

低磷胁迫下海南油茶实时荧光定量 PCR 内参基因筛选及验证

王 潇, 杨程婷, 林 岑, 王 健, 李 晶*

海南大学热带农林学院/海南省热带特色花木资源生物学重点实验室, 海南儋州 571737

摘 要: 低磷 (inorganic phosphate, Pi) 胁迫是一种常见的非生物胁迫, 对植物的生长发育及生理代谢过程产生不利影响。海南油茶多生长在低磷环境中, 是特异地域小种, 具有区别于内地普通油茶的独特遗传特性。本研究以海南热带油茶—海大油茶 4 号 (H4) 为材料, 筛选适合在低磷胁迫下用于实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析的最佳内参基因。以低磷处理不同时间点的 H4 的根和叶组织为材料, 使用 qRT-PCR 检测 6 个候选内参基因 *EF1a1*、*GAPDH*、*Actin*、*UBQ*、*ETIF3H*、*TUB2* 的表达水平, 并采用 ΔCt 、geNorm、NormFinder、BestKeeper 软件和 RefFinder 在线分析工具对各内参基因的稳定性进行综合评价, 确定 *ETIF3H* 为最佳内参基因。以 *ETIF3H* 为内参基因, 对 3 个低磷响应基因进行表达水平验证, 结果显示目的基因均响应低磷且差异表达, 表明 *ETIF3H* 适合作为低磷胁迫条件下基因差异表达检测的内参基因。本研究为低磷胁迫下 H4 油茶的转录本标准化提供了合适的参考基因, 有利于后续对海南油茶中低磷响应基因的差异表达进行研究。

关键词: 海南油茶; 低磷胁迫; qRT-PCR; 内参基因

中图分类号: S794.4

文献标志码: A

Screening and Verification of Reference Genes for qRT-PCR Analysis in *Camellia hainanica* under Low Phosphorus Stress

WANG Xiao, YANG Chengting, LIN Cen, WANG Jian, LI Jing*

School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / Key Laboratory of Germplasm Resources of Tropical Special Ornamental Plants of Hainan Province, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: Plants are prone to low inorganic phosphorus (Pi) abiotic stress, which has adverse effects on the growth, development and physiological metabolic processes. *Camellia hainanica*, a local variety in Hainan, mostly grows in low-phosphorus environments. *C. hainanica* has unique genetic characteristics that distinguish it from *C. oleifera*. In this study, a tropical cultivar Haida Oil-tea 4 (H4) was used as the research object to screen reference genes suitable for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis of *C. hainanica* under low Pi stress. The expression levels of six candidate reference genes, *EF1a1*, *GAPDH*, *Actin*, *UBQ*, *ETIF3H* and *TUB2*, were detected by qRT-PCR. The stability of each reference gene was comprehensively evaluated using ΔCt , geNorm, NormFinder, BestKeeper software and RefFinder online analysis tools, and *ETIF3H* was identified as the optimal reference gene. Using *ETIF3H* as the reference gene, we validated the expression levels of three low Pi responsive genes. The results showed that the target genes were differentially expressed in response to low Pi, indicating that *ETIF3H* is suitable as a reference gene for detecting gene differential expression under low Pi stress conditions. This work would provide appropriate reference genes for transcript normalization in H4 under low Pi stress, which will facilitate subsequent study of phosphorus signal-response gene expression in *C. hainanica*.

Keywords: *Camellia hainanica*; low phosphorus stress; qRT-PCR; reference gene

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.01.017

收稿日期 2025-10-02; 接受日期 2025-10-27

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32360086, No. 32000435); 海南省自然科学基金项目 (No. 324MS010)。

作者简介 王 潇 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子植物育种。*通信作者 (Corresponding author): 李 晶 (LI Jing), E-mail: lijing8311@hainanu.edu.cn。

油茶 (*Camellia oleifera*) 隶属于山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia*)，是我国特有的木本油料树种。油茶种仁含油率为 40%~60%，富含油酸、亚油酸等不饱和脂肪酸，特别是油酸含量在 80%以上，具有较高的营养价值^[1-3]。

