 3 个软件中的结果,最终选出在青花菜中稳定的内参基因是 *Actin-7* 和 *UBC7*,不稳定的内参基因是 *GAPDH* 和 *Actin-2*。对于 3 款软件所得的结论存在的一些差异,这可能是软件对于内参基因稳定性的算法不同造成的^[24,35-38]。

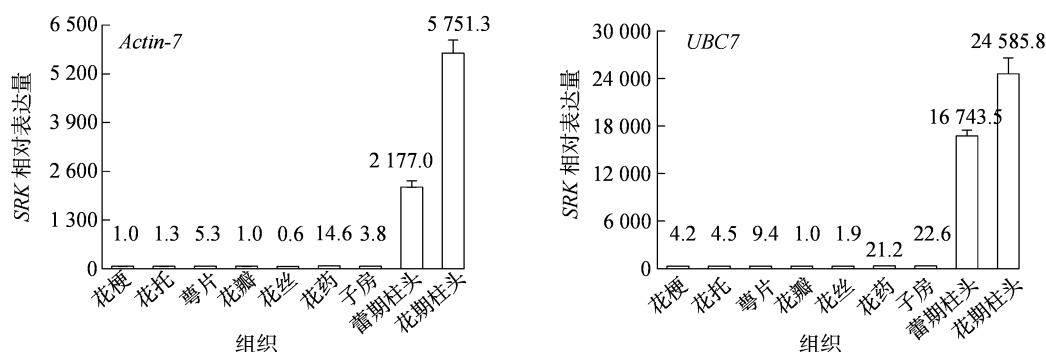
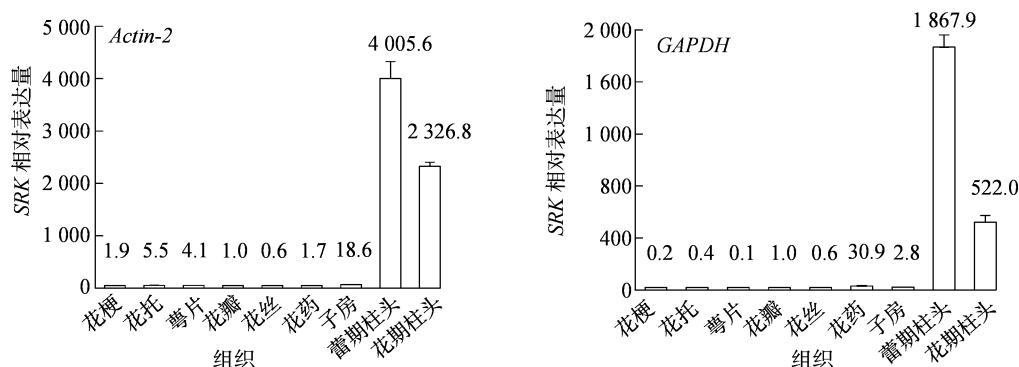
此外,通过筛选到的内参基因分析青花菜自交不亲和反应中扮演着重要角色的基因 *SRK* 的表达情况可以验证所筛选到的内参基因的可行性,使用 *Actin-7* 和 *UBC7* 的分析结果显示 *SRK* 在柱头组织中特异表达,表达量与柱头熟性成正相关,这个验证结果与预期的已报道的 *SRK* 基因表达模式较为一致,也表明了 *SI* 反应中 *SRK* 作为雌性识别因子的重要性^[39-41];而不稳定的内参基因 *GAPDH* 和 *Actin-2* 的使用导致了 *SRK* 表达模式相反的结果。基于以上信息,不建议在青花菜 *SI* 中使用这 2 个基因。

本研究基于 17 个候选内参基因的表达特性,系统地评估了其在青花菜 *SI* 相关基因定量表达研究的适用性,筛选获得了 2 个适用的内参基因 *Actin-7* 和 *UBC7*,并通过验证已报道的 *SRK* 的表达分析来说明本研究筛选结果的可行性。研究结果为开展青花菜自交不亲和相关基因的表达特征分析提供了稳定的内参基因,为后续开展关键基因的挖掘、利用以及自交不亲和分子调控网络解析奠定了基础。

参考文献:

[1]林俊城,吴秋云,高灿红,等. 青花菜硫、硒代谢竞争及其对保健功能的影响研究进展[J]. 中国细胞生物学报,2011,33(4): 422-432.

