

核桃不定根发生阶段内参基因筛选与关键基因表达分析

宋晓波¹, 常英英¹, 刘 昊^{1,2}, 徐慧敏³, 裴 东^{1,*}

(¹林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; ²天津市林业果树研究所, 天津 300112; ³河南省洛宁县林业局, 河南洛阳 471700)

摘 要: 通过荧光定量 PCR 技术和 geNorm、NormFinder 软件对 8 个候选内参基因 (*18S*、*ACT*、*ACT2*、*TUB*、*H2B*、*UBI*、*EF-2α* 和 *UBQ*) 在核桃 (*Juglans regia*) 不定根发生过程中的表达稳定性进行评估。利用筛选出的最佳内参基因 *ACT2* 进行校正, 对核桃不定根发生过程中的 12 个重要功能基因 (*YUC4*、*PIN6*、*AUX/IAA8*、*SAUR24*、*WOX11*、*WOX5*、*LBD16*、*WRKY14*、*SHR*、*SCL*、*CYCA* 和 *CYCD*) 的表达水平进行定量分析。结果显示, *YUC4* 在扦插过程中持续显著下调表达, 其余 11 个基因均在不同时期显著上调表达。结合基因功能推测: *PIN6* 等基因介导的生长素极性运输对于不定根发生初期所需的高浓度 IAA 富集具有重要作用; *SHR*、*WOX11*、*LBD16*、*WRKY14* 和 *SCL* 主要参与形成层细胞向根原基原始细胞的转化过程, *SAUR24*、*WOX5*、*CYCA* 和 *CYCD* 主要参与根原基原始细胞向根原基细胞转变的调控; 同时, 细胞周期蛋白相关基因 (*CYCA*、*CYCD*) 可以作为插穗中根原基原始细胞向根原基细胞转变的标志基因。

关键词: 核桃; 不定根; 内参基因筛选; 表达分析

中图分类号: S 664.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 10-1907-12

Reference Gene Selection and Genes Expression Analysis During Adventitious Root Formation in Walnut

SONG Xiaobo¹, CHANG Yingying¹, LIU Hao^{1,2}, XU Huimin³, and PEI Dong^{1,*}

(¹State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of State Forestry Administration, Research Institute of Forestry Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; ²Tianjin Research Institute of Forestry and Pomology, Tianjin 300112, China; ³Forestry Bureau of Luoning County, Luoyang, Henan 471700, China)

Abstract: The expression stability of eight candidate internal reference genes (*18S*, *ACT*, *ACT2*, *TUB*, *H2B*, *UBI*, *EF-2α* and *UBQ*) during adventitious root development was evaluated by real-time PCR and geNorm and NormFinder software. Using the best selected internal reference genes for calibration, 12 important functional genes (*YUC4*, *PIN6*, *AUX/IAA8*, *SAUR24*, *WOX11*, *WOX5*, *LBD16*, *WRKY14*, *SHR*, *SCL*, *CYCA* and *CYCD*) were found, and the level of expression was quantified during the adventitious root formation of walnut. The results of stability analysis of internal reference gene expression showed that *ACT2* gene could be used as the best reference gene in qRT-PCR study of walnut adventitious

收稿日期: 2019-06-07; 修回日期: 2019-07-22

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (CAFYBB2017ZA004-2); 国家自然科学基金项目 (31672126)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: pei.dong@caf.ac.cn)

root formation. *ACT2* was used as reference to quantitatively analyze the expression levels of 12 genes in adventitious root formation. The results showed: the *YUC* gene was down-regulated significantly during the cutting process, and the other 11 genes were significantly up-regulated during different periods of adventitious root development. It is speculated that *PIN6* and other gene-mediated auxin polar transport plays an important role in the high concentration of IAA enrichment required in the early stage of adventitious root formation. The *SHR*, *WOX11*, *LBD16*, *WRKY14* and *SCL* genes are mainly involved in the transformation of the stratified cells into the root primordial cells. The *SAUR24*, *WOX5*, *CYCA* and *CYCD* genes are mainly involved in the regulation of root primordial cells to root primordial cells. At the same time, cyclin-related genes (*CYCA*, *CYCD*) can serve as marker genes for the transformation of root primordial cells into root primordial cells.

Keywords: walnut; adventitious root; reference gene selection; expression analysis

扦插繁殖具有保持母株性状、繁殖系数高、繁殖周期较短等优点，是多年生木本植物无性繁殖的重要手段（刘昊 等，2017）。扦插繁殖的核心是不定根的发生。然而，核桃等众多木本植物，不定根发生极为困难，严重制约了这些树种的无性系化进程（Liu et al., 2018）。深入探索不定根发生的调控机制，不仅能够为多年生木本植物器官建成的理论研究提供基础；同时在推动木本植物无性系化进程方面具有重要的实践价值。

木本植物的不定根发生涉及一系列复杂的生物学过程，受到多种内源激素和环境因素的调控（Kevers et al., 1997）。其中，生长素是最关键的内源激素，可以作为细胞分裂起始的刺激因子，诱导特定类型细胞由静止状态开始分裂和分化（Guilfoyle & Hagen, 2007）。目前已经鉴定出一系列直接或间接参与生长素合成、转运和信号转导的基因和转录因子，如参与生长素合成的 *YUC*（*YUCCA*）基因（Chen et al., 2016），参与生长素极性运输的 *PIN*（*PIN-FORMED*）基因（Lavedrine et al., 2015）以及参与生长素信号早期响应的 *GH3*（*Gretchen Hagen 3*）、*SAURs*（*Small Auxin-up RNAs*）和 *AUX/IAA*（*Auxin/Indoleacetic acid*）基因家族（Sato & Yamamoto, 2008; Hou et al., 2012）等，这些基因在不定根发生过程中发挥重要作用，通过干扰它们的表达可明显改变不定根和侧根的表现型。此外，一些转录因子家族，如 *WOX*（*WUSCHEL-related homeobox*）转录因子家族、*GRAS* 转录因子家族和 *LBD*（*Lateral Organ Boundaries Domain*）转录因子家族等对不定根的发生也至关重要。其中 *WOX* 家族是一类植物特有的转录因子家族，参与茎尖分生组织的维持、胚性组织的起始和维持以及器官的发生等过程（Zhang et al., 2015）。*GRAS* 转录因子家族在维持分生组织活性、调节根的发育及激素信号转导方面具有一定作用（Battaglia et al., 2014）。*LBD* 转录因子家族主要参与植物侧生器官原基的启动，能够在 *WOX* 转录因子的激活下，参与调控原形成层细胞向根原基原始细胞的转化（Liu et al., 2005, 2014a; Hu et al., 2016）。根原基原始细胞形成后，不定根的形态建成还依赖于细胞分裂的启动，细胞周期蛋白（*Cyclins*）在这一过程中发挥重要作用（Zhu et al., 2016b; da Costa et al., 2018）。

qRT-PCR 技术具有定量准确、灵敏度高、重复性好等优点，已被广泛应用于目的基因表达水平的分析（Artico et al., 2010）。但由于起始 RNA 质量和数量、反转录效率、PCR 扩增效率以及细胞和组织之间的差异，会导致基因表达分析结果的偏差。因此在研究过程中，通常会选择表达相对稳定的基因作为内参对照，对目的基因的表达量进行校正。本研究中以具有不定根发生能力的核桃嫩枝为材料，利用 qRT-PCR 技术对 8 个候选内参基因的表达水平进行分析，通过 *geNorm* 和 *NormFinder*

