

DOI:10.12171/j.1000-1522.20240054

芍药切花内参基因筛选及乙烯生物合成 关键基因表达分析

戴睿¹ 段帅帅¹ 肖士奎¹ 卫志鹏² 吕淑芳¹ 史国安¹ 吴疆³ 范丙友¹

(1. 河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471023; 2. 洛阳绿珠园艺有限公司, 河南 洛阳 471131; 3. 榆林学院信息工程学院, 陕西 榆林 719000)

摘要:【目的】筛选芍药切花开放至衰老过程中和盛花期不同组织中稳定表达的最适内参基因, 深入解析 *ACS* 和 *ACO* 基因在乙烯介导的芍药切花开放至衰老过程中的功能。【方法】(1) 以芍药‘桃花飞雪’为材料, 基于 qRT-PCR 技术分析 13 个候选内参基因在芍药切花开放至衰老不同时期及盛花期不同组织中表达水平的变化, 应用 geNorm、NormFinder、BestKeeper 等软件和 ΔCt 法对其表达稳定性进行了评价; 通过在线 RefFinder 网站分析获得候选内参基因表达稳定性的综合排名。(2) 利用筛选出的双内参基因, 对乙烯生物合成关键基因 *ACS* 和 *ACO* 在芍药切花开放至衰老不同时期及盛花期不同组织中的表达水平进行定量分析。【结果】(1) 在芍药切花开放至衰老的不同时期, geNorm 分析表明 *GAPDH* 和 *RAN3* 表达稳定性最好; NormFinder 分析显示 *RAN3* 表达最稳定; BestKeeper 分析表明 *18S rRNA* 表达稳定性最好; RefFinder 综合分析表明 *RAN3* 和 *GAPDH* 为最适内参基因。(2) 在盛花期芍药切花花器官不同组织中, geNorm 分析表明 *ARF* 和 *PP2A* 表达稳定性最好; NormFinder 分析显示 *UBQ* 表达最稳定; BestKeeper 分析表明 *GAPDH* 表达稳定性最好; RefFinder 综合分析表明 *UBQ* 和 *ARF* 为最适内参基因。(3) 在芍药切花开放至衰老过程中, *ACS* 基因表达量显著低于 *ACO* 基因表达量, 是调控乙烯合成的开关; *ACO* 主要在切花开放前期(瓶插 0~12 h)发挥作用; *ACS* 表达量在绽口期和衰老期(瓶插 6 h 和 144 h)均发挥重要作用, 并在盛花期对乙烯合成起到限制作用; (4) 在芍药切花盛花期不同组织中, *ACS* 基因表达量显著低于 *ACO*, *ACS* 和 *ACO* 基因的表达存在组织差异性, 且均在茎和花萼中表达较高。【结论】本研究筛选出芍药切花开放至衰老不同时期(*RAN3* 和 *GAPDH*)以及盛花期不同组织中(*UBQ* 和 *ARF*)qPCR 定量表达分析的双内参基因组合; 乙烯生物合成关键基因 *ACO* 主要在芍药切花开放过程发挥作用, *ACS* 基因在芍药切花开放和衰老过程均发挥重要的作用。研究结果将为切花寿命的改良提供参考。

关键词: 芍药; 内参基因; 表达稳定性; 开花; 衰老; 乙烯生物合成

中图分类号: S682.1⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2025)01-0106-10

引文格式: 戴睿, 段帅帅, 肖士奎, 等. 芍药切花内参基因筛选及乙烯生物合成关键基因表达分析 [J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(1): 106-115. Dai Rui, Duan Shuaishuai, Xiao Shikui, et al. Screening of internal reference genes of cut flowers of *Paeonia lactiflora* and expression analysis of key genes of ethylene biosynthesis [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(1): 106-115.

Screening of internal reference genes of cut flowers of *Paeonia lactiflora* and expression analysis of key genes of ethylene biosynthesis

Dai Rui¹ Duan Shuaishuai¹ Xiao Shikui¹ Wei Zhipeng² Lü Shufang¹
Shi Guoan¹ Wu Jiang³ Fan Bingyou¹

(1. College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China;
2. Luoyang Lüzhu Horticulture Co., Ltd, Luoyang 471131, Henan, China;
3. College of Information Engineering, Yulin 719000, Shaanxi, China)

收稿日期: 2024-03-07 修回日期: 2024-04-15

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD1000400), 国家自然科学基金项目(U1204323)。

第一作者: 戴睿。主要研究方向: 植物分子生物学。Email: 1026019364@qq.com 地址: 471023 洛阳市洛龙区开元大道 263 号河南科技大学农学院。

责任作者: 吴疆, 博士, 教授。主要研究方向: 生物信息学。Email: wujiang@yulinu.edu.cn 地址: 719000 陕西省榆林市崇文路 51 号榆林学院信息工程学院。范丙友, 博士, 教授。主要研究方向: 植物分子生物学。Email: fanbingyou2005@163.com 地址: 471023 洛阳市洛龙区开元大道 263 号河南科技大学农学院。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

Abstract: [Objective] This study aims to select the most suitable reference genes, which are stably expressed during the process from the opening to senescence and different tissues in blooming period of peony cut flowers, and to deeply analyze the function of *ACS* and *ACO* genes in ethylene-mediated process of peony cut flower opening to senescence. [Method] (1) With cultivar ‘Taohuafeixue’ as materials, the variations of expression levels of 13 candidate internal reference genes at different stages from blooming to senescence and in different tissues of the full bloom stage in herbaceous peony cut flowers were analyzed by qRT-PCR. The expression stability of 13 candidate internal reference genes was assessed by ΔCt and 3 softwares including geNorm, NormFinder, and BestKeeper. The comprehensive rankings of expression stability of candidate internal reference genes were obtained by online RefFinder analysis. (2) Based on the selected double internal reference genes, the expression profile of *ACS* and *ACO*, key genes of ethylene biosynthesis were quantitatively analyzed at different stages from blooming to senescence and in different tissues of full bloom stage in herbaceous peony cut flowers. [Result] (1) geNorm analysis showed that the expression stability of *GAPDH* and *RAN3* at different stages was best. NormFinder analysis indicated that the expression stability of *RAN3* was optimal. BestKeeper analysis illustrated that 18S *rRNA* expression was the most stable. RefFinder analysis indicated that *RAN3* and *GAPDH* were the best suitable internal reference genes at different stages. (2) geNorm analysis indicated that the expression of *ARF* and *PP2A* in different tissues had the best expression stability. NormFinder analysis showed that the expression of *UBQ* was the most stable. BestKeeper analysis illustrated that *GAPDH* was best. RefFinder analysis indicated that *UBQ* and *ARF* were the best internal reference genes in different tissues in herbaceous peony cut flowers. (3) From opening to senescence process of peony cut flowers, the expression of *ACS* gene was significantly lower than that of *ACO* gene, and *ACS* was the ‘switch’ for the regulation of ethylene synthesis. *ACO* mainly played a role in pre-opening stage of cut flowers (0–12 h). *ACS* expression played an important role both in the bloom stage and in the senescence stage (6 h and 144 h), and played a limiting role in ethylene synthesis during the bloom stage. (4) *ACS* expression was significantly lower than *ACO* in different tissues of peony cut flowers during blooming period, there was tissue variability in the expression of *ACS* and *ACO*, and both of them were higher in stems and calyxes. [Conclusion] This study screens double internal reference gene combinations for qPCR quantitative expression analysis in different tissues of herbaceous peony cut flowers at varied periods from opening to senescence (*RAN3*, *GAPDH*) and at full bloom (*UBQ*, *ARF*). *ACO* gene, a key gene of ethylene biosynthesis mainly plays a role in the blooming process, and *ACS* plays an important role in both blooming and senescence process in herbaceous peony cut flowers. The finding will provide a reference for the improvement of cut flower longevity.

