

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.04.002

引用格式:徐艺,王婷,郭玉朋,等.‘公农1号’苜蓿不同组织和涝害胁迫下内参基因的筛选评价[J].草地学报,2026,34(4):1146–1157

XU Yi, WANG Ting, GUO Yu-peng, et al. Evaluation and Screening of Reference Genes in Alfalfa (*Medicago sativa* L. ‘Gongnong No. 1’) Different Tissues under Waterlogging Stress[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(4):1146–1157

‘公农1号’苜蓿不同组织和涝害胁迫下内参基因的筛选评价

徐艺^{1,2#}, 王婷^{1#}, 郭玉朋³, 苗兴芬^{2*}, 郑霞^{1,4*}, 石鹏君^{1,4}

(1. 中国农业科学院麻类研究所, 湖南长沙 410221; 2. 黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江大庆 163319; 3. 青海民族大学生态环境与资源学院, 青海西宁 810007; 4. 中国农业科学院国家南繁研究院, 海南三亚 572024)

摘要:紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)内参基因的稳定性及适用性因品种、生长发育及环境条件的不同差异较大。本研究以紫花苜蓿‘公农1号’为材料,使用qRT-PCR技术与geNorm, NormFinder, BestKeeper和RefFinder等软件,评估8个常见内参基因 *GAPDH*, *UBL-2a*, *Rer1*, *eEF-1α*, *ADF*, *UBC*, *TUB* 和 *Actin* 等不同时期的组织表达特异性以及涝害胁迫下的表达稳定性。结果表明,‘公农1号’幼苗期稳定的内参基因是 *Rer1*, *Actin*, *UBC*, 其中叶、茎和根中表达最稳定的内参基因分别是 *Actin*, *Rer1*, *GAPDH*; 成株期最稳定的内参基因是 *ADF*, *Actin*, *TUB*, 而成株期叶、茎、根和花中表达最稳定的分别是 *eEF-1α*, *Rer1*, *Actin* 和 *UBL-2a*。涝害胁迫下,幼苗期叶片稳定性前三的内参基因为 *TUB*, *ADF* 和 *eEF-1α*, 根部为 *ADF*, *UBL-2a* 和 *Rer1*; 成株期叶中稳定性前三的内参基因为 *ADF*, *Actin* 和 *TUB*, 根部为 *UBL-2a*, *UBC* 和 *ADF*。 *Rer1* 和 *UBL-2a* 的稳定性受发育时期和组织特异性影响较小,适合作为组织表达特异性研究的内参基因; *ADF* 适合作为涝害胁迫研究的内参基因。

关键词:紫花苜蓿; 内参基因; 非生物胁迫; 表达稳定性

中图分类号: S541

文献标识码: A

文章编号: 1007-0435(2026)04-1146-12

Evaluation and Screening of Reference Genes in Alfalfa (*Medicago sativa* L. ‘Gongnong No. 1’) Different Tissues under Waterlogging Stress

XU Yi^{1,2#}, WANG Ting^{1#}, GUO Yu-peng³, MIAO Xing-fen^{2*}, ZHENG Xia^{1,4*}, SHI Peng-jun^{1,4}

(1. Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan Province 410221, China; 2. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang Province 163319, China; 3. The College of Ecological Environment and Resources, Qinghai Minzu University, Xining, Qinghai Province 810007, China; 4. National Nanfan Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Sanya, Hainan Province 572024, China)

Abstract: The stability and applicability of reference genes in alfalfa vary significantly depending on the cultivar, growth and development stages, and environmental conditions. In this study, alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivar ‘Gongnong No. 1’ was used as material, and eight candidate reference genes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase *GAPDH*, ubiquitin protein ligase 2a *UBL-2a*, Retention in Endoplasmic Reticulum *Rer1*, eukaryotic elongation factor-1 alpha *eEF-1α*, actin-depolymerizing factor *ADF*, ubiquitin carrier protein *UBC*, tubulin beta-1 chain *TUB*, and *Actin* were selected to evaluate their expression stability of different tissues in seedling and adult plant, as well as under waterlogging stress. The analysis employed quantitative real-

收稿日期: 2025-04-15; 修回日期: 2025-06-13

基金项目: 湖南省自然科学基金-省市联合基金(2022JJ50021); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-IBFC); 三亚中国农业科学院国家南繁研究院“南繁专项”(YYLH2505)资助

作者简介: #徐艺(1996-), 女, 汉族, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事牧草种质资源创新与利用研究, E-mail: xuyi01010219@163.com; #王婷(1998-), 女, 汉族, 甘肃会宁人, 硕士研究生, 主要从事苜蓿逆境分子生物学研究, E-mail: 82101235179@caas.cn; *通信作者 Author for correspondence, E-mail: byndmxf@126.com; zhengxia@caas.cn

time PCR (qRT-PCR) and four softwares, including geNorm, NormFinder, BestKeeper, and RefFinder. The results showed that, at the seedling stage, *Rer1*, *Actin*, and *UBC* were the most stable reference genes. At the tissue level, the most stable reference genes for leaves, stems, and roots were *Actin*, *Rer1*, and *GAPDH*, respectively. At the adult stage, *ADF*, *Actin*, and *TUB* exhibited the highest stability, while the most stable reference genes for leaves, stems, roots, and flowers were *eEF-1 α* , *Rer1*, *Actin*, and *UBL-2a*, respectively. Under waterlogging stress, the three most stable reference genes in seedling leaves were *TUB*, *ADF*, and *eEF-1 α* , whereas in seedling roots they were *ADF*, *UBL-2a*, and *Rer1*. In the adult stage, the most stable genes were *ADF*, *Actin*, and *TUB* in leaves, and *UBL-2a*, *UBC*, and *ADF* in roots. Overall, *Rer1* and *UBL-2a* are recommended as reference genes for studies of tissue-specific expression, as their stability was less affected by developmental stage or tissue type. *ADF* and *TUB* are suitable reference genes for studies involving waterlogging stress.

Key words: Alfalfa; Reference genes; Abiotic stress; Expression stability

紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 是豆科苜蓿属多年生优质牧草, 广泛分布在我国干旱和半干旱区, 因其富含蛋白质和维生素而被称为“牧草之王”^[1-2]。作为重要的饲草作物, 紫花苜蓿在畜牧业中具有重要的经济价值^[3]。然而, 在其漫长的生长周期中, 紫花苜蓿常常面临多种非生物胁迫, 如涝害、干旱、高温和重金属污染等, 这些逆境条件对其生长发育、产量和品质均产生显著影响^[4-6]。其中, 涝害是影响紫花苜蓿生长的主要胁迫之一。因此, 深入研究紫花苜蓿的生长发育调控机理及其抗逆机理, 对于促进分子育种和品种改良具有重要意义。

基因表达分析是揭示植物生物学过程潜在分子机制的重要手段^[7]。实时荧光定量PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 因高灵敏度、准确性和可靠性, 已成为分子生物学研究基因表达水平的常用技术^[8]。在 qRT-PCR 分析中, 内参基因的选择至关重要。理想的内参基因应在不同组织、发育阶段和逆境条件下保持稳定的表达水平, 以确保目的基因表达量分析的准确性和可靠性。传统的内参基因, 如 β -肌动蛋白基因 (β -*actin*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*GAPDH*) 和多聚泛素酶基因 (*UBQ*) 等, 被广泛用于多种植物的基因表达研究^[9]。然而, 研究表明, 这些传统内参基因在不同实验条件下的表达稳定性可能存在显著波动, 导致基因表达分析结果出现偏差^[10-11]。因此, 针对不同物种、组织类型和胁迫条件, 筛选合适的内参基因是确保基因表达分析结果可靠性的关键步骤。

基因的表达研究离不开基因组数据的支持, 紫花苜蓿基因组高度杂合 (同源四倍体、异花授粉), 测序、组装和注释难度较大, 导致苜蓿重要性状研究相对滞后^[12]。近年来, 紫花苜蓿基因组数据的完善^[13], 在一定程度上推动了苜蓿的分子生物学研究