软件对候选内参基因的表达稳定性进行评价,筛选出在核桃不定根发生过程中稳定表达的内参基因。然后利用该内参基因,对 12 个目的基因在核桃不定根发生过程中的表达水平进行分析。旨在筛选与核桃不定根发生过程显著相关的功能基因或转录因子,为核桃不定根发生分子机理的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为 23 年生核桃品种‘中宁盛’,定植于河南省洛宁县马店镇胡家原村(E 111.55°, N 34.41°)。2016 年 3 月—2017 年 6 月,参照裴东等(2005)的方法,通过连续嫁接和埋干黄化等技术对成龄‘中宁盛’嫩枝进行复幼处理。复幼嫩枝经 $5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ IBA 溶液处理后,在温室中进行扦插培养,控制温室中光强为全日照的 17.1%~38.0%,相对湿度 85%~90%,扦插基质温度 15~28 °C。2017 年 6 月,根据刘昊等(2017)的结果,在不定根发生过程关键时期(扦插后 0、24、48、72 和 120 h)进行样品采集。用干净刀片削取插穗基部 1 cm 左右的形成层及周缘组织,每重复取 3 株插穗,3 次生物学重复,液氮处理后置于 -80 °C 冰箱备用。

1.2 总 RNA 提取、质量检测 and cDNA 合成

分别取不同时期试验样品各 0.1g,迅速置于液氮中,研成粉末,参照通用植物总 RNA 提取试剂盒(百泰克)说明书提取总 RNA,经 2%琼脂糖凝胶电泳检测完整性,Nanodrop ND2000 紫外分光光度计(Thermo)测定 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 比值,分析纯度。分别取每个样品 1 μg 总 RNA 为模板,反转录合成 cDNA 第一链, -20 °C 保存备用。

1.3 候选内参基因和不定根发生相关基因的选择及引物设计

根据桃(Tong et al., 2009)、大豆(Hu et al., 2009)、龙眼(Lin & Lai, 2010)、黄瓜(Wan et al., 2010)和杨树(Xu et al., 2011)等物种内参基因的研究结果,选择 8 个常用的候选内参基因(表 1): 18S 核糖体 RNA *18S* (*18S rRNA*)、肌动蛋白基因 *ACT* (*Actin*)、肌动蛋白基因 2 *ACT2* (*Actin2*)、微管蛋白基因 *TUB* (*Tubulin*)、组蛋白基因 *H2B* (*Histone*)、多聚泛素蛋白基因 *UB1* (*Polyubiquitin*)、蛋白翻译延伸因子基因 *EF-2 α* (*Elongation factor 2-alpha*) 和泛素蛋白基因 *UBQ* (*Ubiquitin*),根据拟南芥(Xu et al., 2005; Chen et al., 2016)和杨树(Rigal et al., 2012; Legu  et al., 2014; Liu et al., 2014a; Xuan et al., 2014)等模式物种的相关研究,选择 12 个不定根发生相关基因(表 2),通过与课题组前期插穗转录组数据进行 blast 分析,获得目的基因序列。引物设计使用 Primer Premier 3.0 在线工具,参数设定:退火温度(Annealing temperature, T_m) 60 °C,引物长度 22~23 bp,扩增产物长度 100~250 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物列表见表 2。

1.4 候选内参基因的普通 PCR 扩增和 qRT-PCR 分析

候选基因的普通 PCR 以‘中宁盛’插穗 cDNA 为模板,反应体系: $2\times$ Taq PCR MasterMix 10 μL , cDNA 2.0 μL , 正向引物和反向引物(浓度 $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1.0 μL 、ddH₂O 补充至 20.0 μL 。反应程序为: 95 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应完成后 2%琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物检测。

表 1 qRT-PCR 引物信息
Table 1 Primers used for qRT-PCR

内参基因 Reference gene	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	产物长度/bp Product length	退火温度/℃ T _m
<i>18S</i>	F: AGAGGCCTACAATGGTGGTG R: CCAATGGATCCTCGTTA	102	60
<i>ACT</i>	F: TTCTGGTGATGGTGTGAGTC R: GGCAGTGGTGGTGAACATG	149	60
<i>ACT2</i>	F: TCCACCATGTTCCCTGGTAT R: ACCTCCCAATCCAGACACTG	122	60
<i>TUB</i>	F: TGACATTGAGCGCCCAACTTACA R: ATCCACATTCAGAGCACCATCGA	103	60
<i>H2B</i>	F: GAAGAAGCGGGTGAAGAAGA R: GGCGAGTTTCTCGAAGATGT	145	60
<i>UBI</i>	F: AGAAGGAATCGACCCTCCAC R: CCTTGACGTTGTCAATGGTG	126	60
<i>EF-2α</i>	F: GCGTTCCCTCAGTGTGTCTT R: GGTCATCTGCTCCTTCAAGC	104	60
<i>UBQ</i>	F: ATGCAGATTTTGTGAAGAC R: ACCACCACGGAGACGGAGG	196	60

表 2 不定根发生相关基因及其 qRT-PCR 引物信息
Table 2 Detail information of adventitious rooting related genes and their primers for qRT-PCR