Key words: *Paeonia lactiflora*; internal reference genes; expression stability; blooming; senescence; ethylene biosynthesis

芍药(*Paeonia lactiflora*)为芍药科(Paeoniaceae)芍药属(*Paeonia*)多年生草本植物,是中国传统名花之一,兼具药用、观赏和油用价值。芍药花色丰富,花型娇美,花梗长而挺直,因而适宜应用于切花^[1]。‘桃花飞雪’(*Paeonia lactiflora* ‘Taohuafeixue’)是我国优良的传统芍药切花品种,花型为皇冠型,形态娇美,花量大,花初开桃红色,盛开后变粉^[2]。但‘桃花飞雪’切花的瓶插期相对较短,影响了其商业价值的开发。‘桃花飞雪’为乙烯敏感型花卉,其花瓣具有明显的乙烯释放速率跃变峰,此时花瓣快速释放乙烯,诱导花瓣呼吸跃变峰出现,从而启动切花衰老^[3]。与月季(*Rosa hybrida*)^[4]和康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)^[5-6]相比,芍药切花衰老的分子机制研

究还相对落后。乙烯作为植物体内唯一的气体植物激素,介导并调控种子发芽、根系生长、果实成熟和花叶脱落等生长和发育过程^[7]。在乙烯的生物合成途径中,1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶(*ACS*)催化 S-腺苷甲硫氨酸(*SAM*)生成 1-氨基环丙烷-1-羧酸(*ACC*),*ACC*进一步在 *ACC* 氧化酶(*ACO*)作用下生成乙烯^[7]。李芳^[8]前期已克隆‘桃花飞雪’芍药切花乙烯生物合成关键基因 *ACS* 和 *ACO*,肖士奎等^[9]在大肠杆菌中异源高效表达了芍药 *ACS* 蛋白,但 *ACS* 和 *ACO* 基因在乙烯介导的芍药切花衰老过程中的功能尚未深入解析。

基因表达量检测是一种用于评估基因功能和表达水平的重要方法^[10]。实时荧光定量 PCR(qRT-

PCR)技术基于荧光信号的积累实时监测整个 PCR 进程,应用标准曲线对 PCR 扩增的模板进行定量分析^[11]。内参基因在检测目标基因表达水平变化中起到校正作用,是检测基因表达量的必要参照,筛选合适的内参基因是基于 qRT-PCR 技术研究基因表达的关键^[12]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)和玉米(*Zea mays*)等模式植物中,常用的内参基因有 *Actin*、 α -*tubulin*、 β -*tubulin*、*GAPDH* 和 *EF-1 α* 等^[13]。前人对芍药‘紫芙蓉’(*Paeonia lactiflora* ‘Zifurong’)内参基因开展了研究,但选用的候选内参基因较少,且仅对 *PIF3H* 基因在芍药花瓣不同发育时期的表达水平进行了验证,缺乏该基因在不同组织中表达水平的验证^[14]。大量研究结果^[15-17]表明,不同物种、同物种不同品种、不同组织、不同发育时期的最佳内参基因存在一定差异。因此,筛选适宜的内参基因是开展‘桃花飞雪’乙烯代谢关键基因 *ACS* 和 *ACO* 的表达模式研究的前提条件。

本研究基于芍药‘桃花飞雪’转录组测序数据(DRX027794),筛选出 13 个候选内参基因并设计了特异性 qRT-PCR 引物,采用 qRT-PCR 技术定量分析 13 个候选内参基因在芍药切花开放至衰老过程中不同时期及盛花期不同组织中的表达水平。基于 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件分析结果,应用 RefFinder 在线网站综合分析 13 个候选内参基因的表达稳定性。基于综合评定筛选出的双内参基因,对乙烯合成关键基因 *ACS* 和 *ACO* 在芍药切花开放至衰老过程及盛花期不同组织中的表达进行定量分析,以期为后续揭示芍药切花乙烯致衰的分子机理奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

‘桃花飞雪’芍药切花采自洛阳绿珠园艺有限公司,参照芍药切花不同发育时期的形态标准^[18],将‘桃花飞雪’切花划分为绽口期(0~6 h, S2)、初开期(12 h, S3)、半开期(24 h, S4)、盛花期(36~72 h, S5)、始衰期(96 h, S6)和衰败期(120~144 h, S7)。上午 09:00 前采收花色和大小一致,带 2~3 片复叶,长约 25 cm 的绽口期花枝,立即带回实验室。绽口期的切花复水后立即用蒸馏水瓶插,分别于瓶插 0、6、12、24、36、48、72、96、120 和 144 h 取花瓣样品,并于盛花期(48 h)取花瓣、叶、茎、花萼和雌蕊不同组织,用液氮速冻后置于-80 °C 冰箱保存备用。

PrimerScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、DL2000 DNA Marker、Recombinant DNase I、2 ×

SYBR Premix Ex Taq Mix、TB Green® Premix Ex Taq™ 均购自宝生物工程(大连)有限公司,其余试剂为国产分析纯;NanoDrop 购自赛默飞世尔科技公司,实时荧光定量 PCR 仪为罗氏 LightCycler 480 II。

1.2 研究方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成

利用 CTAB-LiCl 法提取‘桃花飞雪’总 RNA^[19],Recombinant DNase I 去除总 RNA 中的 DNA 污染,利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量和完整性,利用 Thermo Fisher NanoDrop 测定总 RNA 的浓度。将所有样品总 RNA 浓度调整一致,每个样品取 1 μ g 总 RNA,反转录生成 cDNA,用于后续的荧光定量 PCR 分析。

1.2.2 候选内参基因选择及引物设计

基于‘桃花飞雪’花瓣转录组(DRX027794)KEGG 分析结果,参考常见管家基因^[20]和牡丹^[21]等近缘植物中常用的内参基因,选取 13 个候选内参基因:18S *rRNA*、*Actin1*、*Actin2*、*RPL40*、*GAPDH*、*UBQ*、*UBQ-L10*、*ARF*、*EF1 α* 、*PP2A*、*RAN3*、*RPL23*、*TUA*。应用 Primer Premier 5.0 软件,设计 13 个候选内参基因、芍药乙烯生物合成关键基因 *ACS* 和 *ACO* 基因的特异性 qRT-PCR 引物(表 1),引物序列由华大基因(北京)公司合成。