[2]解鸿蕾,车文静,苏越,等. 十字花科蔬菜的抗癌作用[J]. 食

图6 分别以筛选到稳定的内参基因 *Actin-7* 和 *UBC7* 作为内参基因时 *SRK* 基因的表达模式图7 分别以筛选到不稳定的内参基因 *Actin-2* 和 *GAPDH* 作为内参基因时 *SRK* 基因的表达模式

品安全导刊,2022(34):172-175.

- [3] 李占省,戚如诗,刘玉梅,等. 我国青花菜生产布局、价格变化及趋势[J]. 长江蔬菜,2021(4):1-5.
- [4] 吴 名. 利用分子标记辅助选育甘蓝型油菜自交不亲和系[D]. 武汉:华中农业大学,2015.
- [5] 寇小培. 分子标记辅助选育甘蓝型油菜自交不亲和系[D]. 武汉:华中农业大学,2012.
- [6] 郑 敏,朱陈曾,刘梦慈,等. 基于 *SRK* 基因序列分析的甘蓝自交不亲和系单倍型鉴定及验证[J]. 中国蔬菜,2018(3):32-39.
- [7] 许明超,黄 倩,张康妮,等. 甘蓝型油菜隐性细胞核雄性不育系 LY31AB 的选育及利用[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2023,49(4):507-515.
- [8] Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, et al. The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma* [J]. Nature, 2000,403(6772):913-916.
- [9] Murase K, Shiba H, Iwano M, et al. A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling [J]. Science,2004,303(5663):1516-1519.
- [10] Horisaki A, Niikura S. Developmental and environmental factors affecting level of self-incompatibility response in *Brassica rapa* L. [J]. Sexual Plant Reproduction,2008,21(2):123-132.
- [11] 蓝兴国,杨 佳,赵 昕,等. 羽衣甘蓝 *ARCI* 的基因分离、表达及与 *SRK* 相互作用的分析[J]. 园艺学报,2011,38(12):2342-2348.
- [12] Kusaba M, Matsushita M, Okazaki K, et al. Sequence and structural diversity of the S locus genes from different lines with the same self-

recognition specificities in *Brassica oleracea* [J]. Genetics,2000,154(1):413-420.