基因 Gene	基因名称 Gene name	功能 Function	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
<i>YUC4</i>	FMO 酶编码基因 4 Flavin monooxygenases gene	生长素生物合成 Auxin biosynthesis	F: CCCAAGTACCCAACAAAGGA R: ATGAACCACCGGAAATGTA
<i>PIN6</i>	PINFORMED 蛋白基因 PINFORMED proteins	生长素极性运输 Polar auxin transport	F: AGGTCGTGGTCCTTGTTTIG R: CACCATGAGGCTCTGAGTGA
<i>SAUR24</i>	生长素早期应答基因 <i>SAUR24</i> Early auxin response gene <i>SAUR24</i>	生长素信号转导 Auxin signal transduction	F: CAATGCCTAGGCCAGAGAAG R: CCTAAAACCCCAACAAGCA
<i>AUX/IAA8</i>	生长素早期应答基因 <i>AUX/IAA8</i> Early auxin response gene <i>AUX/IAA8</i>	生长素信号转导 Auxin signal transduction	F: AGAACATTCAAGCAACTGACT R: ATATCCATCAGACGCTGAG
<i>WOX11</i>	WUSCHEL-related homeobox 转录因子 11 基 因 WUSCHEL-related homeobox transcription factor 11 gene	干细胞维持和器官建成 Stem cell maintenance and organogenesis	F: GACCCTCCAACCTTTCCCAIT R: AGTGCTCCATTCTGTCCCAA
<i>WOX5</i>	WUSCHEL-related homeobox 转录因子 5 基 因 WUSCHEL-related homeobox transcription factor 5 gene	干细胞维持和器官建成 Stem cell maintenance and organogenesis	F: CAGATTGCATCTTTGCTCCA R: AACGGGGTCTCTCATACGTG
<i>LBD16</i>	LBD 转录因子基因 LBD transcription factor gene	侧生器官原基启动和器官发生 Lateral organ primordial activation and organogenesis	F: CAGATTGCATCTTTGCTCCA R: AACGGGGTCTCTCATACGTG
<i>WRKY14</i>	WRKY 转录因子基因 WRKY transcription factor gene	激素信号转导等 Hormone signal transduction, etc.	F: ACATATCCGCTGACAGATTC R: TCTGCAATGTCTTTACCCG
<i>SHR</i>	SHORT-ROOT 转录因子基因 SHORT-ROOT transcription factor gene	根形态建成 Root morphogenesis	F: AACTTCGAGCTGAATCGAA R: AATGAGCTTGCGTCTCCCTA
<i>SCL</i>	SCARECROW-LIKE 转录因子基因 SCARECROW-LIKE transcription factor gene	顶端分生组织维持 Apical meristem maintenance	F: TGCCATTCAATCTTGTTCCTA R: GGGGAGAAACCAGATGACAA
<i>CYCA</i>	细胞周期蛋白基因 Cyclin gene	细胞周期调控 Cell cycle regulation	F: GGAGCCAACCATCCACTTA R: CATCAGTGGGAGCATGATTG
<i>CYCD</i>	细胞周期蛋白基因 Cyclin gene	细胞周期调控 Cell cycle regulation	F: AGCTGCCAAGATGAAGGAAA R: GCCTCAATGGTGGGTCTCTA

qRT-PCR 扩增在 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche) 上进行。cDNA 稀释 20 倍作为模板, 反应体系 (20 μL): SYBR Premix Ex *Taq*TM (TaKaRa) 10 μL, cDNA 2 μL, 上、下游引物 (10 μmol · L⁻¹) 各 0.8 μL, ddH₂O 6.4 μL, 每个样品 3 次技术重复。反应程序为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环, 设置在 60 °C 结束阶段检测荧光强度收集信号。循环结束后利用熔解曲线检测产物特异性, 从 60 °C 缓慢升温至 97 °C, 每个温度采集 5 次荧光信号。

1.5 数据分析及内参基因稳定性评价

内参基因稳定性评价: qRT-PCR 扩增完成后, 参照魏洁书和杨锦芬 (2013) 的方法, 根据基因表达丰度的 Ct 值, 计算 8 个内参基因的表达量。参照 geNorm 和 NormFinder (吴建阳 等, 2017) 软件使用说明, 分析各内参基因在不定根发生过程中的表达稳定性。其中, geNorm 软件根据计算出的每个候选基因的表达稳定度 M 值 (average expression stability values) 进行排序, M 值越大, 表达越不稳定, 反之则越稳定。同时, 通过对内参基因标准化因子的配对差异分析 ($V_n/(n+1)$), 判定所需最佳内参基因的数量, 当 $V_n/(n+1) < 0.15$ 时, 表示 n 个基因可以作为 qRT-PCR 分析的内参基因, 当 $V_n/(n+1) > 0.15$ 时, 说明应选择 n + 1 个基因的组合作为 qRT-PCR 分析的最佳内参基因组合 (Vandesompele et al., 2002)。Normfinder 软件采用方差估计算法, 先获的内参基因表达稳定值 (M 值), 再根据稳定值得大小来筛选最佳内参基因, M 值最小的基因为最适合的内参基因 (Andersen et al., 2004)。综合两个软件分析结果, 最终确定适用于核桃不定根发生过程 qRT-PCR 研究的最佳内参基因。

以筛选出的最佳内参基因为参照, 对所选目的基因在核桃不定根发生过程中的表达水平进行定量分析, 同时验证内参基因的有效性。目的基因相对表达量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, 每个样品 3 次技术重复。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 质量检测及引物特异性分析

琼脂糖凝胶电泳结果 (图 1, A) 显示: 5 个时期样品总 RNA 均有 28S 和 18S 两条清晰完整的条带, 且条带无拖尾现象, 说明总 RNA 无降解或降解较少, 完整性良好; 紫外分光光度计检测结果 (表 3) 显示, A_{260}/A_{280} 值在 1.85 ~ 1.96 之间, A_{260}/A_{230} 均大于 2.0, 说明提取的 RNA 纯度较高, 无蛋白质和无机盐污染, 可以满足后续试验的需求。

表 3 总 RNA 分光光度计检测结果

Table 3 Spectrophotometer test results of total RNA

取样时间/h Sampling time	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
0	1.91	2.08
24	1.96	2.12
48	1.88	2.11
72	1.85	2.05
120	1.93	2.09

以 ‘中宁盛’ 核桃插穗 cDNA 为模板对 8 个候选内参基因进行普通 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果 (图 1, B) 显示: 各个内参基因均可见预期大小的目的条带, 且条带单一, 无非特异扩增, 说明所筛选的引物特异性良好。

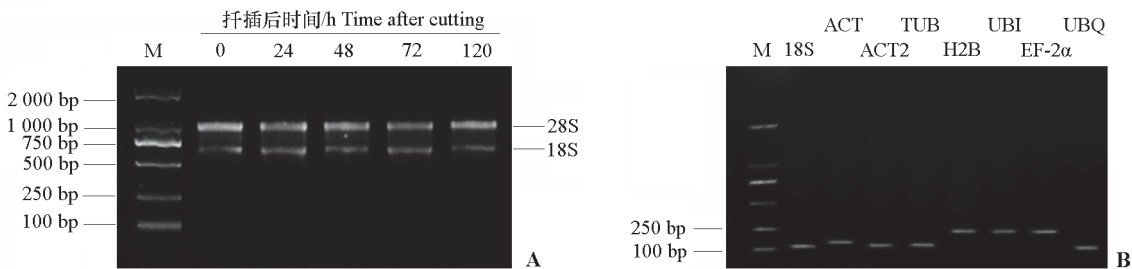


图 1 总 RNA (A) 和内参基因 (B) 普通 PCR 电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis result of total RNA (A) and candidate reference genes (B)