1.2.3 qRT-PCR 分析

qRT-PCR 反应体系为 20 μ L,其中 TB Green® Premix Ex Taq™ 为 10 μ L,10 mmol/L 上下游引物各 0.6 μ L,cDNA 模板 1 μ L,ddH₂O 7.8 μ L。每个处理设置 3 个生物学重复,每个样品设置 3 次技术重复,用 ddH₂O 代替模板进行反应作为阴性对照。反应程序参照试剂盒说明书进行。根据定量结果获得 13 个候选内参基因的 Ct 值(qRT-PCR 荧光信号达到设定阈值的循环数),用以分析候选内参基因的表达丰度。将 qRT-PCR 仪自带软件 Bio-Rad CFX Manager 3.1 导出的原始数据输入到 LinRegPCR 软件^[22]进行分析,计算 PCR 扩增效率(*E*)和决定系数(*R*²),*E* 值越接近 2.0,*R*² 越接近 1.0,表明扩增效率越理想^[23-24]。

1.2.4 内参基因稳定性分析

分别用 geNorm^[25]、NormFinder^[26]和 BestKeeper^[27]软件和 Δ Ct 法分析 13 个候选内参基因的表达稳定性。geNorm 和 NormFinder 可通过 Ct 值计算候选基因的表达稳定性(*M*);*M* 值越小,表明其表达稳定性越好,适合作为内参基因。同时,使用 geNorm 计算候选内参基因两两组合的变异系数(*V*),*V* 值越低,稳定性越好,当 V_n/V_{n+1} 值小于 0.15 时,*n* 为最适内参基因数。将荧光定量 PCR 原始数据转换为 $2^{-\Delta$ Ct}, Δ Ct 为候选内参基因的 Ct 与所有分析样品内参基

表 1 qRT-PCR 引物信息
Tab. 1 Information for qRT-PCR primers

基因	引物序列	产物长度/bp
18S rRNA	F: TCAGCCTTGCACCATACTCC R: AACCATAAACGATGCCGACCA	113
Actin1	F: AAGCCCAGTCCAAGAGAGGTA R: ATTGTAGAAGGTGTGATGCCA	107
Actin2	F: TAACCCCAAAGCCAACAGAGAA R: CACCAGAATCCAGCACAAATACC	140
RPL40	F: AATACCTCCTGACCAACA R: CTCATAAATTCACCTCG	133
GAPDH	F: TAAAGGGTGGTCTAAGAAG R: CAATGTGAAGATCAGGAGTG	105
UBQ	F: GACTCTCCATCTGGTCTCA R: CCTTCACATTATCAATCGTATC	116
UBQ-L10	F: AAGGCCAAGATCCAGGATAA R: CGCAAGACAAGGTGAAGAGT	137
ARF	F: AGACATTACTTCCAAAACACCC R: GCATCCCTTAGTTCATCCTCGT	122
EF1 α	F: GCCCTACTGGACTGACCACTGA R: GGATGCTACATAACCACGCTT	140
PP2A	F: GCTGCTCAGTCAACCACACC R: GCACTAAATACCGTTACCACAT	113
RAN3	F: AAGAACAGGCAGGTGAAGGCA R: ACGGGCAAGGTAGAGAAAAGG	120
RPL23	F: GAGCCAAGAACCTTTACATC R: TTGACAGTTGCCATCACCAT	100
TUA	F: AGTCTACCCATCCCACAAG R: CAAGGAGAACTGCCACATCA	104
ACS	F: TCGGAGCCTGGATGGTTTAG R: TTGCCAACTTTGTTTCTTCTT	135
ACO	F: GTTCTCCTATGCGTCATTCCA R: TCCTATTACCATCGGTTTGAGC	118

因 Ct 最小值的差值, $2^{-\Delta Ct}$ 越小, 表明其表达稳定性越好, 越适合作为内参基因。BestKeeper 通过候选内参基因的 Ct 值计算得到各内参基因的标准偏差 (SD), 标准偏差越小, 内参基因表达越稳定。

基于在线网站 RefFinder^[28](<http://blooge.cn/RefFinder/>)对各候选内参基因 ΔCt 法、geNorm、NormFinder、BestKeeper 软件中的表达稳定性进行综合排序。

1.2.5 乙烯生物合成关键基因 ACS 和 ACO 的表达分析

将表达最稳定的 2 个候选基因作为双内参基因

对乙烯生物合成关键基因 ACS 和 ACO 进行表达模式分析。qPCR 反应体系为 10 μ L, 其中 $2 \times$ SYBR Premix Ex Taq Mix 为 5 μ L, 10 mmol/L 上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 3 μ L。每个处理设置 3 个生物学重复, 每个样品设置 3 次技术重复。反应程序参照试剂盒说明书进行。在 Excel 中采用 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 法计算 ACO 和 ACS 基因的相对表达量, 在切花开放至衰老不同时期以 0 h ACO 表达量为参照, 对 ACS 表达量进行归一化分析; 在盛花期不同组织中以叶片组织 ACO 表达量为参照, 对 ACS 表达量进行归一化分析, 使用 SPSS 软件对数据进行显著性分析, 使用 Graphpad Prism 8.0 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 引物特异性验证

以芍药品种‘桃花飞雪’不同发育时期的花瓣样品及盛花期花瓣、叶、茎、花萼、雌蕊不同组织 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 分析, 利用实时荧光定量 PCR 仪自带软件 (Bio-Rad CFX Manager 3.1) 绘制出各内参基因 PCR 产物的熔解曲线。图 1 显示: 13 个候选内参基因 PCR 产物的熔解曲线均呈现单峰, 说明设计的引物均能特异性扩增各候选内参基因; PCR 扩增曲线的重复性高, 不存在引物二聚体, 表明 qRT-PCR 的分析结果可靠。

2.2 PCR 扩增效率评价

13 个候选内参基因的 R^2 范围为 0.999 ~ 1.000, 较接近 1.0, PCR 扩增效率范围为 1.811 ~ 2.037, 均值为 1.950, 均较接近 2.0, 符合 qRT-PCR 对扩增效率的要求 (表 2)。

2.3 候选内参基因表达丰度分析

Ct 值的大小能反映基因的表达丰度的高低, Ct 值越小, 基因表达丰度越高。候选内参基因在芍药切花不同发育时期及盛花期不同组织中的 Ct 分布箱式图如图 2 所示。在两种情况下, 各内参基因的 Ct 值介于 8.83 ~ 34.48, 其中 18S rRNA 平均 Ct 值最小, 表明其表达丰度相对较高, RPL40 的 Ct 值最大, 表明其表达丰度较低。