海南油茶 (*C. hainanica*) 是特异地理小种，在海南特殊的气候环境条件下生长的十倍体海南油茶具有区别于其他地区油茶的生长和产油特性^[4]。相比其他地区油茶，海南油茶的茶籽油因富含角鲨烯、谷甾醇和维生素 E 等营养物质而具有更高的品质和商业价值^[5]。油茶产油品质和产量与生长环境密切相关，海南油茶生长的酸性红壤中有效磷含量低，致使油茶经常处于低磷胁迫环境中^[6-8]。低磷胁迫是限制油茶产量和品质的重要环境因素^[9]。对海南油茶中低磷胁迫响应的基因表达及功能进行研究，对于培育耐低磷油茶品种、提高油茶在低磷环境下的适应性有重要意义。

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术凭借其灵敏度高、特异性强、定量准确等优势，成为研究基因表达水平的常用手段^[10]。用于 qRT-PCR 的内参基因通常在不同组织、不同处理条件下表达相对稳定，以对目标基因的表达量进行标准化校正。然而，试验材料、处理条件以及植物组织的差异，往往导致内参基因表达稳定性出现变化。如在茶树 (*C. sinensis*) 中发现，不同生物胁迫条件下的最适内参基因不同^[11]。*GAPDH* 和 *Actin* 是苜蓿 (*Medicago sativa*) 中常用的内参基因，然而有研究发现 *GAPDH* 和 *Actin* 在某些非生物胁迫下并不是苜蓿最合适的内参基因^[12]。因此，针对特定的研究对象和试验条件，筛选稳定的内参基因是保障 qRT-PCR 结果准确性和可靠性的前提。

目前，关于油茶的研究主要集中在种质资源评价、栽培技术优化、油脂成分分析等方面^[13]，而对油茶，尤其是热带油茶耐低磷的基因表达调控机制的研究还比较少。筛选热带油茶低磷胁迫下表达稳定的内参基因有助于进一步开展磷信号响应基因表达调控的研究。

本研究以十倍体热带油茶—海大油茶 4 号 (H4) 的根和叶组织为试验材料，在低磷胁迫处理不同时间点检测 6 个候选内参基因 *EF1a1*、*GAPDH*、*Actin*、*UBQ*、*ETIF3H*、*TUB2* 的表达，分别使用 ΔCt 、geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 分析方法来评估基因表达稳定性，并通过 RefFinder 在线工具对筛选到的内参基因进行综

合评价，得出 H4 在低磷胁迫下的 qRT-PCR 最佳内参基因为 *ETIF3H*。以 *ETIF3H* 为内参基因能够检测到 3 个低磷胁迫响应基因的差异表达，进一步验证了 *ETIF3H* 作为内参基因的可靠性。本研究为检测热带油茶低磷胁迫响应基因表达及进一步的功能研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所使用植物材料为海南推广良种海大油茶 4 号 (H4)。选取生长状态良好、长势一致的一年生 H4 油茶扦插苗，以蛭石：珍珠岩=1：1 为基质，种植在口径为 12 cm，高为 14 cm 的两侧及底部透气塑料花盆中。采用霍格兰完全营养液 (NS1020，北京酷来搏生物科技有限公司，磷浓度为 1 mmol/L)，遮雨露天培养。每 3 d 浇 1 次营养液，每盆 200 mL，天气炎热时傍晚浇蒸馏水 100 mL，以保证苗木水分需求。低磷处理采用改良型霍格兰营养液 (NS1020-LP，北京酷来搏生物科技有限公司，磷浓度为 5 μ mol/L)。处理前，采用蒸馏水多次浇淋的方式对植株根部及基质进行充分冲洗，以有效清除残留的全磷营养液。低磷处理 0、3、7 d 后，取扦插后生长出的油茶不定根系和新生叶组织用于后续试验。以低磷处理 0 d 的样品为对照 (CK)，每个时间点设置 3 个生物学重复。油茶组织用去离子水清洗干净后擦干，液氮速冻后用于总 RNA 提取。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成 使用 RNA prep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (DP441，天根生化科技有限公司) 进行总 RNA 提取，使用 Prime ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser [RR047A，宝生物工程 (大连) 有限公司] 去除基因组 DNA，并以 1 μ g RNA 为模板反转录合成 cDNA 第一链。使用 KAIAO 超微量分光光度计 (K5500，北京凯奥科技发展有限公司) 检测 RNA 浓度，1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 纯度。