分别以核桃不定根发生过程各个时期样本 cDNA 为模板进行 qRT-PCR, 结果 (图 2) 显示, 8 个候选内参基因的溶解曲线均为明显的单一信号峰, 在达到退火温度之前没有出现明显的杂峰, 说明各对引物扩增特异性较好, 扩增过程中没有引物二聚体和非特异扩增情况, 可用于后续的 qRT-PCR 分析。

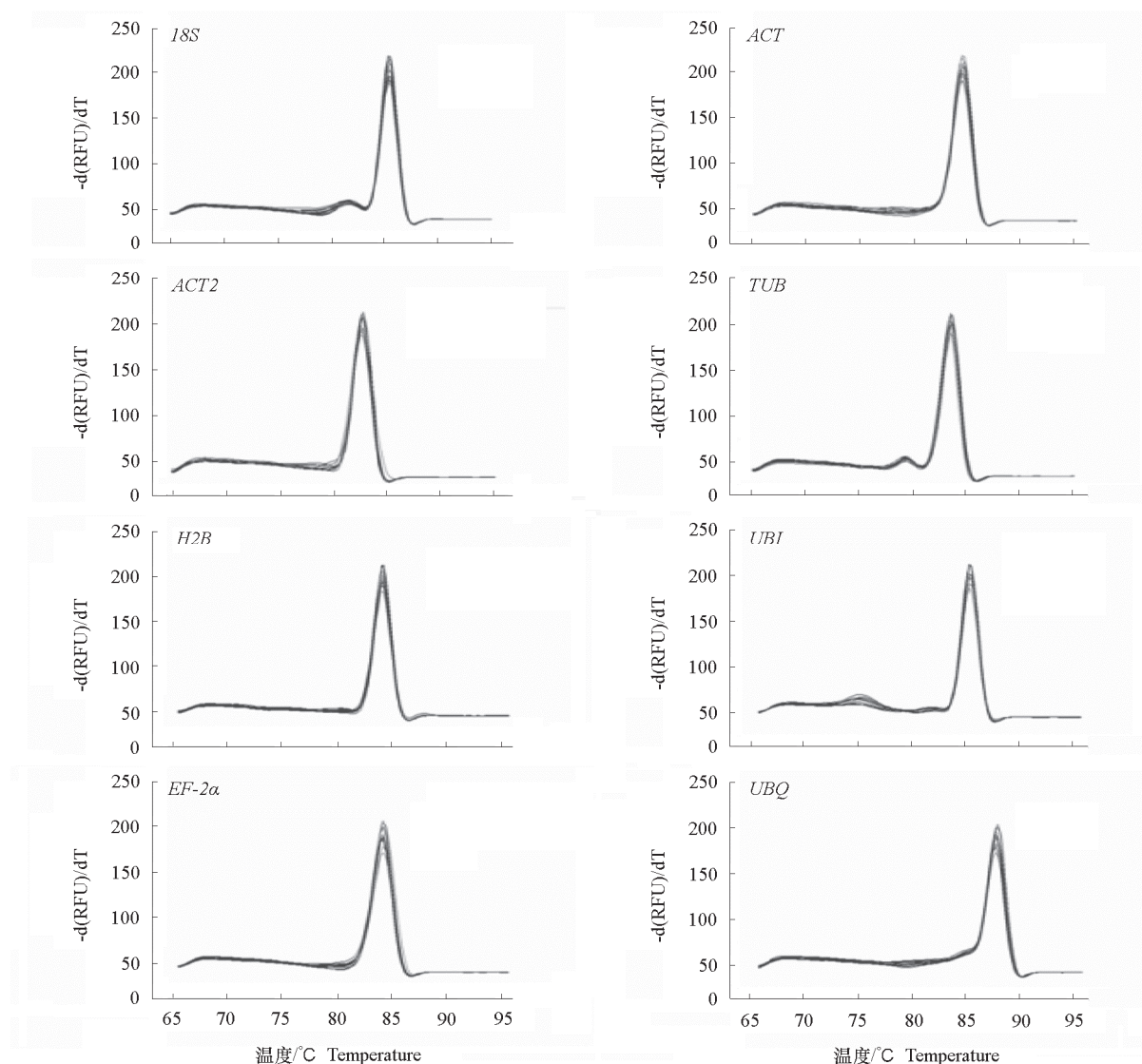


图 2 内参基因溶解曲线

Fig. 2 Melting curve of reference gene

2.2 候选内参基因在不定根发生过程中表达稳定性分析

Ct 值分析结果 (图 3, A) 显示, 不定根发生过程中, *18S*、*ACT*、*ACT2*、*TUB*、*H2B*、*UBI*、*EF-2α* 和 *UBQ* 的 Ct 值分别集中在 8.14 ~ 11.20、18.38 ~ 20.68、20.92 ~ 22.89、35.96 ~ 39.95、30.69 ~ 31.72、30.47 ~ 31.47、30.98 ~ 33.56 和 24.14 ~ 25.92。*H2B* 和 *UBQ* 表达丰度较高, 且表达水平变异小, 其次为 *ACT* 和 *ACT2*。*18S* 的表达丰度最高 (Ct 值最小), 但变异较大。从 Ct 值推测 *H2B*、*UBQ*、*ACT* 和 *ACT2* 可作为候选内参基因。

经 geNorm 软件分析, 8 个候选内参基因的表达稳定性 M 值依次为 $UBI > TUB > H2B > 18S > EF-2\alpha > UBQ > ACT = ACT2$ (图 3, B), 由此可见, 本研究中 8 个内参基因中稳定性最好的是 *ACT* 和 *ACT2*。根据标准差数据分析结果, V2/3、V3/4、V4/5 和 V5/6 均小于 0.15 (图 3, C)。因此, 可选择 *ACT* 和 *ACT2* 两个内参基因的组合。Normfinder 软件分析结果显示: 8 个内参基因的稳定性为: $ACT2 > ACT > UBQ > H2B > EF-2\alpha > 18S > TUB > UBI$ (图 3, D)。综合上述结果, 选用 *ACT2* 作为核桃不定根发生过程中基因表达分析的最佳内参基因。