2.4 geNorm 程序分析内参基因表达稳定性

用 geNorm 程序对 13 个候选内参基因在芍药切花开放至衰老不同时期花瓣样品及盛花期花瓣、叶、茎、花萼、雌蕊不同组织中的表达稳定性进行分析, 对表达稳定值 (M) 进行排序。结果表明: 在芍药切花开放至衰老的不同时期, GAPDH 和 RAN3 表达最稳定, 而 UBQ-L10 表达最不稳定 (图 3a); 在芍药切花不同组织中, ARF 和 PP2A 表达最稳定, 而 UBQ-L10 表达最不稳定 (图 3b)。

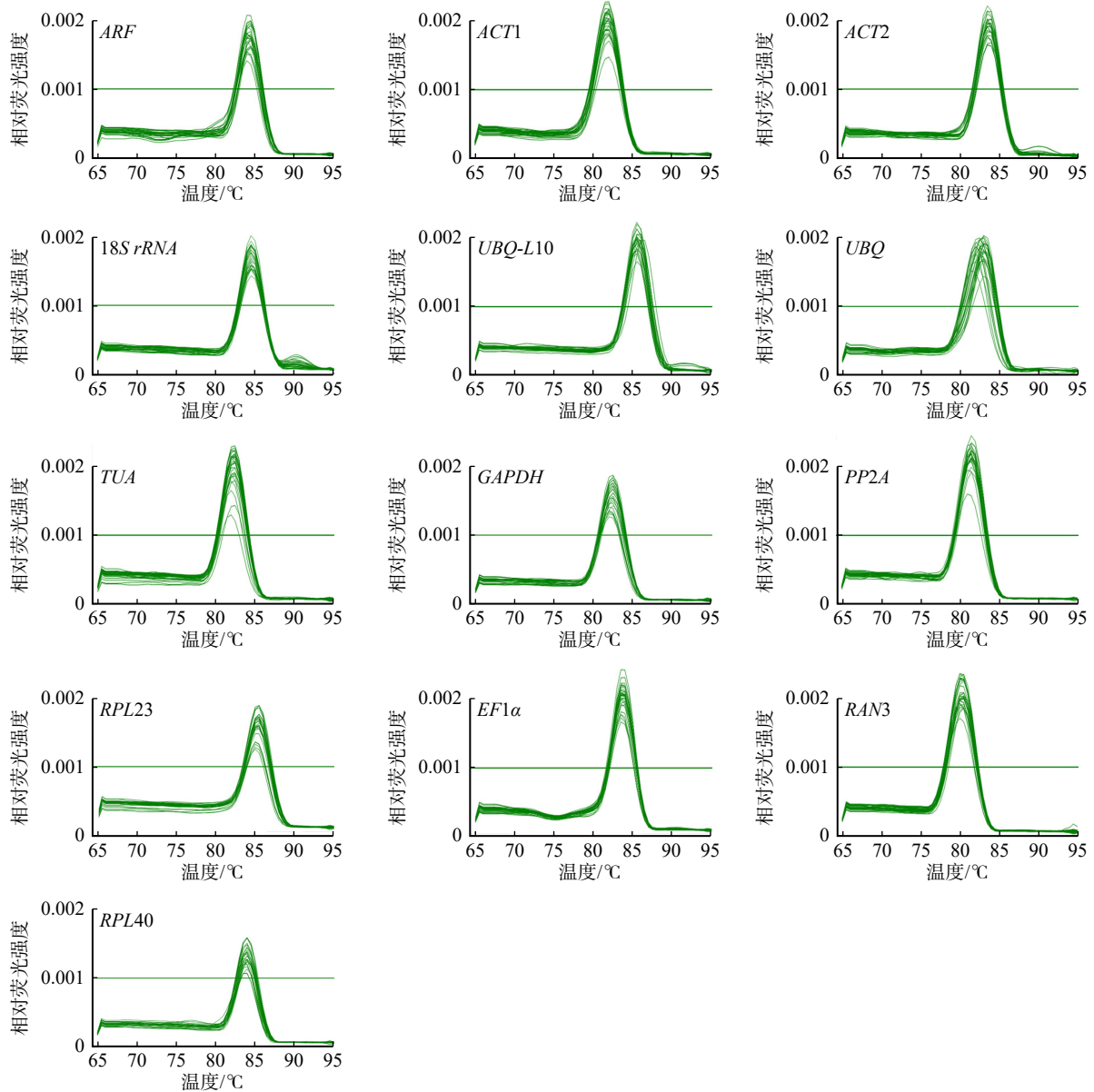


图1 13个候选内参基因PCR产物的熔解曲线

Fig. 1 Melting curves of PCR products of 13 candidate internal reference genes

表2 内参基因PCR引物序列及相关信息

Tab. 2 PCR primer sequences and related information for internal reference genes

基因	扩增效率(E)	决定系数(R^2)
18S <i>rRNA</i>	1.811	0.999 29
<i>ACT1</i>	1.978	0.999 39
<i>ACT2</i>	1.965	0.999 59
<i>RPL40</i>	1.903	0.999 21
<i>GAPDH</i>	1.954	0.999 27
<i>UBQ</i>	1.926	0.999 25
<i>UBQ-L10</i>	2.037	0.999 14
<i>ARF</i>	1.958	0.999 21
<i>EF1α</i>	1.989	0.999 37
<i>PP2A</i>	1.981	0.999 26
<i>RAN3</i>	1.994	0.999 27
<i>RPL23</i>	1.931	0.999 25
<i>TUA</i>	1.924	0.999 55

两组样品的 V_2/V_3 均小于 0.15, 表明在芍药不同发育时期及不同组织样品中, 最适内参基因数均为 2 个。综上, 不同发育时期最佳内参基因组合为 *GAPDH* 和 *RAN3*, 不同组织最佳内参基因组合为 *ARF* 和 *PP2A*(图 4)。

2.5 NormFinder 程序分析内参基因表达稳定性

利用 NormFinder 计算 13 个候选内参基因表达的稳定值(表 3)。在芍药切花开放至衰老不同时期的花瓣样品中, *RAN3* 的稳定值最小(0.160), 稳定性最高, 而 *UBQ-L10* 的稳定值最大(1.699), 稳定性最低; 在盛开花瓣、叶、茎、花萼、雌蕊不同组织中, *UBQ* 的稳定值最小(0.116), 稳定性最高, 而 *UBQ-L10* 稳定值最大(1.903), 稳定性最低。