的发展, 对苜蓿内参基因的筛选研究日益深入。付媛媛等^[14]对‘中苜3号’中 β -*actin*, *EF-1 α* , *UBC2*, *TUB* 和 *18S rRNA* 等5个内参基因筛选结果发现, *18S rRNA* 和 *EF-1 α* 在紫花苜蓿不同组织中表达稳定性最好。张薇等^[15]发现在 UV-B 胁迫下, 紫花苜蓿‘维多利亚’幼苗根、茎和叶中的稳定基因不同, *MSC27* 和 *UBQ* 在根中的表达较为稳定, *MSC27* 和 *Actin2* 在茎部稳定性好, *Actin2* 和 *GAPDH* 则在叶中表达稳定。由此可见, 不同组织适用的内参基因并不相同。但是, Liu 等^[16]对‘中苜1号’在低温、PEG-6000, NaCl 和 NaHCO₃ 等胁迫条件下根、茎、叶和花等组织中的 *PIF* 基因家族进行表达分析时仅选择 *GAPDH* 作为内参基因。单一内参基因能否真实反映紫花苜蓿基因表达水平值得关注和深入研究。国外学者 Castonguay 等^[9]对两个品种 (Apica 和 Evolution) 在低温、干旱和光照环境条件下及品种 Orca 不同发育时期的地上部分进行了21个候选内参基因的筛选, 该研究使用了三个苜蓿品种和多个生育期的材料, 是目前较为全面的紫花苜蓿内参基因的筛选研究。但是, 这些紫花苜蓿内参基因的研究中使用的苜蓿品种、候选内参基因及其引物序列各不相同, 不具有普适性和通用性。此外, 紫花苜蓿涝害胁迫机理和内参基因稳定性的研究尚少^[17]。因缺少对紫花苜蓿内参基因的评价, 甚至有学者在对紫花苜蓿进行研究时, 直接采用蒺藜苜蓿的内参基因作为基因表达分析的内参基因。例如, Zhang 等^[18]在研究褪黑素与耐涝性的研究中使用了蒺藜苜蓿的 *Actin* 基因作为内参基因。简言之, 开展苜蓿发育研究和涝害机制研究尚无明确的可靠内参基因。此外, 紫花苜蓿是异花授粉植物, 不同品种在基因表达调控上可能存在显著差异。因此, 针对特定品种的内参筛选尤为重要。

‘公农1号’是我国自主培育的苜蓿品种, 具有

高产稳产和较好的抗寒性,已有稳定的基因编辑技术,适合作为苜蓿转基因的底盘材料^[19]。基于上述原因,本研究以紫花苜蓿品种‘公农1号’为材料,选取8个候选内参基因及已公布的引物序列(*GAPDH*, *UBL-2a*, *Rer1*, *eEF-1 α* , *ADF*, *UBC*, *TUB*和 *Actin*)^[9, 20-22],通过qRT-PCR技术结合多种算法(*geNorm*^[23], *NormFinder*^[24], *BestKeeper*^[25]和 *RefFinder*),系统评估8个候选内参基因在幼苗期、成株期的不同组织以及涝害胁迫下叶和根的表达稳定性,旨在筛选出适合紫花苜蓿组织特异性分析及涝害胁迫研究的稳定内参基因,为紫花苜蓿的基因功能研究和分子育种提供技术支持,并与其他豆科植物的内参基因筛选提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

选取紫花苜蓿品种‘公农1号’的饱满种子,播种于直径12 cm、高12 cm的花盆内,每盆播种5粒,播种深度为1 cm。将花盆置于人工培养室中培养,培养条件设置为:白天23℃/夜晚18℃,光周期为16 h光照/8 h黑暗,光照强度为245 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,相对湿度保持在60%~70%。分别采集3周龄幼苗的根、茎、叶及2月龄成株的根、茎、叶和花,用于组织特异性分析。涝害胁迫处理采用双套盆法,以水面淹过土壤表面2 cm为标准,分别在0 h, 3 h, 6 h和12 h采集叶片和根,液氮速冻后保存于-80℃冰箱备用。所有处理均设置3个生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取与cDNA合成 使用SteadyPure植物RNA快速提取试剂盒(艾科瑞,中国湖南)提取样品总RNA。cDNA第一链的合成采用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa,中国大连),所有操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 引物合成与qRT-PCR扩增 选取8个紫花苜蓿常见内参基因(*GAPDH*, *eEF-1 α* , *UBL-2a*, *Rer1*, *ADF*, *UBC*, *TUB*和 *Actin*)作为候选内参基因,参照Castonguay等^[9]和Wang等^[21]文献中的内参基因,将反转录后的cDNA进行梯度稀释,以循环阈值(Cycle threshold, Ct)值为纵坐标,稀释倍数的log值为横坐标,绘制标准曲线,得出斜率(K)与

相关系数(R^2),根据公式 $E = -1 + 10^{(-1/\text{斜率})}$,计算扩增效率(E),并导出熔解曲线以验证引物特异性。

1.2.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR) 采用SYBR® Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒(艾科瑞,AG21040),于Bio-Rad CFX Manager实时定量PCR仪(USA)上进行qRT-PCR反应。反应体系为20 μL ,包括2 μL cDNA,0.4 μL 正向引物,0.4 μL 反向引物,10 μL 2×SYBR Green Pro Taq HS Premix和7.2 μL RNAase free H₂O。PCR反应程序如下:① 95℃预变性30 s;② 95℃变性10 s,56℃退火30 s,40个循环;③ 60℃~95℃进行熔解曲线分析。

1.2.4 内参基因的筛选验证 使用Excel 2019处理内参基因的Ct值,导入*geNorm*^[23], *NormFinder*^[24]和 *BestKeeper*^[25]进行数据分析。通过在线工具RefFinder (<http://blooge.cn/RefFinder/>)对上述4种分析结果进行综合评估,筛选出最稳定的内参基因。选择RefFinder综合分析结果稳定性排名前两位的内参基因和稳定性最差的内参基因,qRT-PCR检测基因*MS. gene057527*和*MS. gene003383*的表达水平,以验证内参基因筛选结果的准确性。两个基因在涝害胁迫下分别呈上调和下调趋势,转录组数据来自NCBI数据库(Accession: PRJNA596791)。使用DNAMAN软件设计qRT-PCR引物,引物序列如下:

MS. gene057527-F: TTTAGCGCTTCATCC-GACAC;

MS. gene057527-R: ACCACATTTGTGCTGT-GCTG;

MS. gene003383-F: TCACCCACAGAAGAA GAAGTC;

MS. gene003383-R: TACCTGGCAAGTCA-CAAGGATC。

1.2.5 数据处理 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算目的基因的相对表达量,使用Excel 2019和Origin 2021软件进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因引物特异性及扩增效率分析

特异性引物是保证PCR扩增准确性的关键因素。通过琼脂糖凝胶电泳检测(图1),8对候选基因引物的PCR产物条带单一,无引物二聚体,扩增片

段长度符合预期。qRT-PCR 结果显示(表 1),8 个候选内参基因的扩增效率介于 93.58%~110.09% 之间,相关系数 $R^2 \geq 0.99$ 。此外,所有引物的熔解曲线均呈现单一峰,曲线重合性高(图 2),表明引物特异性良好,满足后续内参基因的筛选要求。

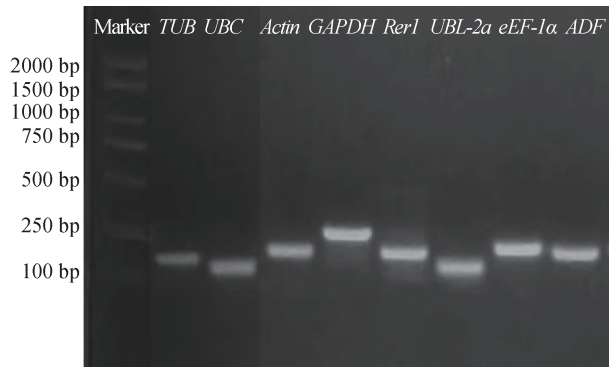


图 1 8 个内参基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of eight candidate reference genes

2.2 候选内参基因表达量分析

Ct 值是衡量基因表达水平的重要指标,Ct 值越大,基因表达水平越低;反之,则表达水平越高。本研究利用 SYBR Green I 荧光染料法对紫花苜蓿不同时期(幼苗期和成株期)、不同组织(根、茎、叶和花)与涝害胁迫下叶、根的 8 个候选内参基因的表达水平进行检测,结果显示(图 3),8 个候选内参基因的 Ct 值介于 22.55~27.82 之间。其中,*eEF-1a* 的

Ct 均值最小,表达量最高;*TUB* 的 Ct 均值最大,表达量最低。此外,单个内参基因的 Ct 值在不同样本中的变化范围存在差异。具体而言,*UBL-2a* 和 *Rer1* 在所有样本中的变化范围较为集中,稳定性较好;*TUB* 的变化范围最广,稳定性相对较差。