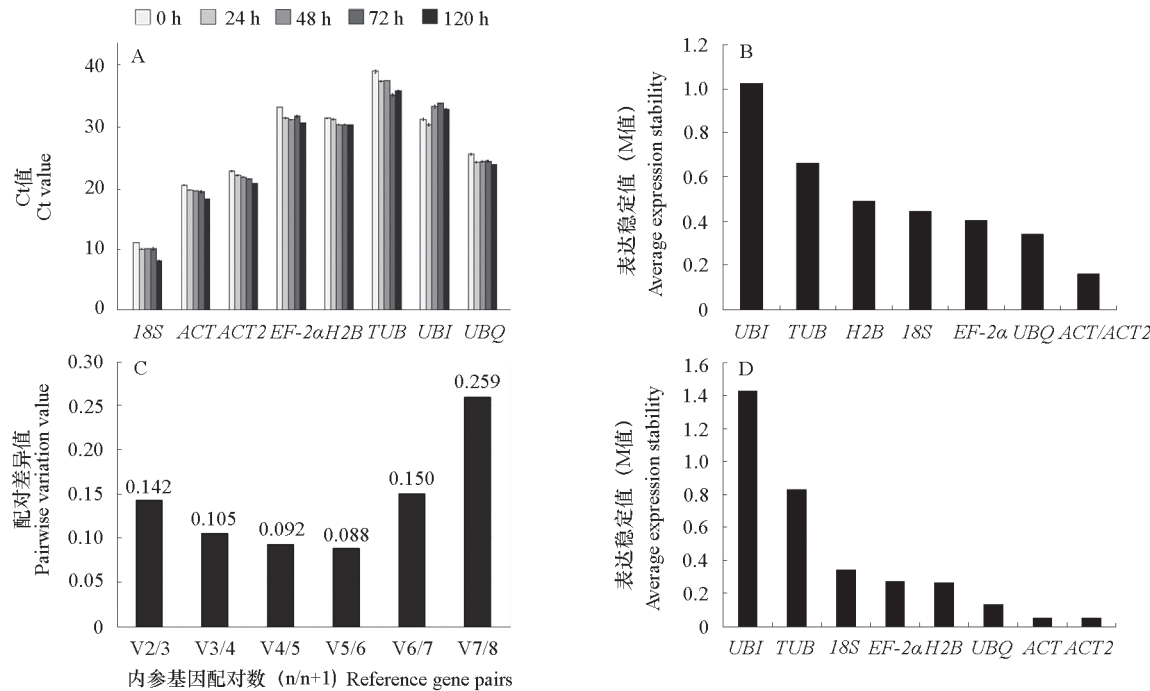


图 3 内参基因稳定性分析结果

A: 候选内参基因 Ct 值分布图; B: geNorm 软件分析结果; C: 标准化因子配对差异值; D: Normfinder 软件分析结果。

Fig. 3 Result of evaluation of the expression of reference genes

A: Distribution of Ct value of candidate reference gene; B: Analysis results of geNorm software; C: Pairwise variations of normalized factor; D: Analysis results of NormFinder software.

2.3 不定根发生过程中关键功能基因表达分析

以筛选出的 *ACT2* 基因为内参, 利用 qRT-PCR 技术分析 12 个目的基因在核桃不定根发生过程中的表达水平。

结果 (图 4) 显示, 与生长素相关的 4 个基因中 *YUC4* 在扦插发生过程中显著下调表达; *PIN6* 和 *SAUR24* 均呈迅速上调后显著下调的表达趋势; *PIN6* 在 48 h 表达水平达到最高, 是 24 h 时的 7.4 倍, *SAUR24* 在 72 h 的达到峰值, 是初始表达水平的 3.19 倍; *AUX/IAA8* 在 0 ~ 72 h 显著下调表达, 而后显著上调。

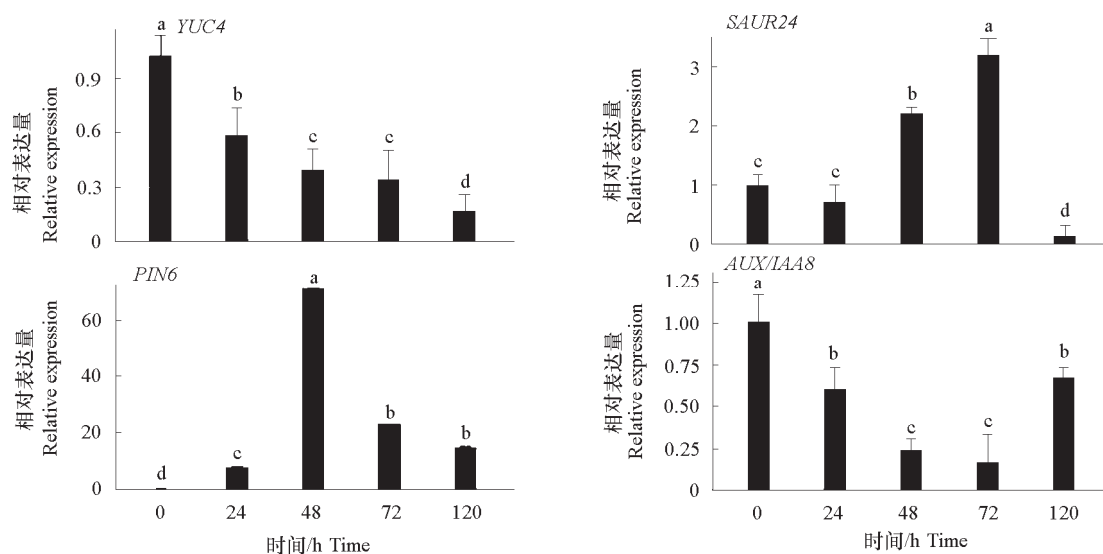


图4 生长素相关基因表达分析

Fig. 4 Gene expression analysis of auxin related ($P \leq 0.05$)

与不定根发生相关的转录因子基因中 *WOX11* 在扦插后 0~48 h 显著上调表达, 而后显著下调, 48 h 时的为初始值的 96.7 倍; *WOX5* 显著上调, 120 h 时是初始表达水平的 13.5 倍; *SHR* 在扦插后 24 h 显著下调表达, 而后逐渐上调至初始表达水平; *LBD16* 和 *WRKY14* 在不定根发生过程中具有相似的表达模式, 扦插后 24 h 显著上调至初始表达水平的 10 倍以上, 然后显著下调; *SCL* 在不定根发生过程中呈双峰的表达模式, 24 和 120 h 时较高 (图 5)。