2.6 BestKeeper 程序分析内参基因表达稳定性

用 BestKeeper 计算 13 个候选内参基因的标准

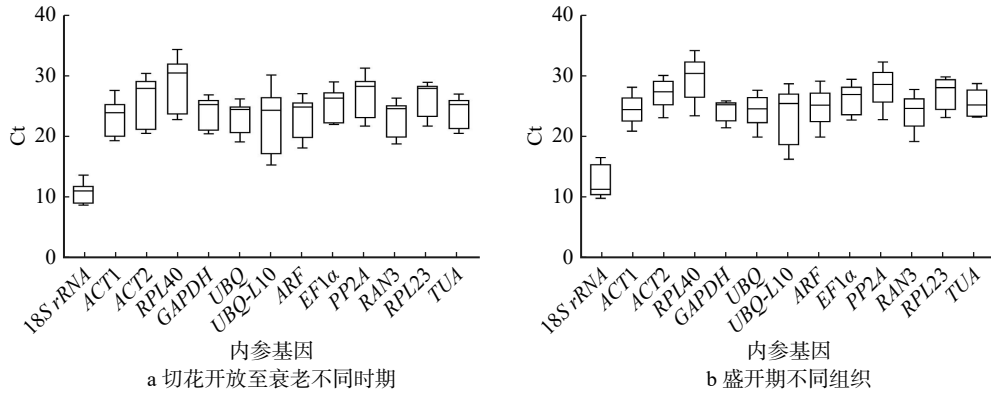


图 2 内参基因 Ct 分布箱式图

Fig. 2 Box plot of Ct distribution of internal reference genes

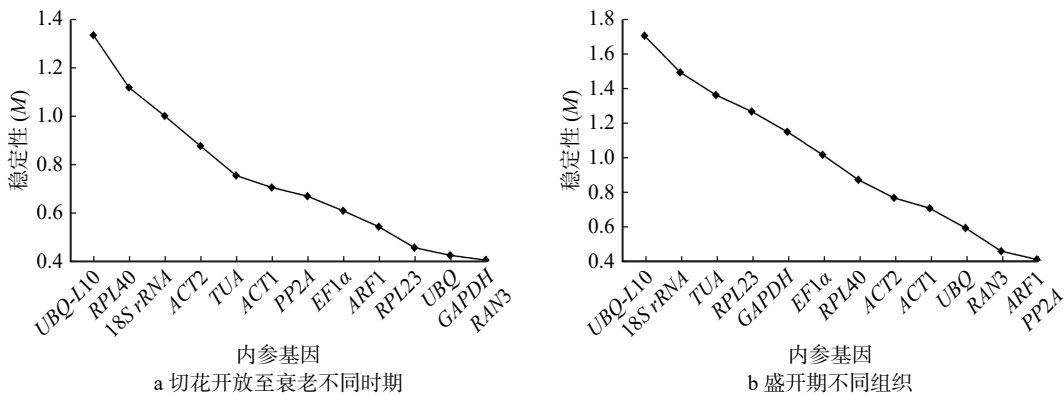


图 3 13 个内参基因表达稳定性的 geNorm 分析结果

Fig. 3 geNorm analysis results of expression stability of 13 internal reference genes

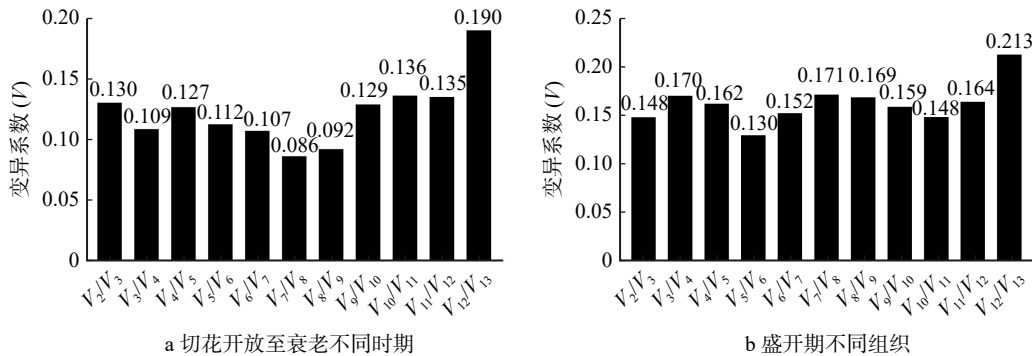


图 4 标准化的内参基因个数的 geNorm 分析结果

Fig. 4 geNorm analysis results of standardized internal reference gene number

偏差, 并比较其大小, 确定稳定性最好的内参基因。结果表明: 在芍药切花开放至衰老不同时期, 18S *rRNA* 的标准偏差最小, 稳定性最好(图 5a); 在盛花期不同组织中, *GAPDH* 的标准偏差最小, 稳定性最好(图 5b)。

2.7 RefFinder 网站综合评定内参基因表达稳定性

基于 geNorm、NormFinder、BestKeeper 和 ΔCt 法 4 种算法的分析结果, 利用 RefFinder 对 13 个候选内参基因进行综合排序。*RAN3* 和 *GAPDH* 在芍药切花开放至衰老不同时期的稳定性较好, 可以作为这个过程基因表达分析的双内参基因(表 4)。

UBQ 和 *ARF* 在芍药切花不同组织的稳定性较好, 可以作为这个过程基因表达分析的双内参基因(表 5)。

2.8 乙烯生物合成关键基因定量表达分析

以综合评定稳定性最好的 *RAN3* 和 *GAPDH* 为双内参基因, 分析乙烯生物合成关键基因 *ACS* 和 *ACO* 在芍药切花开放至衰老过程中的表达模式(图 6)。结果显示, 在切花开放过程中(0 ~ 12 h), *ACS* 表达量在绽口期(6 h)出现了一个小的跃变, 推测 *ACS* 在切花开放过程中促进乙烯的合成, 以推动切花的开放。在盛花期(36 ~ 72 h) *ACS* 表达量相对

表3 13个内参基因表达稳定性的 NormFinder 分析结果

Tab. 3 NormFinder analysis result of expression stability of 13 internal reference genes

基因	切花开放至衰老不同时期		盛花期不同组织	
	稳定值(M)	排名	M	排名
18S rRNA	1.204	12	1.311	12
ACT1	0.357	4	0.328	4
ACT2	0.743	10	0.236	2
RPL40	0.959	11	0.862	8
GAPDH	0.454	6	0.978	9
UBQ	0.481	7	0.116	1
UBQ-L10	1.699	13	1.903	13
ARF	0.222	3	0.333	5
EF1 α	0.391	5	0.760	7
PP2A	0.173	2	0.509	6
RAN3	0.160	1	0.274	3
RPL23	0.504	8	1.205	10
TUA	0.665	9	1.240	11

较低,此时,ACS对乙烯的产生起到限速作用。在切花衰老过程中(96~144 h)ACS表达量再次出现跃变,此时内源乙烯大量产生,芍药切花花瓣极易脱落,表现出典型的乙烯敏感特征。ACO在切花开放前期(0~12 h)表达量较高,后期持续下降,推测ACO主要在切花开放过程中发挥作用。总体上,在切花开放至衰老的各个时期,ACS表达量总体上低于ACO,是调控乙烯合成的开关;ACO主要在芍药切花开放过程发挥作用,ACS基因在芍药切花开放和衰老过程均发挥重要作用,并在盛花期对乙烯合成起到限制作用。