2.3 内参基因表达的稳定性

2.3.1 geNorm 分析 geNorm 算法通过计算平均表达稳定值(M)来评估内参基因的稳定性,M 值越小,内参基因的表达水平越稳定(M 值阈值为 1.5)。geNorm 分析结果显示(图 4),正常条件下幼苗期和成株期 8 个内参基因的平均表达稳定值皆为 $M \leq 1.5$,表明这些基因的稳定性均较好(图 4 A-I),其中 *UBL-2a* 稳定性最好。除幼苗期 *UBL-2a* 的 M 值 > 1.5 (图 4J)外,涝害胁迫下其余 7 个内参基因皆为 $M < 1.5$ (图 4J-M)。涝害胁迫下,*ADF* 无论在幼苗期还是成株期稳定性均位列前三。

此外,geNorm 计算了内参基因两两组合的变异系数(V 值),通过参数 $V_{n/n+1}$ 确定所需内参基因的最优数量。结果表明(图 5),正常条件下,苜蓿不同组织候选内参基因 $V_{2/3} < 0.15$,表明苜蓿组织表达特异性研究使用 2 个内参最为合适;将幼苗期或成株期不同组织的全部样品混合分析时,内参基因的最优数分别为 3 个和 4 个。然而,涝害条件下仅幼苗期内参基因变异系数 $V_{5/6}$ 为 0.156,其余组合的 V 值均高于 0.15,表明涝害胁迫下的最适内参基因数量可能需要适度增加。

表 1 内参基因引物扩增效率

Table 1 Primer sequences of reference genes

基因 Gene	基因注释 Gene annotation	基因序列号 Accession number	引物序列 Primers sequence (Forward/Reverse)	扩增效率 Amplification efficiency /%	相关系数(R^2) Correlation coefficient (R^2)	片段大小 Size /bp
<i>UBL-2a</i>	泛素蛋白连接酶 2a Ubiquitin protein ligase 2a	JZ818487	F: CCAAACCCAACTCACCAG R: AGCAGTCCAACCTGCTCAAC	105.09	0.9985	108
<i>ADF</i>	肌动蛋白解聚因子 Actin-depolymerizing factor	JZ818469	F: GCATCTGGTATGGCAGTCC R: GCACTCATCAGCAGGAAGG	95.35	0.9989	183
<i>Rer1</i>	内质网滞留蛋白 Retention in endoplasmic reticulum	JZ818481	F: GCCTTCTGATGGTGGACCT R: GGCCAGAAGACAGGAACATC	93.58	0.9962	165
<i>GAPDH</i>	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	PQ063785.1	F: GGCTGCATCAAGGAGGAAT R: TCCAAGCTCAGCCTCATCAAG	103.21	0.9981	228
<i>eEF-1a</i>	真核延伸因子 1a Eukaryotic elongation factor 1-alpha	JZ818475	F: GAGCCAAAGAGACCCACAGAC R: TCAGTGAGAGCCTCGTGGT	100.06	0.9987	194
<i>Actin</i>	肌动蛋白 Actin	AA660796	F: ACTGGAATGGTGAAGGCTGG R: TGACAATACCGTGCCTCAATGG	96.07	0.9993	190
<i>UBC</i>	泛素载体蛋白 Ubiquitin carrier protein	L06967.1	F: TGATCCCAACCCAAATCTCC R: GCACCTACGATTGTACTCACGCT	98.24	0.9937	83
<i>TUB</i>	微管蛋白 β -1 链 Tubulin beta-1 chain	XM003630465	F: AACCTCATCCCTTTCCACG R: CTTGCATCCACATTTGCTG	110.09	0.9904	125

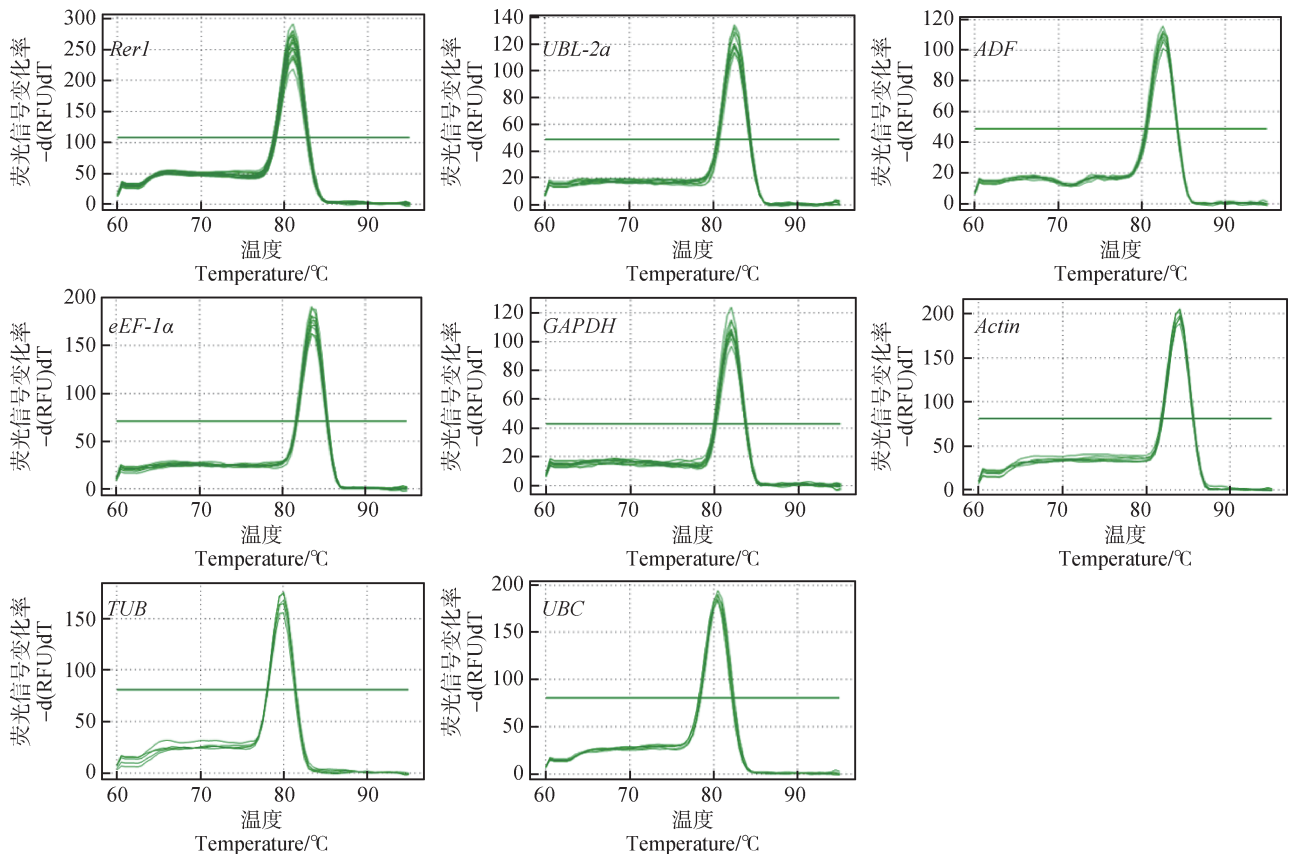


图2 紫花苜蓿8个候选内参基因qRT-PCR产物熔解曲线

Fig. 2 Melting curves of qRT-PCR products from eight candidate reference genes in alfalfa