- [13] Schopfer C R, Nasrallah M E, Nasrallah J B, et al. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica* [J]. Science,1999,286(5445):1697-1700.
- [14] 魏小春,姚秋菊,原玉香,等. 大白菜高代自交系 S 单元型的分布[J]. 河南农业科学,2015,44(11):109-113,119.
- [15] 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):145-53.
- [16] Fu J X, Wang Y, Huang H, et al. Reference gene selection for RT-qPCR analysis of *Chrysanthemum lavandulifolium* during its flowering stages[J]. Molecular Breeding,2013,31(1):205-215.
- [17] 王 成. 不结球白菜自交不亲和及相关基因及转录组分析[D]. 南京:南京农业大学,2017.
- [18] 江汉民,刘莉莉,徐嘉艺,等. 青花菜高代自交系 S 单元型的鉴定及 *SRK* 基因表达分析[J]. 南开大学学报(自然科学版),2018,51(3):60-65.
- [19] Gachon C, Mingam A, Charrier B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? [J]. Journal of Experimental Botany,2004,55(402):1445-1454.
- [20] 袁 伟,万红建,杨悦俭. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择[J]. 植物学报,2012,47(4):427-436.
- [21] 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.
- [22] 孙 静. 铁皮石斛 qPCR 内参基因的筛选及开花相关基因的表达分析[D]. 南京:南京师范大学,2017.
- [23] Song J H, Yang J, Pan F, et al. Differential expression of micro RNAs may regulate pollen development in *Brassica oleracea* [J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(4): 15024 – 15034.
- [24] de Spiegelaere W, Dern – Wieloch J, Weigel R, et al. Reference gene validation for RT – qPCR, a note on different available software packages[J]. PLoS One, 2017, 10(3): e0122515.
- [25] Leelatanawit R, Saetung T, Phuengwas S, et al. Selection of reference genes for quantitative real – time PCR in postharvest tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) treated by continuous low – voltage direct current electricity to increase secondary metabolites [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 52(9): 1942 – 1950.
- [26] 张 颖, 陈婉婷, 陈冉红, 等. 杉木实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. 林业科学研究, 2019, 32(2): 65 – 72.
- [27] Xiao X L, Ma J B, Wang J R, et al. Validation of suitable reference genes for gene expression analysis in the halophyte *Salicornia europaea* by real – time quantitative PCR [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 5(1): 788.
- [28] Delporte M, Legrand G, Hilbert J L, et al. Selection and validation of reference genes for quantitative real – time PCR analysis of gene expression in *Cichorium intybus* [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6(1): 651.
- [29] 左同鸿. 甘蓝 SI 相关基因 *BoPUB3L* 和 *BoGSTL21* 的克隆与分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [30] 张 彤. 甘蓝型油菜自交不亲和反应候选基因的功能研究及挖掘 [D]. 湖北: 华中农业大学, 2018.
- [31] 郭怡婷, 孙世英, 赵文菊, 等. 球茎甘蓝 qRT – PCR 内参基因的筛选及稳定性验证 [J]. 甘肃农业大学学报, 2024, 59(1): 144 – 152.
- [32] 李 晗, 李治龙, 李晓屿, 等. 羽衣甘蓝不同组织及柱头发育实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 植物研究, 2016, 36(4): 565 – 572.
- [33] 张 冠, 杨迎霞, 陆国清, 等. 花椰菜花球中花青素合成相关基因 qRT – PCR 内参基因的筛选 [J]. 分子植物育种, 2024, 22(9): 2938 – 2946.
- [34] Yan X, Zhang Q L, Zou J, et al. Selection of optimized reference genes for qRT – PCR normalization in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* cultured in different media [J]. Current Microbiology, 2019, 76(5): 613 – 619.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] 吴建阳, 何 冰, 杜玉洁, 等. 利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行内参基因稳定性分析的方法 [J]. 现代农业科技, 2017(5): 278 – 281.
- [39] 杨 琳. 受体激酶 SRK 与 FERONIA 调控大白菜远缘杂交生殖隔离的分子机制 [D]. 山东: 山东农业大学, 2023.
- [40] 张以忠, 曾文艺, 邓琳琼, 等. 甘蓝 S – 位点基因 *SRK*、*SLG* 和 *SP11/SCR* 密码子偏好性分析 [J]. 作物学报, 2022, 48(5): 1152 – 1168.
- [41] Chen W D, Zhang B, Ren W J, et al. An identification system targeting the *SRK* gene for selecting S – haplotypes and self – compatible lines in cabbage [J]. Plants, 2022, 11(10): 1372 – 1372.
- [42] 裴徐梨, 冯鹏宇, 唐 征, 等. 青花菜花蕾发育 *LncRNAs* 内参基因筛选 [J]. 河南农业科学, 2023, 52(1): 125 – 133.
- [43] 裴徐梨, 焦 鹏, 荆赞革, 等. 非生物胁迫下青花菜 *LncRNA* 内参基因的筛选 [J]. 西北农业学报, 2023, 32(4): 593 – 599.
- [44] Zeng A S, Xu Y Y, Song L X, et al. Validation of suitable reference genes for qRT – PCR in cabbage (*Brassica oleracea* L.) under different abiotic stress experimental conditions [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2021, 30(1): 184 – 195.
- [45] 李浩霞, 黄稳娥, 柳西宁, 等. 枸杞实时荧光定量 RT – qPCR 内参基因筛选与验证 [J]. 江苏农业科学, 2023, 51(9): 41 – 51.
- [46] 穆德添, 万凌云, 章 瑶, 等. 钩藤管家基因筛选及生物碱合成相关基因的表达分析 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(2): 126 – 138.
- [47] Lee J M, Roche J R, Donaghy D J, et al. Validation of reference genes for quantitative RT – qPCR studies of gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. BMC Molecular Biology, 2010, 11(1): 8.
- [48] Li H, Qin Y, Xiao X, et al. Screening of valid reference genes for real – time RT – qPCR data normalization in *Hevea brasiliensis* and expression validation of a sucrose transporter gene *HbSUT3* [J]. Plant Science, 2011, 181(2): 132 – 139.