以综合评定稳定性最好的ARF和UBQ为内参基因,定量分析了乙烯生物合成关键基因ACS和ACO在芍药切花盛花期不同组织中的表达水平(图7)。结果显示:ACS基因在茎和花萼中表达量较高,在叶中表达量最低;ACO基因在茎和花萼中表达量较高,在花瓣中表达量最低。在芍药切花盛开

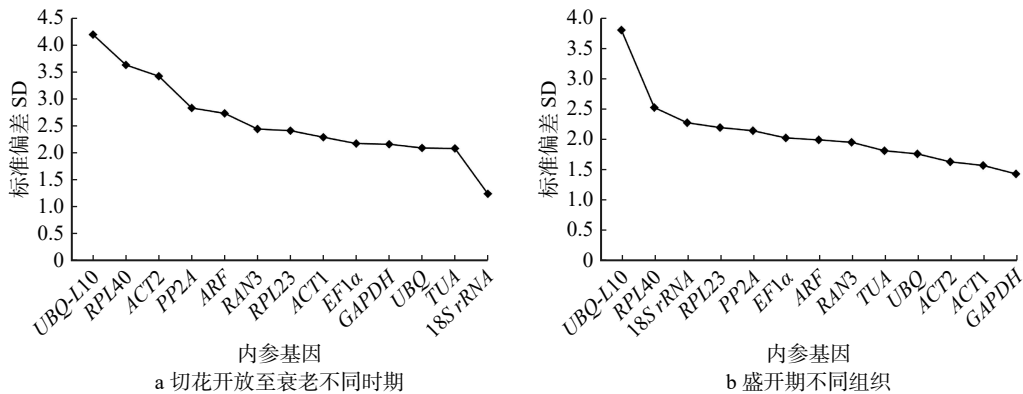


图5 13个内参基因表达稳定性 BestKeeper 分析结果

Fig. 5 BestKeeper analysis result of expression stability of 13 internal genes

表4 13个内参基因在‘桃花飞雪’切花开放至衰老不同时期花瓣中的表达稳定性综合排名

Tab. 4 Overall ranking of expression stability values of 13 internal reference genes in petals at different times from opening to senescence

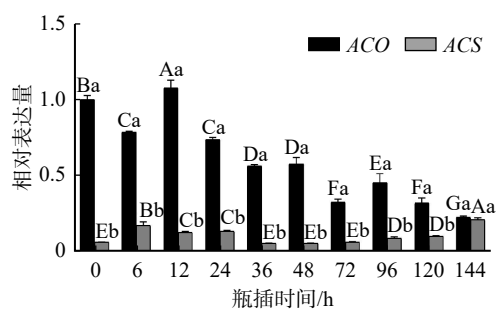
基因	ΔCt	Bestkeeper	NormFinder	geNorm	Reffinder
18S rRNA	12	1	12	11	9
ACT1	7	6	4	8	7
ACT2	10	11	10	10	11
RPL40	11	12	11	12	12
GAPDH	4	4	6	1	2
UBQ	6	3	7	3	4
UBQ-L10	13	13	13	13	13
ARF	2	9	3	5	3
EF1 α	5	5	5	6	6
PP2A	3	10	2	7	5
RAN3	1	8	1	1	1
RPL23	8	7	8	4	10
TUA	9	8	9	9	8

注:表中数据为排名次序。下同。

表5 13个内参基因在‘桃花飞雪’不同组织中的表达稳定性综合排名

Tab. 5 Overall ranking of expression stability values of 13 internal reference genes in different tissues

基因	ΔCt	Bestkeeper	NormFinder	geNorm	Reffinder
18S rRNA	12	11	12	12	12
ACT1	5	2	4	5	5
ACT2	4	3	2	6	4
RPL40	8	12	8	7	9
GAPDH	9	1	9	9	7
UBQ	1	4	1	4	1
UBQ-L10	13	13	13	13	13
ARF	3	7	5	1	2
EF1 α	7	8	7	8	8
PP2A	6	9	6	1	6
RAN3	2	6	3	3	3
RPL23	10	10	10	10	11
TUA	11	5	11	11	10

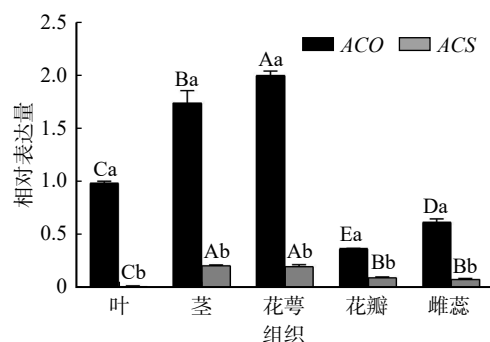


不同大写字母表示同一基因不同瓶插时间之间差异显著 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示不同基因相同瓶插时间之间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 芍药切花开放至衰老不同时期花瓣中 ACS 和 ACO 基因相对表达水平

Fig. 6 Relative expression level of ACS and ACO genes at different developmental stages from blossoming to senescence in herbaceous peony cut flowers

期不同组织中, ACS 表达量显著低于 ACO 表达量, 尽管叶片和雌蕊中的 ACS 表达性较低, 但这些器官中 ACO 基因表达量较高。总体上, 在切花盛花期不同组织中 ACS 和 ACO 的表达存在组织差异性, 但均在茎和花萼中发挥作用。



不同大写字母表示同一基因不同组织之间差异显著 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示不同基因相同组织之间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 7 ACS 和 ACO 基因在芍药切花不同组织中的定量表达分析
Fig. 7 Quantitative expression analysis of ACS and ACO genes in different tissues during full bloom stages in herbaceous peony cut flowers

3 讨 论

芍药是我国的传统名花, 深受人们喜爱。‘桃花飞雪’花茎直立性、可采切长度、花枝产量及抗逆性均较好, 是优良的芍药切花品种。开放和衰老作为植物生长的重要阶段, 严重影响着切花的瓶插寿命及市场价值^[29]。衰老作为影响切花瓶插寿命及品质的最主要因素, 与植物内外源激素变化息息相关。植物激素乙烯存在于植物整个生命周期, 调节植物开花落果、花衰老等许多生理过程^[30]。芍药是乙烯敏感型花卉, 花瓣是产生乙烯的主要器官, 乙烯快速释放诱导呼吸速率急速升高, 进而影响芍药切花的开放和衰老。ACS 和 ACO 作为乙烯合成关键酶, 严