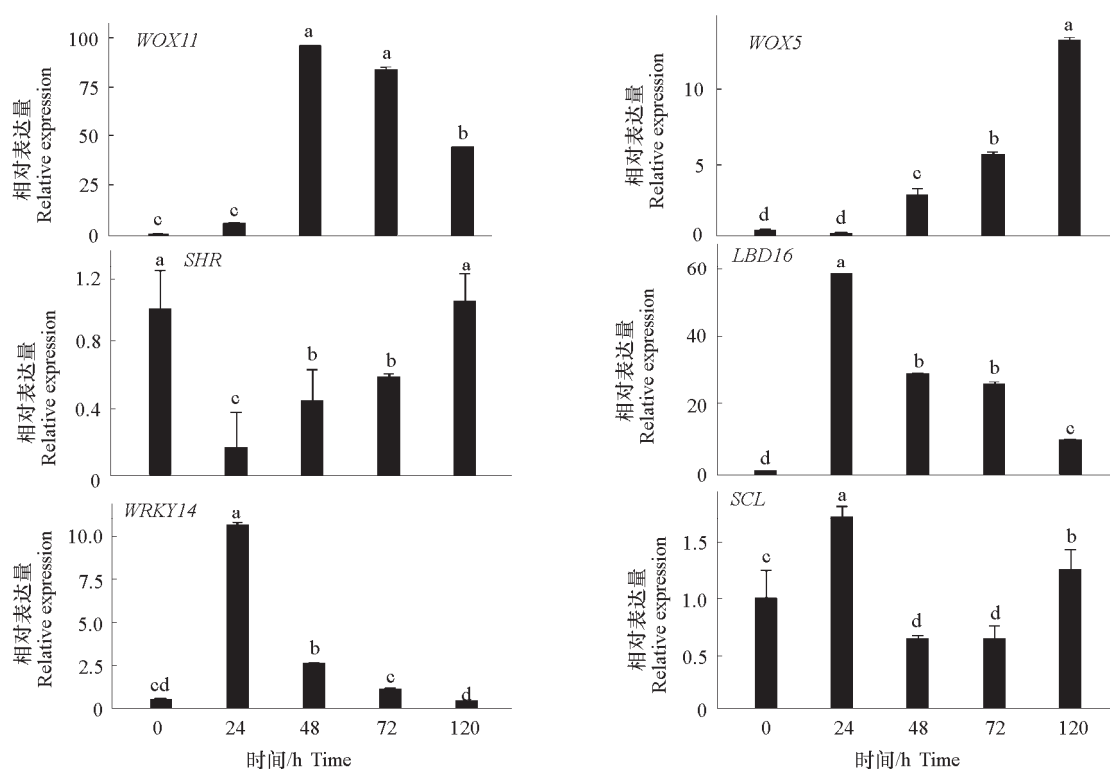


图5 不定根发生相关转录因子基因表达分析

Fig. 5 Expression analysis of related transcription factors in adventitious roots ($P \leq 0.05$)

细胞周期蛋白基因 *CYCA* 和 *CYCD* 在不定根发生过程中具有一致的表达趋势 (图 6), 扦插后 72 h 内表达水平较低且平稳, 120 h 时显著上调至初始表达水平的 3.2 倍以上。

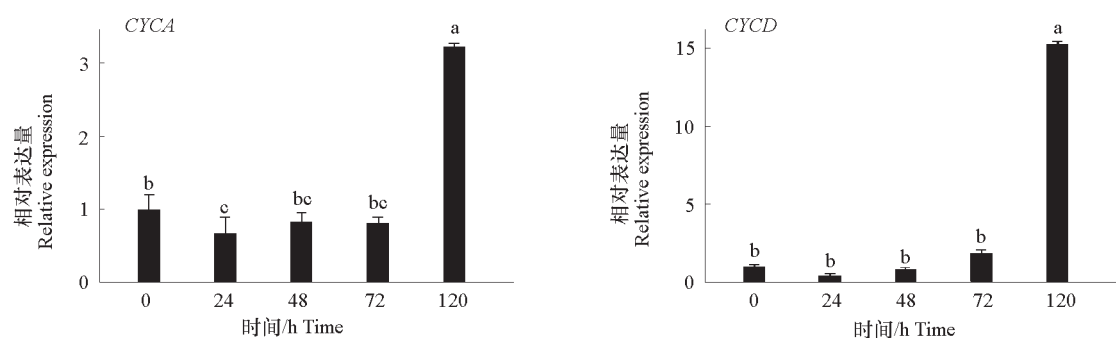


图 6 细胞周期蛋白基因表达分析
Fig. 6 Expression analysis of cyclin genes ($P \leq 0.05$)

3 讨论

作为理想的内参基因, 应在所有细胞和组织类型中以及不同的环境或试验条件下稳定表达, 同时还应与目的基因具有相近的表达水平 (Tong et al., 2009)。18S 和 *GAPDH* 等传统的管家基因通常被认为在不同物种、不同处理条件下均具有较高的稳定性 (Matoušková et al., 2014)。因此, 在核桃基因表达水平分析的研究中多直接采用 18S 作为内参基因 (何富强, 2011; 徐丽 等, 2014)。然而, 在后续的研究中发现 18S 基因虽然稳定性较好, 但由于表达丰度过高而不适合在目的基因表达丰度较低的情况下使用 (李雪 等, 2017)。本研究通过对 8 个候选内参基因表达水平和稳定性的分析发现, 18S 基因的表达量远高于其他基因, 但稳定性较差。ACT2 基因在同一过程中不仅表达稳定性较高, 同时与目的基因具有相近的表达水平, 因此选择 ACT2 作为核桃不定根发生过程基因表达水平分析的最佳内参基因。

不定根的从头建成是植物在离体等胁迫刺激下, 部分细胞命运发生转变, 形成新器官的过程, 内源生长素在这一过程中发挥着决定性的作用 (Steffens & Rasmussen, 2016)。因此, 生长素合成、极性运输和信号转导相关的一系列基因, 通常被定义为“不定根发生关键基因”。Chen 等 (2016) 研究发现, 离体拟南芥叶片中 *YUC* 基因介导合成的内源 IAA 通过极性运输到达创口部位, 进而激活 *WOX11* 等一系列基因的表达, 调控不定根的发生过程。通过添加生长素极性运输抑制剂 NPA (nap-hthylphthalamide), 抑制离体拟南芥叶片的不定根的发生 (Liu et al., 2014)。PIN 基因家族是植物特有的一类控制生长素输出的跨膜基因家族, 过表达 PIN 基因的水稻转基因株系中生长素由地上部向根茎结合部的运输增强, 不定根数显著多于野生型 (Chen et al., 2012)。本研究中, PIN6 基因在扦插后显著上调, 与刘昊等 (2017) 在核桃扦插研究过程中观察到的插穗基部内源 IAA 富集现象相吻合。而 *YUC4* 在插穗基部呈持续下调表达的模式, 可能是因为内源 IAA 主要在插穗茎尖和幼叶等组织中合成, 进一步通过 PIN6 等基因介导的生长素极性运输达到插穗基部切口处, 随后诱导生长素响应基因 SAUR 的上调表达, 所以插穗基部并不是 IAA 的主要合成部位而是主要作用部位。AUX/IAA8 基因的高表达领先于 PIN6 基因的上调表达和 120 h 的内源 IAA 高峰, 可能是对内源结合态 IAA 降解所产生的活性 IAA 的响应。