1.2.2 候选内参基因引物设计及特异性验证 内参基因的引物序列信息见表 1。使用 Primer Premier 5 软件设计特异引物，以 H4 油茶各处理样品的 cDNA 为模板，对内参基因进行 PCR 扩增并进行 PCR 产物测序。将获得的基因序列提交至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行序列比对以确定扩增产物的特异性。

表 1 候选内参基因的引物信息

Tab. 1 Primer information of candidate reference genes

基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物大小 Product size/bp	参考文献 Reference
<i>EF1a1</i>	F: CAAAGAAGGGTGCCAAGTGA R: ACCAAACAACCGACCTACGA	128	宋志波等 ^[14]
<i>GAPDH</i>	F: CTACTGGAGTTTTCACCGA R: TAAGACCCTCAACAATGCC	230	张宸辉等 ^[15]
<i>Actin</i>	F: GCTAGTGGTCGTACAAGTGGTAT R: GTCAAGACGGAGGATAGCGT	108	自行设计
<i>UBQ</i>	F: GTGTCGGGGTCAGGTAAG R: CTGGAGGTTTGAAAGGATA	202	宋志波等 ^[14]
<i>ETIF3H</i>	F: GACACCTTGGGAGGACTTTG R: GTGGATAATAATACTGTTGGATGG	150	宋志波等 ^[14]
<i>TUB2</i>	F: GGACACTGTTGTAGGGTTCA R: TTCAATGCTGTTGGAGGG	154	宋志波等 ^[14]

1.2.3 qRT-PCR 参照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒 (Q711, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 说明书, 使用荧光定量 PCR 仪 (Quant Gene 9600, 杭州博日科技有限公司) 进行 3 步法荧光定量, 反应体系: 2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix 7.5 μL, 正反引物各 0.3 μL, cDNA 1.9 μL, ddH₂O 5 μL, 总反应体系 15 μL。反应条件: 94 ℃变性 30 s; 94 ℃变性 20 s, 55 ℃退火 15 s, 72 ℃延伸 15 s, 40 个循环; 熔解曲线反应 65 ℃孵育 5 s, 缓慢升温至 95 ℃并保持 50 s, 持续采集荧光信号, 完成产物的完全变性与熔解曲线数据采集。

1.2.4 引物扩增效率计算 以反转录合成 cDNA 第一链为模板, 以 5 倍梯度稀释 (5⁻¹、5⁻²、5⁻³、5⁻⁴、5⁻⁵) 后进行 qRT-PCR, 以每个样品的 Ct 作为标准曲线的 Y 轴, 稀释浓度的 lg 值为 X 轴, 绘制标准曲线, 得出斜率 (-K) 与相关系数, 根据公式 $E=10^{(-1/-K)}-1$, 计算得出扩增效率 (E)。从 qRT-PCR 程序导出熔解曲线。

1.2.5 结果分析及稳定性评价 各样品 Ct, 通过 ΔCt、geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 4 种分析方法分析数据结果, 采用 RefFinder 在线分析工具综合评价 4 种软件分析结果筛选最稳定表达的内参基因。ΔCt 法分析具体步骤是将该基因所有样品的 Ct 减去在所有样品中最小的 Ct (表达量最高), 从而得到 ΔCt, 在 Excel 软件中利用公式 STDEV.S 比较不同样本中 ΔCt 的变异程度, 以此评估基因表达稳定性, ΔCt 波动越小, 基因表达