格调控内源乙烯的合成。因此, 研究 ACS 和 ACO 基因时空表达模式, 对解析芍药切花开放及衰老过程具有重要意义。

qRT-PCR 技术因其高效、准确的优点, 被认为是基因表达定量分析的最有力手段。选择表达稳定的内参基因^[31], 确定不同类型样品最适的内参基因数目^[32]是获得高质量的 qRT-PCR 表达数据的关键。本研究筛选出了适用于芍药切花开放至衰老不同时期 (RAN3 和 GAPDH) 及盛花期不同组织 (UBQ 和 ARF) 综合评价最稳定的内参基因。这 4 个基因为常见的管家基因, 分别在金鱼草 (*Antirrhinum majus*)^[33]、凤丹 (*Paeonia suffruticosa* ‘Fengdan’)、杨山牡丹 (*Paeonia ostii*)^[34]、南瓜 (*Cucurbita moschata*)^[35] 中已有相关报道。

基于本文筛选出的双内参基因, 对‘桃花飞雪’中乙烯生物合成关键基因 ACS 和 ACO 从不同时期和不同组织两个方面进行了定量分析。在切花开放至衰老过程中, ACO 基因表达量在初开期 (12 h) 出现 1 个小的跃变峰, 后期持续下降, 推测其主要在切花开放过程中发挥作用, 这与前人在伊藤牡丹‘巴茨拉’中的研究结果^[36]一致。但也有研究表明, 在许多植物中, ACO 属于多基因家族, 它们的活动并非单一的调控, 而是可以在空间和时间上分离, 从而精确控制乙烯合成^[37]。在切花开放至衰老过程中, ACS 基因表达量在绽口期和衰败期出现 2 个跃变峰, 在盛花期相对较低, 推测 ACS 基因在芍药切花开放和衰老过程中均发挥着重要功能, 并在盛花期限制乙烯合成。文锦芬等^[38]对百合 (*Lilium* ‘Manissa’) ACS 基因进行了研究, 结果则显示 *LbACS1* 在花蕾期高表达, 而 *LbACS7* 则在绿芽期高表达, 推测不同 ACS 基因家族成员在不同生长阶段发挥了不同的功能, 从而响应植物发育变化。在盛花期不同组织中, ACS 和 ACO 均在茎和花萼中具有较高的表达量, 在其他组织中的表达量则相对较低, 推测这种组织表达差异可能与植物体内 ACC 的运输有关, ACC 主要由木质部介导运输, 但也可通过韧皮部运输^[39], 增加的 ACC 在花柱中可转化为乙烯, 进入对乙烯有高度反应的子房, 诱导其产生乙烯, 最终导致花瓣产生的乙烯含量增加^[40]。Yokotani 等^[41]对番茄 (*Solanum lycopersicum*) 不同组织中 ACS 的表达情况进行了研究, 发现番茄中 *LeACS1A* 和 *LeACS6* 在未成熟的果实和营养组织中表达, 以产生基本水平的乙烯, *LeACS4* 则在果实成熟和花衰老过程中被诱导表达, 进而加速果实成熟和花衰老。值得一提的是, 无论在不同组织中或是在切花开放至衰老过程中, ACO 基因表达水平均高于 ACS, 推测 ACS 基因可能作为

开关调控着乙烯的生产, *ACS* 和 *ACO* 可能共同促进切花开放, 盛开期 *ACO* 的持续表达可能增加了内源乙烯的积累, 积累的内源乙烯诱导了 *ACS* 表达, 最终推动切花衰老进程。

4 结 论

以芍药‘桃花飞雪’为材料, 筛选芍药切花开放至衰老过程中和盛开期不同组织中稳定表达的最适内参基因, 利用筛选出的双内参基因, 对乙烯生物合成关键基因 *ACS* 和 *ACO* 在芍药切花开放至衰老不同时期及盛开期不同组织中的表达水平进行定量分析。研究得到以下主要结论。

(1) 芍药切花开放至衰老不同时期最优内参基因为 *RAN3* 和 *GAPDH*, 芍药切花盛开期不同组织最优内参基因为 *UBQ* 和 *ARF*。

(2) 在芍药切花开放至衰老过程中, 乙烯生物合成关键基因 *ACS* 基因表达量显著低于 *ACO* 基因表达量, 是调控乙烯合成的开关; *ACO* 主要在切花开放前期发挥作用, *ACS* 在开放(绽口期)和衰老(衰败期)过程中均发挥重要作用, 并在盛开期对乙烯合成起到限制作用。

(3) 在芍药切花盛开期不同组织中, *ACS* 基因表达量显著低于 *ACO*, 存在组织差异性, 且均在茎和花萼中高表达。

综上, *ACS* 和 *ACO* 在芍药切花开放至衰老不同时期和盛开期不同组织中发挥着重要的作用, 研究结果对进一步探究芍药切花中乙烯生物合成的调控机制, 延长芍药切花瓶插寿命具有重要意义。然而, 关于芍药中乙烯介导的开放—衰老的具体内在调控机制仍需深入探讨, 未来可通过在芍药本体中对 *ACS* 和 *ACO* 基因进行遗传转化, 进一步揭示其在芍药开放至衰老过程中的具体调控机制。