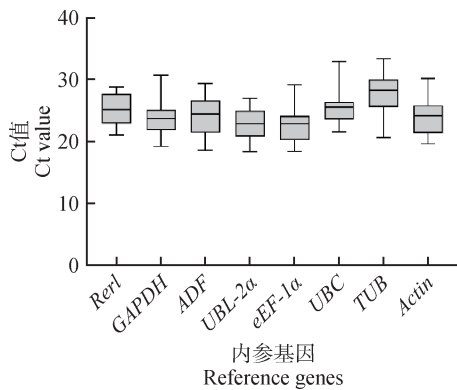


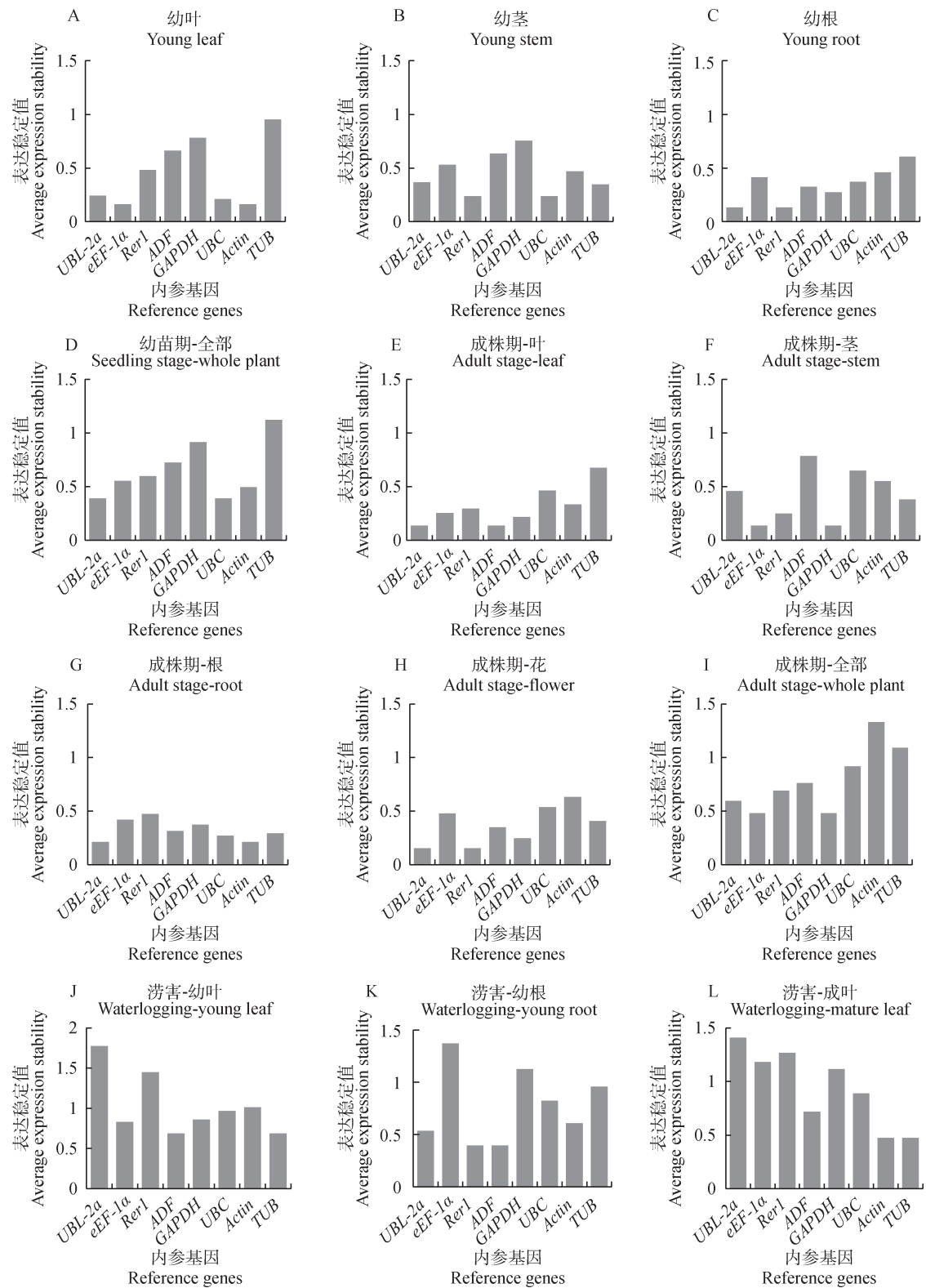
图3 8个候选内参基因的Ct值

Fig. 3 Boxplot of Ct values for eight candidate reference genes in alfalfa

2.3.2 NormFinder 分析 NormFinder通过计算内参基因的稳定性值(Stability value, SV)来筛选最适内参基因,稳定性值越低,表示该基因的表达越稳定。NormFinder结果显示(表2、表3),幼苗期叶、茎和根中,稳定性最高的分别是 *Rer1*, *Rer1* 和 *GAPDH*; 成株期叶、茎、根、花中,稳定性最高的分别是 *Actin*, *Rer1*, *TUB* 和 *UBL-2a*; 涝害胁迫下,幼苗期和成株期叶片中稳定性位列前三的依次是 *TUB*, *ADF*,

eEF-1α 和 *ADF*, *Actin*, *UBC*; 幼苗期和成株期根中稳定性位列前三的依次是 *UBL-2a*, *ADF*, *Rer1* 和 *UBC*, *UBL-2a*, *ADF*。

2.3.3 BestKeeper 分析 BestKeeper通过计算标准差(Standard deviation, SD)和变异系数(Coefficient of variation, CV)来评估内参基因的稳定性,SD和CV值越低,基因表达的稳定性越高。BestKeeper分析结果显示,与涝害胁迫下的SD和CV值相比,正常条件下8个候选内参基因的SD和CV相对较小(图6 A-I),内参基因的稳定性普遍较好。幼苗期叶、茎和根中,稳定性最高的分别是 *UBC*, *Actin* 和 *UBL-2a*; 成株期叶、茎、根和花中,稳定性最高的分别是 *eEF-1α*, *Rer1*, *Rer1* 和 *GAPDH*; 幼苗期 *TUB* 稳定性最差,花中所有候选内参基因表现均比较稳定,以 *GAPDH* 和 *UBL-2a* 为佳。涝害胁迫下,幼苗期和成株期叶片中表达稳定性前三名依次分别为 *TUB*, *UBL-2a*, *ADF* 和 *UBL-2a*, *Rer1*, *TUB*; 幼苗期和成株期根中表达稳定性前三名依次分别为 *UBC*, *UBL-2a*, *Actin* 和 *UBC*, *Rer1*, *UBL-2a*。与对照相比,涝害胁迫下内参基因的SD值和CV值普遍较高(图6J-M),表明内参基因的稳定性受胁迫条件的影响。



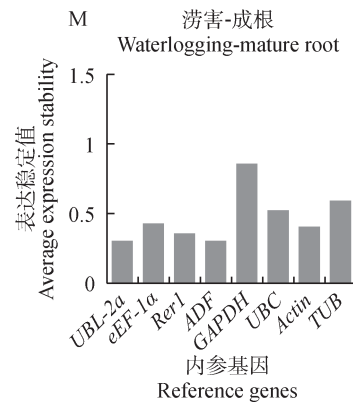


图 4 geNorm 分析 8 个候选内参基因的平均表达稳定值 (M)

Fig. 4 Average expression stability (M) of eight candidate reference genes determined by geNorm analysis

注: A-D, 幼苗期叶、茎、根和全部样品; E-I, 成株期叶、茎、根、花和全部样品; J-K, 幼苗期涝害胁迫叶片和根; L-M, 成株期涝害胁迫叶片和根
Note: A-D, seedling stage (leaves, stems, roots, and all samples); E-I, mature plant stage (leaves, stems, roots, flowers, and all samples); J-K, seedling stage under waterlogging stress (young leaves and roots); L-M, mature plant stage under waterlogging stress (leaves and roots)

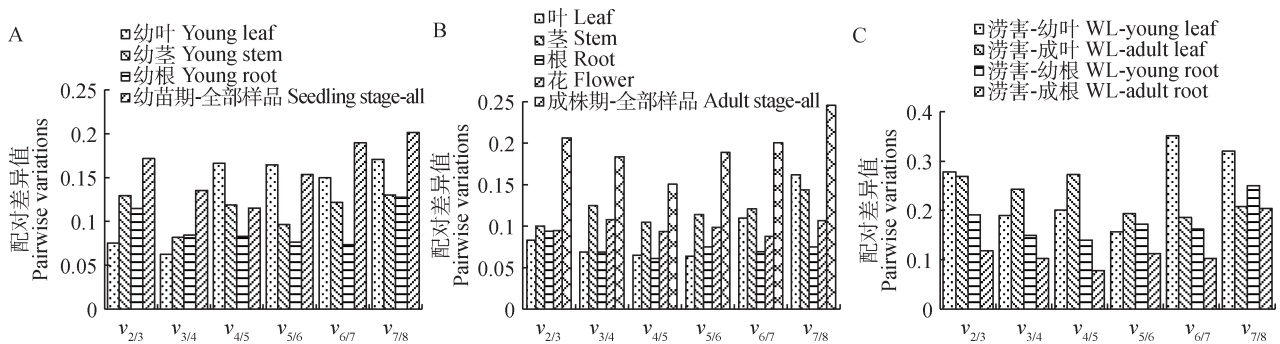


图 5 geNorm 软件分析候选内参基因配对变异系数

Fig. 5 Pairwise variation analysis of candidate reference genes determined by geNorm