越稳定^[16-17]。

geNorm 软件^[18]会给出基因稳定性值 (M)、标准化因子 (NF) 及最优内参基因数量评估 ($V_{n/n+1}$), 计算过程为: 首先将 qRT-PCR 的 Ct 转换为 ΔCt, 再计算出相对表达量 $2^{-\Delta Ct}$, 将计算出的相对表达量导入 geNorm 软件。计算得出的基因稳定值 (M) 越小代表基因表达越稳定。

NormFinder 程序同 geNorm 程序分析相似, 在使用前需将 Ct 转化为相对表达量 $2^{-\Delta Ct}$, 再通过该程序计算得到候选内参基因的表达稳定值 (M), M 越小代表基因表达越稳定^[19]。

BestKeeper 是基于 Excel 软件的工具, 最多能比较 100 个样品中 10 个内参基因和 10 个目标基因的表达水平。使用 BestKeeper 分析内参基因稳定性可以直接将每个内参基因原始 Ct 输入到软件, 根据每个内参基因的 Ct, 计算得到的几何平均值 (GM)、算术平均值 (AM), 用于反映数据的集中趋势; 最小值 (Min) 和最大值 (Max), 展示数据的取值范围; 标准差 (SD) 衡量数据离散程度, SD 越大, 表达稳定性越差, 一般认为 SD 大于 1 时基因稳定性不佳; 变异系数 (CV), 即标准差与均值的百分比, 用于更直观地比较不同基因数据的离散程度。CV 与 SD 越低, 该基因稳定性越高^[20]。

ReffFinder (<http://www.heartcure.com.au/reffinder/>) 综合前面 4 种计算方法的排名, 为每个基因在不同方法中的排名分配一个适当的权重。通过计算这些权重的几何平均值, 得到每个候选内参基因的最终综合排名^[21]。

1.2.6 内参基因稳定性验证 选择 2 个响应低磷信号且表达上调的紫色酸性磷酸酶 (purple acid phosphatase) 基因 *PAP10a* 和 *PAP3*, 以及 1 个在低磷处理时表达下调的基因 *PHOSPHATE 2* (*PHO2*) 用于验证筛选出的内参基因的稳定性。对 H4 油茶进行低磷处理, 对处理 0、12、24 h 的叶片和根组织取样并提取总 RNA。以鉴定到的最优内参基因作为标准化因子进行 qRT-PCR, 用 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 法分析这 3 个目的基因在根部和叶片中的相对表达量, 设置 3 个重复, 反应体系和程序如 1.2.3 所述, 引物序列信息见表 2。

1.3 数据处理

采用 Origin 2024 软件作图, 数据分析使用 IBM SPSS Statistics 27 软件完成。差异显著性分析通过单因素方差分析进行, 并采用邓肯 (Duncan)

表 2 低磷响应基因引物信息
Tab. 2 Primer information for low Pi response genes

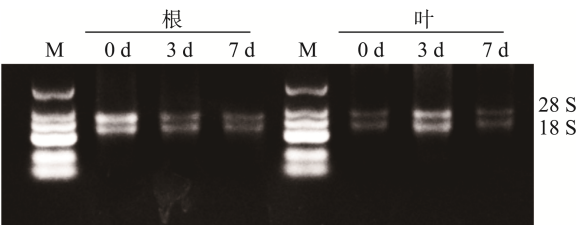
基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物大小 Product size/bp	参考文献 Reference
<i>PAP10a</i>	F: TTTGGTCTCATAGGGGATCTCG	93	自行设计
	R: CAGTAATGCTTGTCTTTTCGCT		
<i>PAP3</i>	F: TACACAGTTTGTGGCAACCA	126	叶思诚 ^[22]
	R: TTCCACGATTTCTGCATTGA		
<i>PHO2</i>	F: TTCTCCAAGTTCCTATCCCTCCA	208	自行设计
	R: TGTTCCTCCACGAATGCCTC		

法进行多重比较检验， $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 低磷处理不同时间点 H4 油茶总 RNA 质量检测