参 考 文 献

- [1] 李嘉珏. 中国牡丹与芍药[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
Li J J. Chinese tree peony and herbaceous peony[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1999.
- [2] 于晓南. 观赏芍药[M]. 北京: 中国林业出版社, 2019.
Yu X N. Ornamental herbaceous peony[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2019.
- [3] 王哲, 史国安, 马雪情, 等. 芍药‘桃花飞雪’开花衰老期间乙烯代谢生理机制的研究[J]. 园艺学报, 2014, 41(11): 2268–2274.
Wang Z, Shi G A, Ma X Q, et al. The ethylene metabolism in flowers of Chinese peony ‘Taohuafeixue’ during opening and senescence[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(11): 2268–2274.
- [4] Lu J Y, Zhang G F, Ma C, et al. The F-box protein RhSAF destabilizes the gibberellic acid receptor RhGID1 to mediate ethylene-induced petal senescence in rose[J]. Plant Cell, 2024, 36(5): 1736–1754.
- [5] Wang T, Sun Z, Wang S Q, et al. *DcWRKY33* promotes petal senescence in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by activating genes involved in the biosynthesis of ethylene, abscisic acid and accumulation of reactive oxygen species[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2023, 113(4): 698–715.
- [6] Wang M, Wang M, Ni C, et al. Differences in ethylene sensitivity, expression of ethylene biosynthetic genes and vase life among carnation varieties[J]. Ornamental Plant Research, 2024, 4: e004.
- [7] Khan S, Alvi A F, Saify S, et al. The ethylene biosynthetic enzymes, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase (ACS) and ACC oxidase (ACO): the less explored players in abiotic stress tolerance[J]. Biomolecules, 2024, 14(1): 90.
- [8] 李芳. 芍药花乙烯代谢及信号转导主要基因的克隆与分析[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2013.
Li F. Cloning and analysis of genes encoding ethylene biosynthesis and signal transduction elements from herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.)[D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2013.
- [9] 肖士奎, 李芳, 张文婷, 等. 芍药 *ACS* 基因的克隆及其蛋白质原核表达[J]. 华北农学报, 2022, 37(5): 36–44.
Xiao S K, Li F, Zhang W T, et al. Cloning and prokaryotic expression of *ACS* gene from *Paeonia lactiflora* Pall. [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2022, 37(5): 36–44.
- [10] Ashraf J, Zuo D, Wang Q, et al. Recent insights into cotton functional genomics: progress and future perspectives[J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(3): 699–713.
- [11] Wagner E M. Monitoring gene expression: quantitative real-time RT-PCR[J]. Methods in Molecular Biology, 2013, 1027: 19–45.
- [12] Huggett J, Dheda K, Bustin S, et al. Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations[J]. Genes and Immunity, 2005, 6(4): 279–284.
- [13] Peng S J, Ali S I, Hu X L, et al. Advancements in reference gene selection for fruit trees: a comprehensive review[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(2): 1142.
- [14] 李健. 芍药实时定量 PCR 内参基因的筛选和验证[J]. 分子植物育种, 2017, 15(7): 2544–2549.
Li J. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR in herbaceous peony[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(7): 2544–2549.
- [15] 梁蕤, 徐雷锋, 毕蒙蒙, 等. 柠檬色百合实时荧光定量 PCR 内参基因筛选[J]. 中国农业大学学报, 2023, 28(2): 59–73.
Liang R, Xu L F, Bi M M, et al. Validation of reference genes for quantitative real time-PCR in *Lilium leichthlinii*[J]. Journal of China Agricultural University, 2023, 28(2): 59–73.
- [16] 周琳, 张永春, 蔡友铭, 等. 彩色马蹄莲不同品种和组织 qRT-PCR 内参基因筛选[J]. 分子植物育种, 2020, 18(12): 3971–3979.
Zhou L, Zhang Y C, Cai Y M, et al. Screening of qRT-PCR reference genes in different varieties and tissues of *Zantedeschia hybrida*[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(12): 3971–3979.
- [17] 李雪, 潘学军, 张文娥, 等. 核桃内参基因实时荧光定量 PCR 表达稳定性评价[J]. 植物生理学报, 2017, 53(9): 1795–1802.
Li X, Pan X J, Zhang W E, et al. Stability evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in walnut (*Juglans* spp.)[J]. Plant Physiology Journal, 2017, 53(9): 1795–1802.
- [18] 王荣花, 刘雅莉, 李嘉瑞. 不同发育阶段牡丹和芍药切花开花生理特性的研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(5): 861.

- Wang R H, Liu Y L, Li J R. Studies on the blossom physiology in the different development stage of peony and Chinese peony flower[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32(5): 861.
- [19] Gasic K, Hernandez A, Korban S S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22(4): 437–438.
- [20] 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.
- Zhang Y F, Zhao L J, Zeng Y L. Selection and application of reference genes for gene expression studies[J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50(8): 1119–1125.
- [21] 王彦杰, 董丽, 张超, 等. 牡丹实时定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(5): 521–528.
- Wang Y J, Dong L, Zhang C, et al. Reference gene selection for real-time quantitative PCR normalization in tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(5): 521–528.
- [22] Untergasser A, Ruijter J M, Benes V, et al. Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (RT)-qPCR amplification and melting data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2021, 22(1): 398.
- [23] Ramakers C, Ruijter J M, Deprez R H L, et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data[J]. *Neuroscience Letters*, 2003, 339(1): 62–66.
- [24] 王雨, 裴行杰, 傅钊钧, 等. 基于全基因组鉴定华石斛优良内参基因[J]. *热带作物学报*, 2023, 44(7): 1365–1372.
- Wang Y, Pei X J, Fu Y J, et al. Genome-wide identification of superior reference genes in *Dendrobium sinense*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2023, 44(7): 1365–1372.
- [25] 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): 341.
- [26] Andersen C L, Ledet-Jensen J, Ørntoft T F. Normalization of real-time quantitative RT-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.
- [27] Pfaffl M W, Tichopád A, Prgomet C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pairwise correlations[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(6): 509–515.
- [28] Xie F, Wang J, Zhang B. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2023, 239(2): 125.
- [29] Shabanian S, Esfahani N M, Karamian R, et al. Physiological and biochemical modifications by postharvest treatment with sodium nitroprusside extend vase life of cut flowers of two gerbera cultivars[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 137: 1–8.
- [30] 李文阳, 马梦迪, 郭红卫. 植物激素乙烯作用机制的最新进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43(10): 854–863.
- Li W Y, Ma M D, Guo H W. Advances in the action of plant hormone ethylene[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2013, 43(10): 854–863.
- [31] Stéphanie G, Mélanie M, Jérôme P, et al. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(2): 487–493.
- [32] Zhang L, He L L, Fu Q T, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in the biofuel plant *Jatropha curcas* using real-time quantitative PCR[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(12): 24338–24354.
- [33] Luciana D, Barry C, Julia W, et al. *FORMOSA* controls cell division and expansion during floral development in *Antirrhinum majus*[J]. *Planta*, 2009, 229(6): 1219–1229.
- [34] Li C Q, Hu L Z, Wang X Q, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression analysis in seeds at different developmental stages and across various tissues in *Paeonia ostii*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2019, 46(6): 6003–6011.
- [35] Li M, Xing Q, Li H G, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in cucumber (*Cucumis sativus* L.), pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) and cucumber-pumpkin grafted plants[J]. *Peer Journal*, 2019, 7: e6536.
- [36] 尚申申, 樊琳婷, 周爽, 等. 伊藤牡丹‘巴茨拉’内参基因筛选及花瓣衰老相关基因的表达分析[J]. *植物生理学报*, 2023, 59(1): 153–164.
- Shang S S, Fan L T, Zhou S, et al. Screening of reference genes and expression analysis of petal senescence associated genes in Itoh peony ‘Bartzella’ cut flowers[J]. *Plant Physiology Journal*, 2023, 59(1): 153–164.
- [37] Depaepe T, van der Straeten D. Tools of the ethylene trade: a chemical kit to influence ethylene responses in plants and its use in agriculture[J]. *Small Methods*, 2020, 4: 1900267.
- [38] Yan X Y, Zhao J H, Deng M H, et al. Two key enzyme genes associated with ethylene bio-synthesis, *LbACS* and *LbACO*, are involved in the regulation of lily flower senescence[J]. *Scientia Horticulturae*, 2024, 330: 113045.
- [39] Pattyn J, John V H, van de Poel B. The regulation of ethylene biosynthesis: a complex multilevel control circuitry[J]. *New Phytologist*, 2021, 229: 770–782.
- [40] Ryo N, Niki T, Ichimura K. Differential regulation of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (*ACO*) genes, including the additionally cloned *DcACO2*, during senescence in carnation flowers[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2022, 183: 111752.
- [41] Yokotani N, Nakano R, Imanishi S, et al. Ripening-associated ethylene biosynthesis in tomato fruit is autocatalytically and developmentally regulated[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(12): 3433–3442.

(责任编辑 赵田芸 吴娟
责任编辑 林金星)