植物内源生长素被极性运输到伤口处具有再生潜能的细胞, 在生长素信号的诱导下转录因子基

因 *WOX11/12* 上调表达, 标志着再生潜能细胞向根原始细胞转化, 进一步通过激活下游 *WOX5* 和 *LBD16* 的上调, 实现根原始细胞向根原基细胞转变 (Liu et al., 2014; Hu & Xu, 2016)。本研究中发现 *WOX11* 和 *WOX5* 分别在扦插后 48 和 120 h 显著上调表达, 与前人研究结果一致。然而, *LBD16* 先于 *WOX11* 上调表达, 表达水平在扦插后的 24 h 达到峰值, 之后显著下降。Zhu 等 (2016a) 研究认为, *LBD* 转录因子基因在 *WOX11* 的作用下上调表达, 是根原基原始细胞向根原基细胞转变的关键基因, 但也有研究认为 *LBD* 转录因子可在生长素的作用下直接被生长素响应因子 *ARF* 激活。因此, *LBD* 转录因子可能同时参与了不定根发生初期再生潜能细胞向根原始细胞转变过程, *LBD* 转录因子在核桃不定根发生过程中的作用还有待进一步研究; *SHR* 和 *SCL* 在核桃不定根发生的早期表达量较高, 与拟南芥和欧洲栗 (*Castanea sativa*) 研究结果 (Sánchez et al., 2007; Della et al., 2015) 一致。同时, 两者在扦插后 120 h 的上调表达, 表明两者可能在根原始细胞向根原基细胞转变的过程中也发挥重要作用。*CYCA* 和 *CYCD* 在扦插后 120 h 特异上调表达, 说明两者可以作为插穗进入不定根原基建成的标志基因, 同时也证明了两者在不定根发生过程中的关键作用。

综上所述, 构建了核桃不定根发生过程关键基因表达调控模型 (图 7): *PIN6* 等基因介导的生长素极性运输对于不定根发生初期所需的高浓度 IAA 富集具有重要作用; *SHR*、*WOX11*、*LBD16*、*WRKY14* 和 *SCL* 主要参与形成层细胞向根原基原始细胞的转化过程, *SAUR24*、*WOX5*、*CYCA* 和 *CYCD* 主要影响根原基原始细胞向根原基细胞团的转变过程; 同时, 细胞周期蛋白基因 (*CYCA*、*CYCD*) 可以作为插穗进入根原基原始细胞向根原基细胞转变阶段的标志基因。

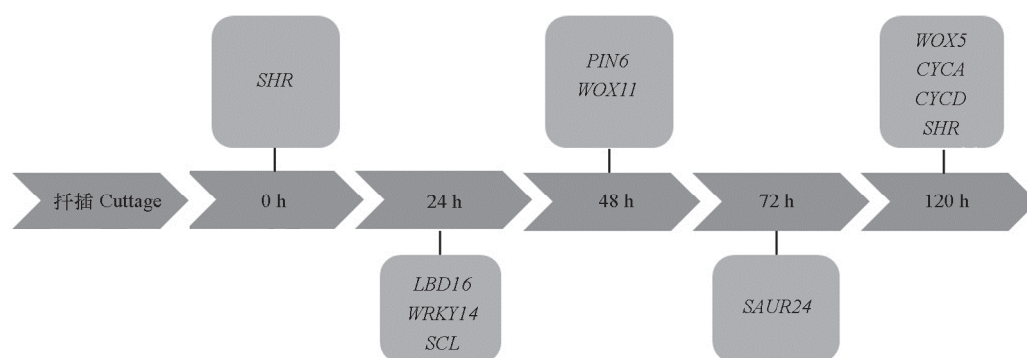


图 7 核桃不定根发生过程中关键功能基因表达调控模型

图中各时期对应基因表示在该时期显著上调表达的基因。

Fig. 7 Expression patterns of key genes during adventitious root formation

The corresponding genes in the figure represent the genes that are significantly up-regulated during this period.

References

- Andersen C L, Jensen J L, Ørntoft, T F. 2004. 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. *Cancer Research*, 64 (15): 5245 - 5250.
- Artico S, Nardeli S M, Brilhante O, Grossi-de-Sa M F, Alves-Ferreira M. 2010. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *BMC Plant Biology*, 10 (1): 49.
- Battaglia M, Ripodas C, Clúa J, Baudin M, Aguilar M, Niebel A, Blanco F. 2014. The NF-YC1 interacting protein SIN1, a member of the GRAS family, is required for nodule organogenesis, infection thread progression and lateral root growth. *Plant Physiology*, 164 (3): 1430 - 1442.
- Chen L, Tong J, Xiao L, Ruan Y, Liu J, Zeng M, Xu L. 2016. YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during

- de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany, 67 (14): 4273 – 4284.
- Chen Y, Fan X, Song W, Zhang Y, Xu G. 2012. Over-expression of *OsPIN2* leads to increased tiller numbers, angle and shorter plant height through suppression of *OsLAZY1*. Plant Biotechnology Journal, 10 (2): 139 – 149.
- da Costa C T, Gaeta M L, de Araujo Mariath J E, Offringa R, Fett-Neto A G. 2018. Comparative adventitious root development in pre-etiolated and flooded *Arabidopsis* hypocotyls exposed to different auxins. Plant Physiology and Biochemistry, 127: 161 – 168.
- Della Rovere F, Fattorini L, D'angeli S, Velocchia A, Del Duca S, Cai G, Falasca G, Altamura M M. 2015. *Arabidopsis* SHR and SCR transcription factors and AUX1 auxin influx carrier control the switch between adventitious rooting and xylogenesis *in planta* and *in vitro* cultured thin cell layers. Annals of Botany, 115 (4): 617 – 628.
- He Fu-qiang. 2011. Cloning and expression of *LFY* homologous gene from walnut [Ph. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)
- 何富强. 2011. 核桃 *LFY* 同源基因的克隆和表达研究 [博士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Guilfoyle T J, Hagen G. 2007. Auxin response factors. Current Opinion in Plant Biology, 10 (5): 453 – 460.
- Hou K, Wu W, Gan S S. 2013. *SAUR36*, a small auxin up RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 161 (2): 1002 – 1009.
- Hu R, Fan C, Li H, Zhang Q, Fu Y F. 2009. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. BMC Molecular Biology, 10 (1): 93.
- Hu X, Xu L. 2016. Transcription factors *WOX11/12* directly activate *WOX5/7* to promote root primordia initiation and organogenesis. Plant Physiology, 172 (4): 2363 – 2373.
- Kevers C, Hausman J. F, Faivre-Rampant O, Evers D, Gaspar T. 1997. Hormonal control of adventitious rooting: progress and questions. Journal of Applied Botany, 71 (3 – 4), 71 – 79.
- Lavedrine C, Farcot E, Vernoux T. 2015. Modeling plant development: from signals to gene networks. Current Opinion in Plant Biology, 27: 148 – 153.
- Legué V, Rigal A, Bhalerao R P. 2014. Adventitious root formation in tree species: involvement of transcription factors. Physiologia Plantarum, 151 (2): 192 – 198.
- Li Xue, Pan Xue-jun, Zhang Wen-e, Zhang Rui, Chen Jing. 2017. Evaluation of the stability of real-time fluorescent quantitative PCR expression of walnut internal reference genes. Plant Physiology Journal, 53 (9): 1795 – 1802. (in Chinese)
- 李 雪, 潘学军, 张文娥, 张 睿, 陈 静. 2017. 核桃内参基因实时荧光定量 PCR 表达稳定性评价. 植物生理学报, 53 (9): 1795 – 1802.
- Lin Y L, Lai Z X. 2010. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree. Plant Science, 178 (4): 359 – 365.
- Liu B, Wang L, Zhang J, Li J, Zheng H, Chen J, Lu M. 2014a. WUSCHEL-related Homeobox genes in *Populus tomentosa*: diversified expression patterns and a functional similarity in adventitious root formation. BMC Genomics, 15 (1): 296.
- Liu Hao, Song Xiao-bo, Zhou Nai-fu, Ma Qing-guo, Pei Dong. 2017. Adventitious root formation with IBA and endogenous hormones dynamics in walnut soft-cuttings. Journal of Zhejiang A & F University, 34 (6): 1038 – 1043. (in Chinese)
- 刘 昊, 宋晓波, 周乃富, 马庆国, 裴 东. 2017. 吲哚丁酸对核桃嫩枝扦插生根及内源激素变化的影响. 浙江农林大学学报, 34 (6): 1038 – 1043.
- Liu H, Gao Y, Song X, Ma Q, Zhang J, Pei D. 2018. A novel rejuvenation approach to induce endohormones and improve rhizogenesis in mature *Juglans* tree. Plant methods, 14 (1): 13.
- Liu J, Sheng L, Xu Y, Li J, Yang Z, Huang H, Xu L. 2014b. *WOX11* and *WOX12* are involved in the first-step cell fate transition during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 26 (3): 1081 – 1093.
- Liu Y, Ahn J E, Datta S, Salzman R A, Moon J, Huyghues-Despointes B, Zhu-Salzman K. 2005. *Arabidopsis* vegetative storage protein is an anti-insect acid phosphatase. Plant Physiology, 139 (3): 1545 – 1556.
- Matoušková P, Bártíková H, Boušová I, Hanušová V, Sztáková B, Skálová L. 2014. Reference genes for real-time PCR quantification of messenger RNAs and microRNAs in mouse model of obesity. PLoS ONE, 9 (1): e86033.