分别提取低磷处理 0、3、7 d 的 H4 油茶根和叶组织的总 RNA，琼脂糖凝胶电泳检测结果显示，各样品的 RNA 主带清晰，28S RNA 和 18S RNA 的条带无弥散拖尾（图 1）。使用分光光度计检测各样品总 RNA 浓度在 233.4~295.0 ng/μL 之间， A_{260}/A_{280} 的比值在 1.8~2.0 之间（表 3）。这些结果表明各样品总 RNA 无明显降解，纯度较高，可以用于后续试验。



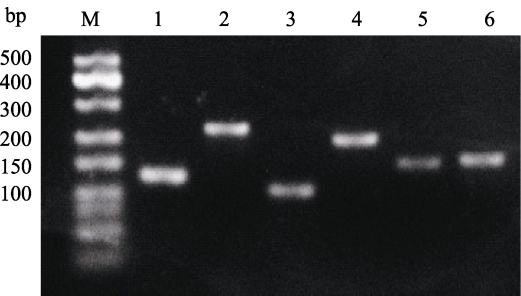
M: DL2000 DNA marker.
图 1 低磷处理不同时间点 H4 油茶根和叶总 RNA 电泳图
Fig. 1 Electrophoresis of total RNA from leaves and roots under low Pi stress in H4

表 3 低磷处理不同时间点 H4 油茶根和叶总 RNA 浓度
Tab. 3 Quantification of total RNA in roots and leaves of H4 under low Pi treatment

低磷胁迫时间 Low Pi treatment time/d	组织 Tissue	RNA 浓度 RNA concentration (ng·μL ⁻¹)	A_{260}/A_{280}
0	根	288.8	1.940
	叶	241.9	1.905
3	根	233.4	1.958
	叶	295.0	1.922
7	根	241.7	1.965
	叶	290.0	1.922

2.2 引物特异性分析以及引物扩增效率计算

以 H4 油茶 cDNA 为模板，分别使用 6 对候选内参基因引物进行 PCR 扩增，扩增产物经 1% 琼脂糖电泳检测（图 2），结果表明，所有引物扩增条带清晰单一，且片段大小与预期结果一致。使用这 6 对引物分别进行 qRT-PCR，其熔解曲线均产生单一的熔解峰，表明引物特异性良好（图 3）。所有候选内参基因的引物标准曲线相关系数 $R^2\geq 0.99$ ，并且扩增效率为 94.3%~106.9%（表 4），可用于后续 qRT-PCR 试验。



M: DL500 DNA marker; 1: *EF1a1*; 2: *GAPDH*; 3: *Actin*; 4: *UBQ*; 5: *ETIF3H*; 6: *TUB2*.
图 2 RT-PCR 检测 6 对引物的特异性
Fig. 2 Specificity detection of 6 pairs of primers using RT-PCR

2.3 候选内参基因稳定性分析

2.3.1 候选内参基因 Ct 分布 在低磷处理条件下不同组织的内参基因表达水平可能存在差异。对低磷处理不同时间的 H4 油茶根和叶中 6 个候选内参基因的 Ct 进行分析，结果表明，不同候选内参基因的离散程度有所不同（图 4）。其中，*Actin* 基因的 Ct 分布较为集中，离散程度较低，即在供试样本中表达相对稳定；而 *GAPDH* 基因的 Ct 离散程度较高，表达较不稳定性。所有内参基因的平均 Ct 在 19.47~23.69 之间，*Actin* 的表达水平最高，平均 Ct 为 19.47，*UBQ* 的表达水平最低，平均 Ct 为 23.69。

2.3.2 ΔCt 分析 使用 ΔCt 算法来计算候选内参基因在低磷处理前后 Ct 的标准偏差，标准偏差越小则说明其稳定性越好。分析结果显示，在根中标准偏差大小排序为 *TUB2*>*EF1a1*>*Actin*>*GAPDH*>*ETIF3H*>*UBQ*，其中 *UBQ* 为 H4 油茶在低磷处理下根中表达最稳定的内参基因（图 5）。在叶片中标准偏差大小排序为 *EF1a1*>*TUB2*>*GAPDH*>*UBQ*>*Actin*>*ETIF3H*（图 5），*ETIF3H* 为 H4 油茶在低磷处理下叶片中表达最稳定的内参基因。