注: A, 幼苗期不同组织; B, 成株期不同组织; C, 涝害胁迫幼苗期和成株期叶片和根; WL, 涝害胁迫

Note: A, different tissues at the seedling stage; B, different tissues at the mature plant stage; C, leaves and roots under waterlogging stress at both seedling and mature stages. WL represents waterlogging stress

表 2 NormFinder 计算幼苗期 8 个候选内参基因稳定性值 (SV) 与稳定性排序 (R)

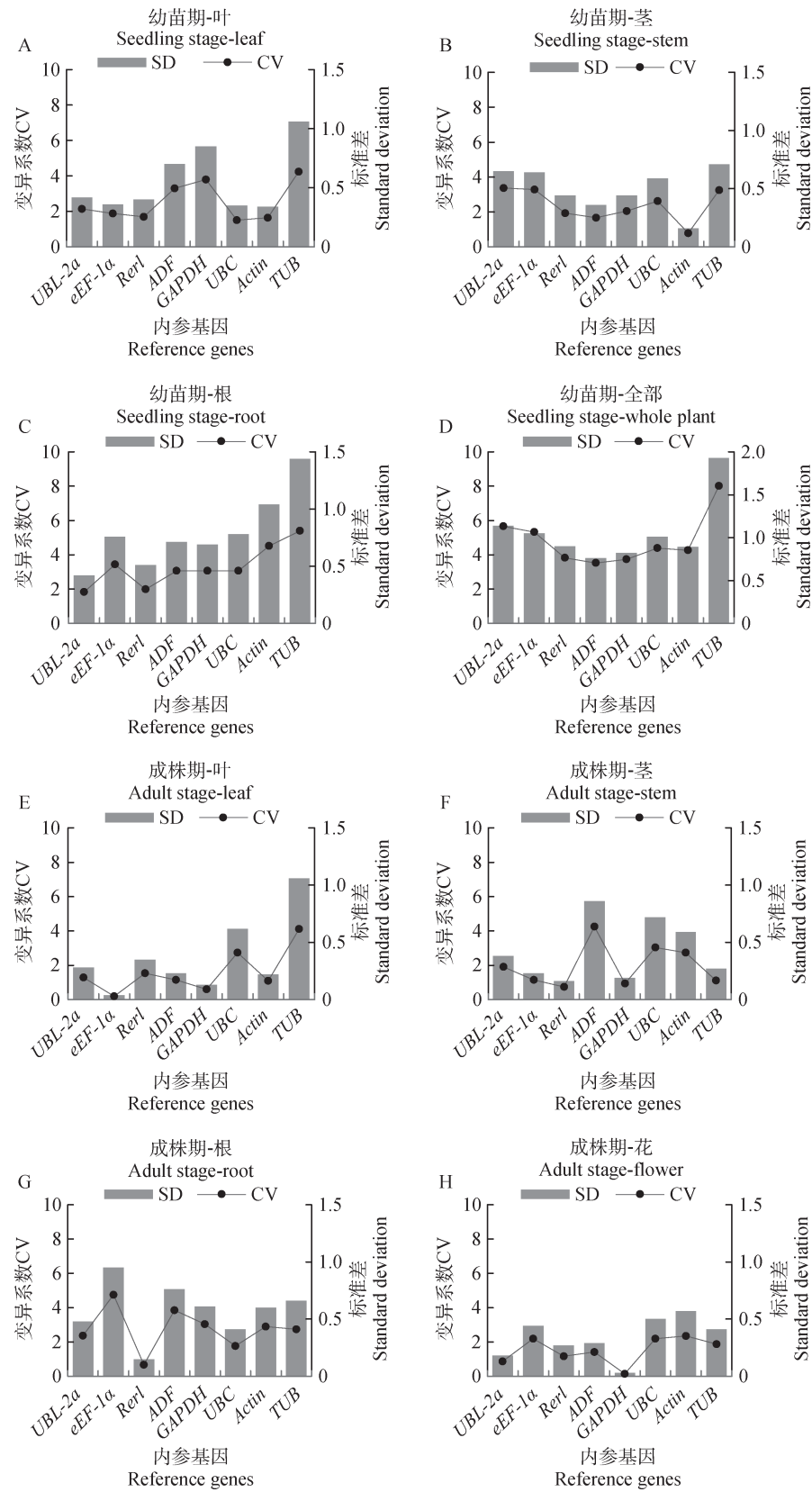
Table 2 Stability values and ranking of eight candidate reference genes at the seedling stage determined by NormFinder analysis

基因 Gene	叶 Leaf	茎 Stem	根 Root	全部组织 All samples	涝害处理-叶 Waterlogging stress-leaf	涝害处理-根 Waterlogging stress-root
UBL-2a	0.693/ _{R6}	0.467/ _{R4}	0.535/ _{R7}	0.668/ _{R4}	2.528/ _{R8}	0.023/ _{R1}
eEF-1a	0.610/ _{R4}	0.593/ _{R6}	0.310/ _{R3}	0.758/ _{R5}	0.917/ _{R3}	1.983/ _{R8}
Rer1	0.126/ _{R1}	0.130/ _{R1}	0.378/ _{R6}	0.281/ _{R1}	2.129/ _{R7}	0.429/ _{R3}
ADF	0.673/ _{R5}	0.714/ _{R7}	0.218/ _{R2}	0.788/ _{R6}	0.815/ _{R2}	0.146/ _{R2}
GAPDH	0.898/ _{R7}	1.027/ _{R8}	0.118/ _{R1}	1.242/ _{R7}	0.974/ _{R4}	0.433/ _{R4}
UBC	0.578/ _{R2}	0.417/ _{R3}	0.373/ _{R5}	0.444/ _{R3}	1.024/ _{R6}	1.026/ _{R6}
Actin	0.586/ _{R3}	0.174/ _{R2}	0.327/ _{R4}	0.305/ _{R2}	1.011/ _{R5}	0.462/ _{R5}
TUB	1.346/ _{R8}	0.570/ _{R5}	1.011/ _{R8}	1.591/ _{R8}	0.346/ _{R1}	1.337/ _{R7}

表 3 NormFinder 分析成株期 8 个候选内参基因稳定性值 (SV) 与稳定性排序 (R)

Table 3 Stability values and ranking of eight candidate reference genes in plants determined by NormFinder analysis

基因 Gene	叶 Leaf	茎 Stem	根 Root	花 Flower	全部样品 All samples	涝害处理-叶 Waterlogging stress-leaf	涝害处理-根 Waterlogging stress-root
UBL-2a	0.431/ _{R5}	0.495/ _{R5}	0.214/ _{R4}	0.076/ _{R1}	0.314/ _{R1}	1.625/ _{R8}	0.151/ _{R2}
eEF-1a	0.191/ _{R2}	0.344/ _{R4}	0.538/ _{R7}	0.516/ _{R5}	0.765/ _{R5}	1.310/ _{R7}	0.630/ _{R6}
Rer1	0.559/ _{R7}	0.152/ _{R1}	0.588/ _{R8}	0.155/ _{R3}	0.409/ _{R3}	1.052/ _{R5}	0.483/ _{R5}
ADF	0.324/ _{R4}	1.135/ _{R8}	0.312/ _{R5}	0.408/ _{R4}	0.540/ _{R4}	0.539/ _{R1}	0.270/ _{R3}
GAPDH	0.219/ _{R3}	0.309/ _{R3}	0.415/ _{R6}	0.121/ _{R2}	0.434/ _{R2}	1.294/ _{R6}	1.626/ _{R8}
UBC	0.552/ _{R6}	0.912/ _{R7}	0.158/ _{R3}	0.623/ _{R7}	0.913/ _{R6}	0.660/ _{R3}	0.151/ _{R1}
Actin	0.130/ _{R1}	0.636/ _{R6}	0.150/ _{R2}	0.838/ _{R8}	1.940/ _{R8}	0.652/ _{R2}	0.666/ _{R7}
TUB	1.287/ _{R8}	0.238/ _{R2}	0.147/ _{R1}	0.581/ _{R6}	1.577/ _{R7}	0.744/ _{R4}	0.444/ _{R4}