- Pei Dong, Zhang Jun-pei, Xu Hu-zhi. 2005. Cutting propagation method for *Juglans*: China, CN 200410009201. 2004-06-11. (in Chinese)
- 裴 东, 张俊佩, 徐虎智. 2005. 核桃属树木嫩枝扦插繁殖方法: 中国, CN 200410009201. 2004-06-11.
- Rigal A, Yordanov S Y, Perrone I, Karlberg A, Tisserant E, Bellini C, Victor B. Busov, Martin F, Kohler A, Bhalerao R, Legué V. 2012. The *Populus* AINTEGUMENTA LIKE 1 homeotic transcription factor *PtAIL1* controls the formation of adventitious root primordia. *Plant Physiology*, 160 (4): 1996 – 2006.
- Sánchez C, Vielba J M, Ferro E, Covelo G, Solé A, Abarca D, Diaz-Sala C. 2007. Two SCARECROW-LIKE genes are induced in response to exogenous auxin in rooting-competent cuttings of distantly related forest species. *Tree Physiology*, 27 (10): 1459 – 1470.
- Sato A, Yamamoto K T. 2008. Overexpression of the non – canonical Aux/IAA genes causes auxin-related aberrant phenotypes in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 133 (2): 397 – 405.
- Steffens B, Rasmussen A. 2016. The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, 170 (2): 603 – 617.
- Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J, Zhang Z. 2009. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 10 (1): 71.
- Vandesompele J, de Preter K, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, de Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3 (7): 1 – 12.
- Wan H, Zhao Z, Qian C, Sui Y, Malik A A, Chen J. 2010. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Analytical Biochemistry*, 399 (2): 257 – 261.
- Wei Jie-shu, Yang Jin-fen. 2013. Determination of relative gene expression by fluorescence quantitative comparison Ct value method. *Highlights of Science paper Online*, 6 (5): 390 – 395. (in Chinese)
- 魏洁书, 杨锦芬. 2013. 应用荧光定量比较 Ct 值法测定基因相对表达量. *中国科技论文在线精品论文*, 6 (5): 390 – 395.
- Wu Jian-yang, He Bing, Du Yu-jie, Li Wei-cai, Wei Yong-zan. 2017. Analysis method of systematically evaluating stability of reference genes using geNorm, NormFinder and BestKeeper. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, (5): 278 – 281. (in Chinese)
- 吴建阳, 何 冰, 杜玉洁, 李伟才, 魏永赞. 2017. 利用 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper 软件进行内参基因稳定性分析的方法. *现代农业科技*, (5): 278 – 281.
- Xu Li, Chen Xin, Wei Hai-rong, Zhang Li-si, Zong Xiao-juan, Wang Jia-wei, Liu Qing-zhong. 2014. Molecular cloning, expression and single nucleotide polymorphisms analysis of typical Y2SK2 dehydrin in *Juglans*. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (8): 1573 – 1582. (in Chinese)
- 徐 丽, 陈 新, 魏海蓉, 张力思, 宗晓娟, 王甲威, 刘庆忠. 2014. 核桃 Y2SK2 型脱水素基因 *JrDHN* 的克隆, 表达和单核苷酸多态性分析. *园艺学报*, 41 (8): 1573 – 1582.
- Xu M, Zhang B, Su X, Zhang S, Huang M. 2011. Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Populus*. *Analytical Biochemistry*, 408 (2): 337 – 339.
- Xu M, Zhu L, Shou H, Wu P. 2005. A PIN1 family gene, OsPIN1, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. *Plant and Cell Physiology*, 46 (10): 1674 – 1681.
- Xuan L, Xu M, Chen C, Yang C, Xu L A, Huang M. 2014. Identification and characterization of three *PeSHRs* and one *PeSCR* involved in adventitious root development of *Populus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117 (2): 253 – 264.
- Zhang N, Huang X, Bao Y, Wang B, Liu L, Dai L, Peng D. 2015. Genome-wide identification and expression profiling of WUSCHEL-related homeobox (*WOX*) genes during adventitious shoot regeneration of watermelon (*Citrullus lanatus*). *Acta Physiologiae Plantarum*, 37 (11): 224.
- Zhu L, Zheng C, Liu R, Song A, Zhang Z, Xin J, Chen F. 2016a. Chrysanthemum transcription factor CmLBD1 direct lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 6: 20009.
- Zhu Y, Liao W, Niu L, Wang M, Ma Z. 2016b. Nitric oxide is involved in hydrogen gas-induced cell cycle activation during adventitious root formation in cucumber. *BMC Plant Biology*, 16 (1): 146.