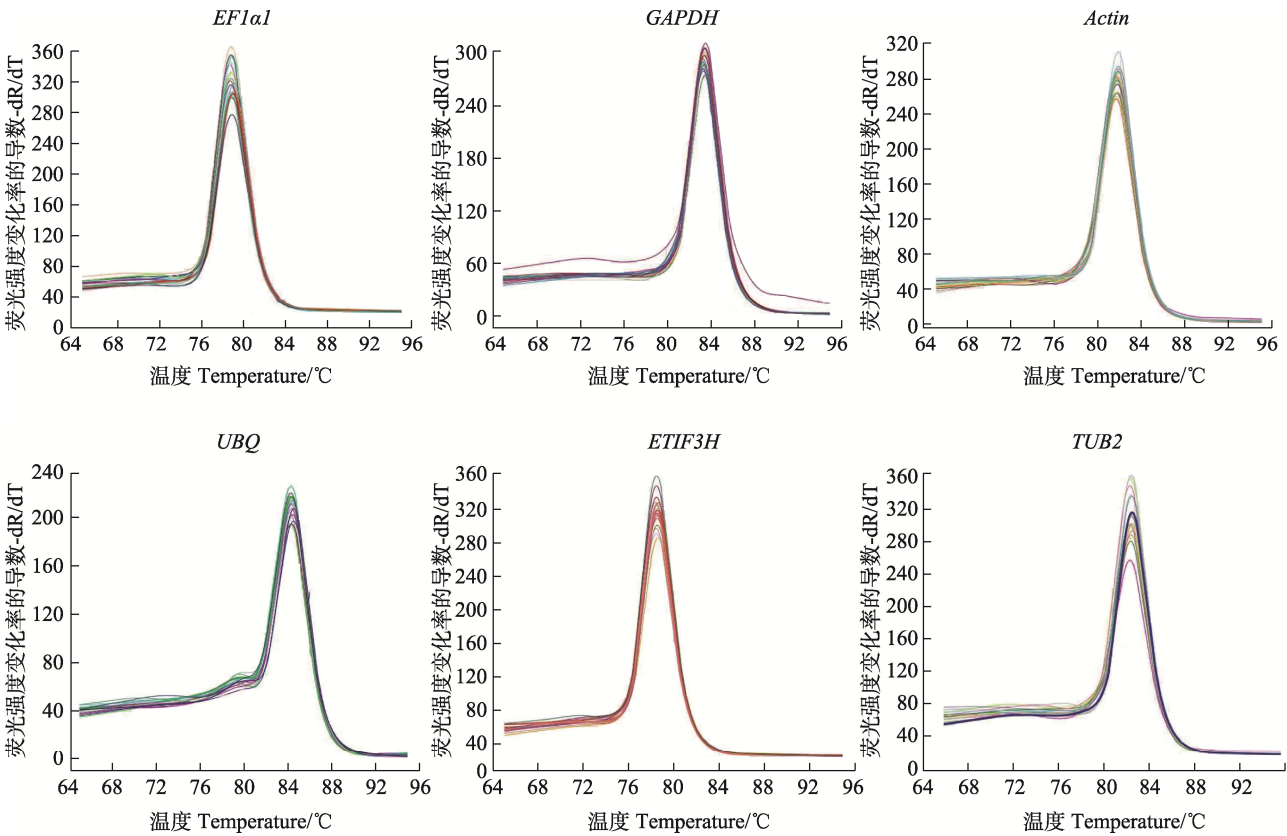


图 3 6 个候选内参基因 PCR 产物熔解曲线

Fig. 3 Melting curve of PCR products of 6 candidate reference genes

表 4 候选内参基因的扩增特性
Tab. 4 Amplification characteristics of 6 candidate reference genes

基因名 Gene name	qRT-PCR 扩增效率 qRT-PCR efficiency/%	相关系数 R^2
<i>EF1a1</i>	96.0	0.99
<i>GAPDH</i>	102.3	0.99
<i>Actin</i>	102.1	0.99
<i>UBQ</i>	100.0	0.99
<i>ETIF3H</i>	106.9	0.99
<i>TUB2</i>	94.3	0.99