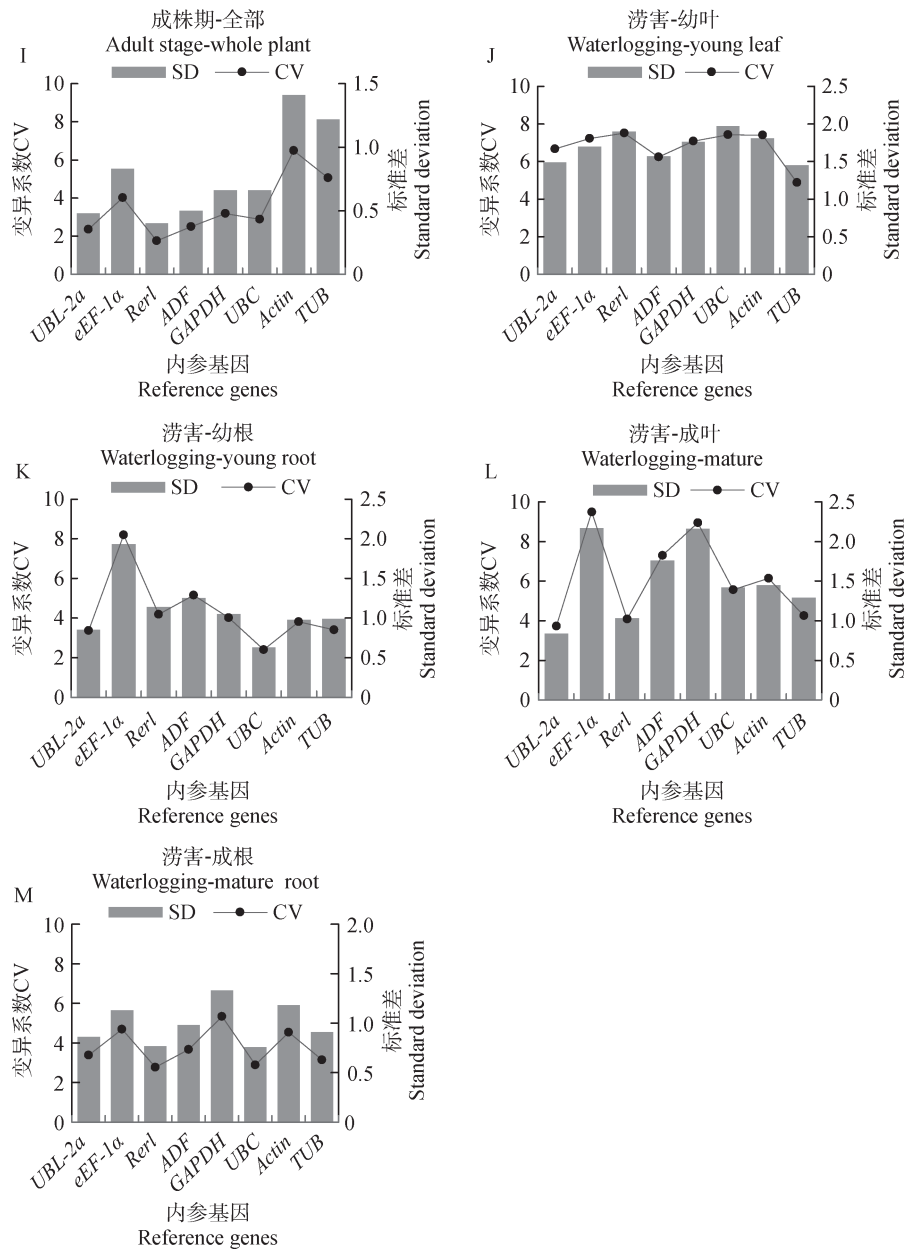


图 6 BestKeeper 软件分析 8 个候选内参基因的稳定性

Fig. 6 Stability of eight candidate reference genes determined by using BestKeeper software

注: A-D, 幼苗期叶、茎、根和全部样品; E-I, 成株期叶、茎、根、花和全部样品; J-K, 幼苗期涝害胁迫叶片和根; L-M, 成株期涝害胁迫叶片和根
Note: A-D, seedling stage (leaves, stems, roots, and all samples); E-I, mature plant stage (leaves, stems, roots, flowers, and all samples); J-K, seedling stage under waterlogging stress (leaves and roots); L-M, mature plant stage under waterlogging stress (leaves and roots)

2.3.4 RefFinder 分析 RefFinder 结合了 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper 的分析结果, 自动计算每个基因在四种算法中的几何平均数, 并基于该几何平均数对候选内参基因进行最终排名。几何平均数 (geometric mean) 越小的基因稳定性越高。RefFinder 分析结果显示 (表 4), 正常培养条件下, 幼苗期叶、茎、根中表达最稳定的内参基因分别是 *Actin*, *Rer1* 和 *GAPDH*; 成株期叶、茎、根、花中, 表达最稳定的分别是 *eEF-1α*, *Rer1*,

Actin 和 *UBL-2a*; *Rer1* 和 *UBL-2a* 的稳定性受植株的发育时期和组织特异性影响较小, 表达稳定。涝害胁迫下, 幼苗期叶片中最佳内参基因为 *TUB*, *ADF*, *eEF-1α*, 根中为 *ADF*, *UBL-2a*, *Rer1*; 成株期叶片中最佳内参基因为 *ADF*, *Actin*, *TUB*, 根中为 *UBL-2a*, *UBC*, *ADF*。综合来看, 非胁迫下全部样品中 *Rer1* 的表达稳定性都较好。*ADF* 无论在叶中还是根中表达均较稳定, 适合用作涝害研究的内参基因。

表 4 8 个候选内参基因的稳定性综合排名

Table 4 Comprehensive ranking of stability of eight candidate reference genes

时期	排序	叶		茎		根		花		全部样品		涝害胁迫-叶		涝害胁迫-根	
Period	Rank	Leaf		Stem		Root		Flower		All samples		Waterlogging stress-leaf		Waterlogging stress-root	
成株期 Adult stage	1	<i>eEF-1a</i>	2.00	<i>Rer1</i>	1.32	<i>Actin</i>	1.68	<i>UBL-2a</i>	1.19	<i>UBL-2a</i>	1.57	<i>ADF</i>	2.06	<i>UBL-2a</i>	1.57
	2	<i>GAPDH</i>	2.06	<i>GAPDH</i>	2.06	<i>TUB</i>	2.63	<i>GAPDH</i>	1.86	<i>GAPDH</i>	2.21	<i>Actin</i>	2.11	<i>UBC</i>	2.06
	3	<i>Actin</i>	2.71	<i>eEF-1a</i>	2.63	<i>UBL-2a</i>	2.63	<i>Rer1</i>	2.28	<i>Rer1</i>	2.21	<i>TUB</i>	2.45	<i>ADF</i>	2.34
	4	<i>ADF</i>	2.83	<i>TUB</i>	2.83	<i>UBC</i>	2.71	<i>ADF</i>	4.00	<i>eEF-1a</i>	3.5	<i>UBC</i>	3.72	<i>Rer1</i>	3.31
	5	<i>UBL-2a</i>	3.34	<i>UBL-2a</i>	5.00	<i>Rer1</i>	4.76	<i>eEF-1a</i>	5.48	<i>ADF</i>	3.94	<i>Rer1</i>	4.33	<i>TUB</i>	5.29
	6	<i>Rer1</i>	5.96	<i>Actin</i>	6.00	<i>ADF</i>	5.44	<i>TUB</i>	5.48	<i>UBC</i>	5.73	<i>UBL-2a</i>	4.76	<i>Actin</i>	5.60
	7	<i>UBC</i>	6.74	<i>UBC</i>	7.00	<i>GAPDH</i>	5.73	<i>UBC</i>	7.00	<i>TUB</i>	7.00	<i>GAPDH</i>	5.96	<i>eEF-1a</i>	5.73
	8	<i>TUB</i>	8.00	<i>ADF</i>	8.00	<i>eEF-1a</i>	7.24	<i>Actin</i>	8.00	<i>Actin</i>	8.00	<i>eEF-1a</i>	6.96	<i>GAPDH</i>	8.00
幼苗期 Seedling stage	1	<i>Actin</i>	1.57	<i>Rer1</i>	1.41	<i>GAPDH</i>	1.73			<i>Rer1</i>	2.11	<i>TUB</i>	1.00	<i>ADF</i>	1.86
	2	<i>Rer1</i>	2.11	<i>Actin</i>	2.11	<i>Rer1</i>	2.45			<i>Actin</i>	2.45	<i>ADF</i>	2.06	<i>UBL-2a</i>	1.86
	3	<i>UBC</i>	2.45	<i>UBC</i>	2.59	<i>UBL-2a</i>	2.65			<i>UBC</i>	2.59	<i>eEF-1a</i>	2.91	<i>Rer1</i>	2.82
	4	<i>eEF-1a</i>	2.63	<i>UBL-2a</i>	4.60	<i>ADF</i>	2.83			<i>UBL-2a</i>	3.25	<i>GAPDH</i>	4.23	<i>UBC</i>	3.83
	5	<i>UBL-2a</i>	4.95	<i>TUB</i>	4.95	<i>eEF-1a</i>	4.36			<i>ADF</i>	3.83	<i>UBL-2a</i>	5.66	<i>Actin</i>	4.16
	6	<i>ADF</i>	5.73	<i>ADF</i>	5.12	<i>UBC</i>	5.23			<i>eEF-1a</i>	4.95	<i>Actin2</i>	5.73	<i>GAPDH</i>	4.47
	7	<i>GAPDH</i>	7.00	<i>eEF-1a</i>	6.00	<i>Actin</i>	5.86			<i>GAPDH</i>	5.12	<i>UBC</i>	5.89	<i>TUB</i>	6.09
	8	<i>TUB</i>	8.00	<i>GAPDH</i>	6.26	<i>TUB</i>	8.00			<i>TUB</i>	8.00	<i>Rer1</i>	7.00	<i>eEF-1a</i>	8.00