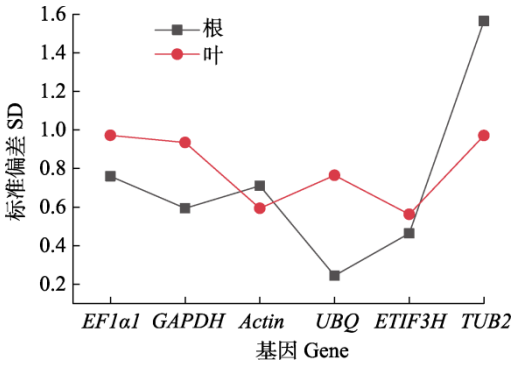


图 5 候选内参基因表达稳定性的 ΔC_t 分析

Fig. 5 Expression stability of candidate reference genes by ΔC_t analysis

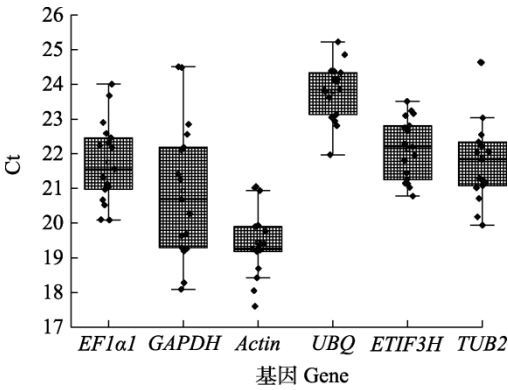


图 4 候选内参基因 C_t 分布

Fig. 4 C_t distribution of candidate reference genes

2.3.3 geNorm 软件分析 通过 geNorm 软件计算候选内参基因的表达稳定性 (M), 其中 M 越小代表内参基因的稳定性越好。通常表达稳定的内参基因 $M < 1.5$ 。geNorm 分析结果表明, 在根和叶片中所有的候选内参 $M < 1.5$, 根部 M 大小排序为 $TUB2 > UBQ > GAPDH > EF1a1 > Actin > ETIF3H$, 其中 $ETIF3H$ 为根部表达最稳定的内参基因(图 6)。叶片中 M 大小排序为 $EF1a1 > GAPDH > TUB2 > Actin > ETIF3H > UBQ$, 其中 UBQ 为叶片中表达最稳定的内参基因(图 6)。

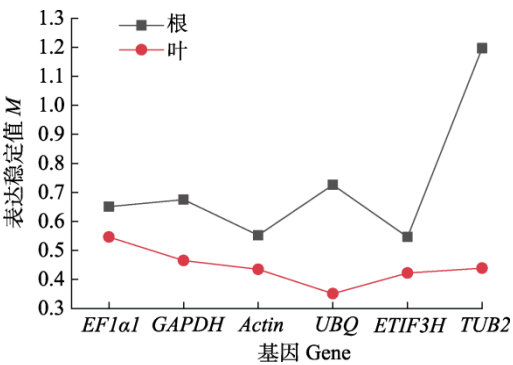


图 6 geNorm 分析候选内参基因表达稳定性

Fig. 6 geNorm analysis of candidate reference gene expression stability

2.3.4 NormFinder 软件分析 NormFinder 评估候选基因稳定性原理与 geNorm 分析类似， M 越小代表候选内参基因的稳定性越高。结果表明在根部中 M 大小排序为 $TUB2>UBQ>GAPDH>EF1a1>ETIF3H=Actin$ ，表达最稳定的是 $ETIF3H$ 和 $Actin$ （图 7）。叶片中 M 大小排序为 $EF1a1>GAPDH>Actin>TUB2>ETIF3H>UBQ$ ，表达最稳定的为 UBQ （图 7）。