2.4 内参基因的稳定性验证

本试验以涝害胁迫下成株期苜蓿叶中稳定性最高的 *ADF*, *TUB* 和稳定性最差的 *eEF-1α* 作为内参基因,对已知在涝害胁迫时分别上调和下调的基因 *MS*.

gene057527 和 *MS. gene003383* 的表达模式进行验证。qRT-PCR 分析结果表明,使用 *ADF* 和 *TUB* 作为内参基因时,目的基因的表达量变化趋势和幅度一致,而使用 *eEF-1α* 作为内参基因时,表达量变化明显不一致(图 7)。

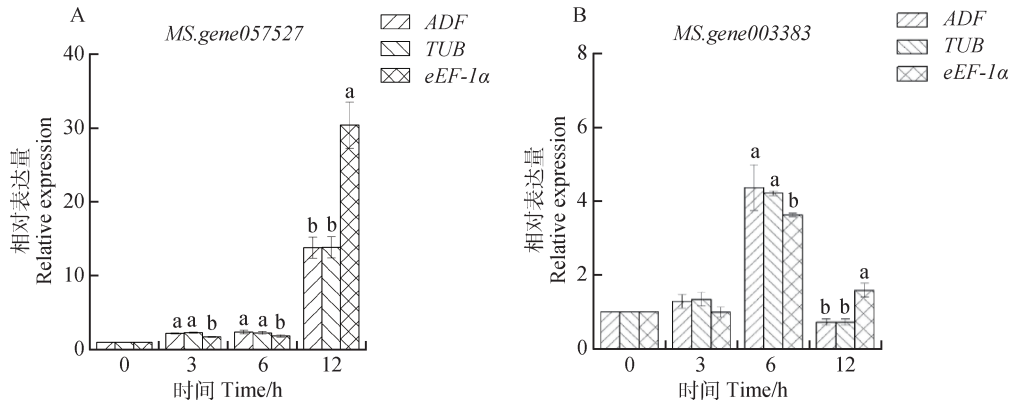


图 7 不同内参基因检测目的基因的表达 (qRT-PCR)

Fig. 7 Expression of the target gene normalized using different candidate reference genes (qRT-PCR)

注:图中不同字母标注表明组间存在统计学显著差异 ($P < 0.05$)

Note: Different superscript letters denote statistically significant differences ($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 内参基因的稳定性

Rer1 参与内质网膜蛋白在内质网中的滞留和回收,对 γ -分泌酶复合物的组装具有重要作用^[26]。本研究中,*Rer1* 在非胁迫条件下的组织表达稳定性较高,但涝害胁迫对幼苗叶片中 *Rer1* 的稳定性影响较大。*UBL-2a* 参与蛋白质的泛素化,对于蛋白质的降解、信号传导和细胞周期调控具有重要作用。本研究中,*UBL-2a* 在成株期组织中表现稳定,且在涝害胁迫下的根中稳定性高,这点与 Castonguay 等人^[9]的研究结果略有不同。*GAPDH* 作为一种代谢

蛋白,在组织中通常表达较为恒定。本研究中 *GAPDH* 在成株期除根以外的组织中表达稳定性较高,但在幼苗期及涝害胁迫下的基因表达稳定性差,这与 Castonguay 等^[9]认为紫花苜蓿在低温、水分亏缺和光周期改变等不同条件下, *GAPDH* 基因表达不稳定结论一致。Castonguay 等^[9]对 21 个内参基因的稳定性筛选认为, *Rer1*, *UBL-2a* 和 *eEF-1α* 在不同发育阶段、低温、干旱和缩短光周期的实验条件下稳定性最好,且不超过 2 个内参基因的组合即可实现广泛实验条件下基因表达的标准化,而 *18S rRNA*, *Actin* 和 *TUB* 的稳定性差。本试验中 8 个候选内参基因的组织表达稳定性均较好,以 *Rer1*

和 *UBL-2a* 的组织表达稳定性为佳。*ADF* 通过解聚肌动蛋白丝,调节细胞运动和信号传导,对细胞骨架动态和基因表达调控具有关键作用^[22]。本研究发现,*ADF* 适合用作涝害研究的内参基因。虽然涝害胁迫与 Castonguay 等人^[9]的缺水胁迫条件和苜蓿品种不同,但皆得出 *ADF* 在水分胁迫下表达稳定性高的结论。岳炜楠等^[27]研究发现 *eEF-1 α* 在紫花苜蓿不同组织中的稳定性好。但是,在本研究中, *eEF-1 α* 的稳定性并不理想。Castonguay 等^[9]发现在低温、水分胁迫和光周期改变等不同环境条件以及三个发育时期,苜蓿的 α -微管蛋白(*Tub*)、 β -*actin* 和 *GAPDH* 等常用作“内参基因”的基因表达不稳定,但本研究发现 *TUB*(tubulin beta-1 chain)在涝害胁迫叶片中表达稳定。付媛媛等^[14]对‘中苜3号’中5个内参基因 *18S rRNA*、 β -*actin*、*EF-1 α* 、*UBC2* 和 *TUB* 的稳定性进行研究,发现 *18S rRNA* 和 *EF-1 α* 在紫花苜蓿不同组织中的表达最稳定。此外,本研究发现 *Actin* 在涝害胁迫下的稳定性差,与国内部分研究人员的结论不一致。刘绵学等^[28]发现 *Co* 胁迫下紫花苜蓿‘游客’最佳内参基因组合为 *Actin2* 和 *18S rRNA*。岳炜楠等^[27]发现‘新疆大叶’不同激素处理下叶片中的最佳内参基因为 *Actin*。由此可见,不同品种、不同实验条件下内参基因的稳定性差别明显。本研究未将植物中常用的内参基因 *18S rRNA* 列为候选基因进行筛选,除本研究所分析的8个常见内参基因外,是否还有其他更好的未知内参基因尚待发掘。此外,本研究仅选择苜蓿品种‘公农1号’进行内参基因筛选,原因在于‘公农1号’是我国自有苜蓿品种,其已有成功的基因编辑体系^[19],对其内参基因的筛选可以为后续以‘公农1号’为底盘材料的分子生物学相关研究提供可靠的内参基因,促进不同研究团队结果的互信性。

3.2 内参基因的最佳数量

本研究中 geNorm 分析结果显示,非胁迫条件下内参基因两两配对变异系数 *V* 在单一组织如根、茎、叶和花中易满足阈值要求($V < 0.15$),2个内参基因即可满足基因组织表达特异性研究的需求。但是,当将幼苗期或成株期不同组织的样品一起分析时,则3~4个内参基因为佳,说明当同时比较不同组织或不同时期来源样品的基因表达时,所需内参基因的最佳数量随之增加。此外,本研究涝害胁迫下叶的 *V* 值均高于阈值,但根的 $V_{3/4} < 0.15$,表明研究苜

蓿根中基因表达分析3个内参基因即可,上述发现在已有的内参基因筛选中尚未见相似的结果。Castonguay 等^[9]的研究认为,2个稳定的内参基因组合足以满足大部分实验条件。分析变异系数 *V* 值偏高的原因,首先不同研究筛选的内参基因、苜蓿品种及实验条件不同,另外 geNorm 算法只是内参基因筛选的工具之一,配合其他算法进行综合分析得到的结论更可靠,而综合评价工具 RefFinder 并未计算内参基因的最佳数量^[29]。内参基因数量的增加无疑会增加工作量和研究成本,如何平衡实验的准确性与实验成本可能是今后选择内参基因时需要考量的问题。

4 结论

本研究通过 qRT-PCR 技术结合多种算法 (geNorm, NormFinder, BestKeeper 和 RefFinder),分别确定了紫花苜蓿‘公农1号’不同发育时期、不同组织和涝害胁迫下叶与根中具有候选潜力的内参基因。*Rer1*、*Actin*、*UBC* 和 *UBL-2a* 是幼苗期的稳定候选内参基因,*UBL-2a*、*GAPDH* 和 *Rer1* 是成株期稳定的候选内参基因;*Rer1* 和 *UBL-2a* 的稳定性受植株的发育时期和组织特异性影响较小,适合用作组织特异性研究。涝害胁迫下,无论幼苗期还是成株期,叶片和根中 *ADF* 的表达都很稳定,适合作为涝害研究的内参基因。本研究确定的稳定内参基因有助于获得准确的 qRT-PCR 结果,助力通过苜蓿基因表达分析研究苜蓿的生长发育调控及对涝害胁迫的响应机理。

参考文献

- [1] WANG Y Z, RUAN Q, ZHU X L, et al. Identification of alfalfa *SPL* gene family and expression analysis under biotic and abiotic stresses[J]. Scientific Reports, 2023, 13: 84
- [2] LIU L, SI L, ZHANG L S, et al. Metabolomics and transcriptomics analysis revealed the response mechanism of alfalfa to combined cold and saline-alkali stress[J]. The Plant Journal, 2024, 119(4): 1900-1919
- [3] LORENZO C D, GARCÍA-GAGLIARDI P, ANTONIETTI M S, et al. Improvement of alfalfa forage quality and management through the down-regulation of *MsFTa₁* [J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(4): 944-954
- [4] 曹刚,董慧,车钊,等. 淹水胁迫对不同紫花苜蓿品种产量和品质的影响[J]. 草地学报, 2017, 25(1): 135-141
- [5] CAO G, DONG H, CHE Z, et al. Effects of waterlogging stress on the yield and quality of alfalfa varieties [J]. Acta Agrestia Sinica, 2017, 25(1): 135-141
- [5] ZENG N B, YANG Z J, ZHANG Z F, et al. Comparative transcriptome combined with proteome analyses revealed key factors involved in alfalfa (*Medicago sativa*) response to waterlog-

- ging stress [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(6):1359
- [6] TIRRY N, KOUCHOU A, EL OMARI B, et al. Improved chromium tolerance of *Medicago sativa* by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2021, 19(1):149
- [7] LI G, MA J W, YIN J L, et al. Identification of reference genes for reverse transcription-quantitative PCR analysis of ginger under abiotic stress and for postharvest biology studies [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13:893495
- [8] GACHON C, MINGAM A, CHARRIER B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? [J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(402):1445-1454
- [9] CASTONGUAY Y, MICHAUD J, DUBÉ M P. Reference genes for RT-qPCR analysis of environmentally and developmentally regulated gene expression in alfalfa [J]. American Journal of Plant Sciences, 2015, 6(1):132-143
- [10] 谢程程, 马均, 李璟, 等. 不同浓度褪黑素缓解狗牙根铅胁迫实时荧光定量PCR内参基因的筛选[J]. 草业科学, 2025, 42(1):119-128
- XIE C C, MA J, LI J, et al. Selection of quantitative real-time reverse transcription-PCR reference genes in lead-stressed bermudagrass roots treated with different concentrations of melatonin [J]. Pratacultural Science, 2025, 42(1):119-128
- [11] 邓嘉硕, 冯程, 张泷昊, 等. 不同组织与逆境胁迫下茄子 qRT-PCR 内参基因筛选[J]. 中国蔬菜, 2024(8):37-46
- DENG J S, FENG C, ZHANG L H, et al. Screening of eggplant qRT-PCR internal reference genes under different tissues and adversity stresses [J]. China Vegetables, 2024(8):37-46
- [12] SHI K, DONG H B, DU H L, et al. The chromosome-level assembly of the wild diploid alfalfa genome provides insights into the full landscape of genomic variations between cultivated and wild alfalfa [J]. Plant Biotechnology Journal, 2024, 22(6):1757-1772
- [13] CHEN H T, ZENG Y, YANG Y Z, et al. Allele-aware chromosome-level genome assembly and efficient transgene-free genome editing for the autotetraploid cultivated alfalfa [J]. Nature Communications, 2020, 11:2494
- [14] 付媛媛, 穆春生, 高洪文, 等. 紫花苜蓿 18S rRNA 基因的克隆及内参基因表达稳定性评价[J]. 植物生理学报, 2014, 50(12):1809-1815
- FU Y Y, MU C S, GAO H W, et al. Cloning of 18S rRNA gene and stability evaluation of reference genes in *Medicago sativa* [J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(12):1809-1815
- [15] 张薇, 崔为体, 段星亮, 等. UV-B 胁迫下紫花苜蓿 qRT-PCR 内参基因的筛选[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(2):248-254
- ZHANG W, CUI W T, DUAN X L, et al. Reference gene selection for qRT-PCR normalization in alfalfa under UV-B irradiation [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2015, 38(2):248-254
- [16] LIU Q N, WANG B J, XU W, et al. Genome-wide investigation of the PIF gene family in alfalfa (*Medicago sativa* L.) expression profiles during development and stress [J]. BMC Genomic Data, 2024, 25(1):79
- [17] 陈小芳, 徐化凌, 王瑞香, 等. 9 个紫花苜蓿品种对淹水胁迫的响应及耐涝性评价[J]. 草原与草坪, 2024, 44(2):155-163
- CHEN X F, XU H L, WANG R X, et al. Effects of flooding stress on biological characteristics of different alfalfa varieties and evaluation of their waterlogging tolerance [J]. Grassland and Turf, 2024, 44(2):155-163
- [18] ZHANG Q, LIU X F, ZHANG Z F, et al. Melatonin improved waterlogging tolerance in alfalfa (*Medicago sativa*) by reprogramming polyamine and ethylene metabolism [J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10:44
- [19] ZHAO H X, ZHAO S Y, CAO Y P, et al. Development of a single transcript CRISPR/Cas9 toolkit for efficient genome editing in autotetraploid alfalfa [J]. The Crop Journal, 2024, 12(3):788-795
- [20] ZHANG L S, SUN Y G, JI J Q, et al. Flavonol synthase gene *MsFLS13* regulates saline-alkali stress tolerance in alfalfa [J]. The Crop Journal, 2023, 11(4):1218-1229
- [21] WANG Q, WU J Z, DI G L, et al. Identification of cold tolerance transcriptional regulatory genes in seedlings of *Medicago sativa* L. and *Medicago falcata* L. [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(19):10345
- [22] PU J, LI M Y, MAO P, et al. Genome-wide identification of the Q-type C₂H₂ transcription factor family in alfalfa (*Medicago sativa*) and expression analysis under different abiotic stresses [J]. Genes, 2021, 12(12):1906
- [23] 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
- [24] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ØRNTØFT 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
- [25] 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
- [26] PARK H J, SHABASHVILI D, NEKORCHUK M D, et al. Retention in endoplasmic reticulum 1 (RER1) modulates amyloid- β (A β) production by altering trafficking of γ -secretase and amyloid precursor protein (APP) [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(48):40629-40640
- [27] 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]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=CYCP20240517001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>, 2024-05-22/2025-04-14
- YUE W N, XU T Y, MIAO J M, et al. Screening of reference genes in different tissues and hormone treatments of alfalfa [J/OL]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=CYCP20240517001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>, 2024-05-22/2025-04-14
- [28] 刘绵学, 伏毅, 王艳, 等. Co 胁迫下紫花苜蓿 HPT 基因的表达调控研究 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(12):2713-2720
- LIU M X, FU Y, WANG Y, et al. Study on HPT gene expression regulation of *Medicago sativa* under cobalt stress [J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(12):2713-2720
- [29] XIE F L, XIAO P, CHEN D L, et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs [J]. Plant Molecular Biology, 2012, 80(1):75-84