2.3.5 BestKeeper 软件分析 BestKeeper 软件通过计算出不同处理样品间 Ct 的 CV 与 SD 来筛选

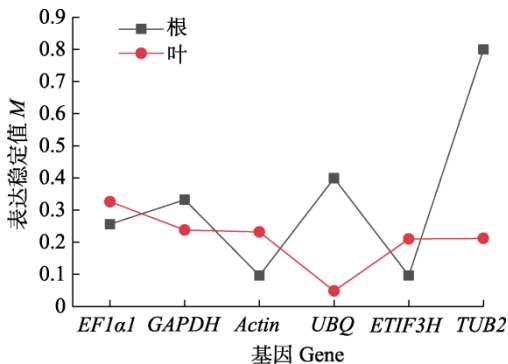


图 7 NormFinder 分析候选内参基因表达稳定性

Fig. 7 NormFinder analysis of candidate reference gene expression stability

最佳内参基因，其中 SD 与 CV 越小则表明内参基因的表达稳定性越好。BestKeeper 计算结果表明在根和叶片中稳定性最好的均是 $ETIF3H$ （图 8）。

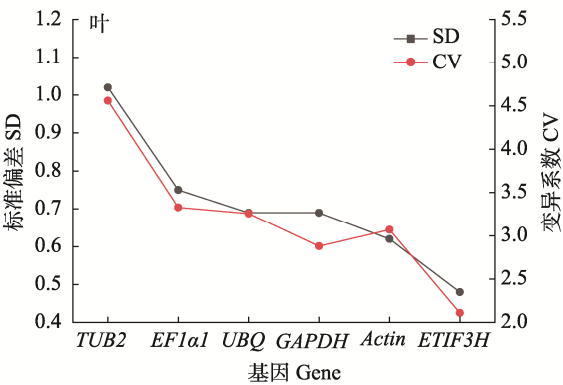
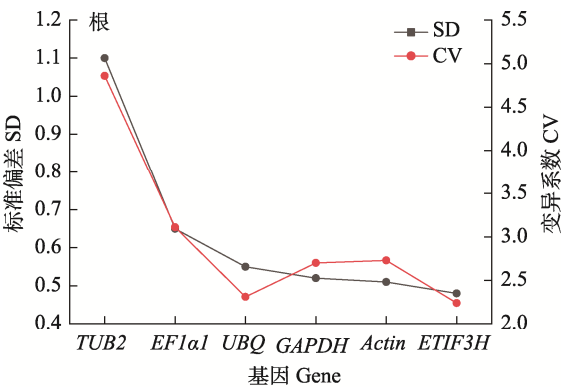


图 8 BestKeeper 分析候选内参基因表达稳定性

Fig. 8 BestKeeper analysis of candidate reference gene expression stability

2.3.6 Refinder 综合评价 由于 ΔCt 、geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件对内参基因的稳定性评估存在差异，本研究通过在线工具 RefFinder 计算候选基因在 4 种算法中排名的几何平均值得出综合排名，几何平均值越小，基因表达稳定性越好。结果表明，在根部（表 5）和叶片（表 6）中， $ETIF3H$ 均为表达最稳定的候选内参基因。

表 5 RefFinder 软件综合分析结果（根）

Tab. 5 Comprehensive analysis results of RefFinder software (root)

基因 Gene	ΔCt		Genorm		Normfinder		BestKeeper		RefFinder 综合 分析排序 RefFinder comprehen- sive analysis ranking
	标准偏差 SD	排序 Ranking	表达稳定值 M	排序 Ranking	表达稳定值 M	排序 Ranking	标准偏差 SD	排序 Ranking	
<i>EF1a1</i>	0.760	5	0.651	3	0.256	3	0.65	5	3
<i>GAPDH</i>	0.594	3	0.675	4	0.332	4	0.52	3	5
<i>Actin</i>	0.711	4	0.552	2	0.096	1	0.51	2	2
<i>UBQ</i>	0.245	1	0.726	5	0.399	5	0.55	4	4
<i>ETIF3H</i>	0.464	2	0.546	1	0.096	2	0.48	1	1
<i>TUB2</i>	1.565	6	1.197	6	0.800	6	1.10	6	6

表 6 RefFinder 软件综合分析结果 (叶)

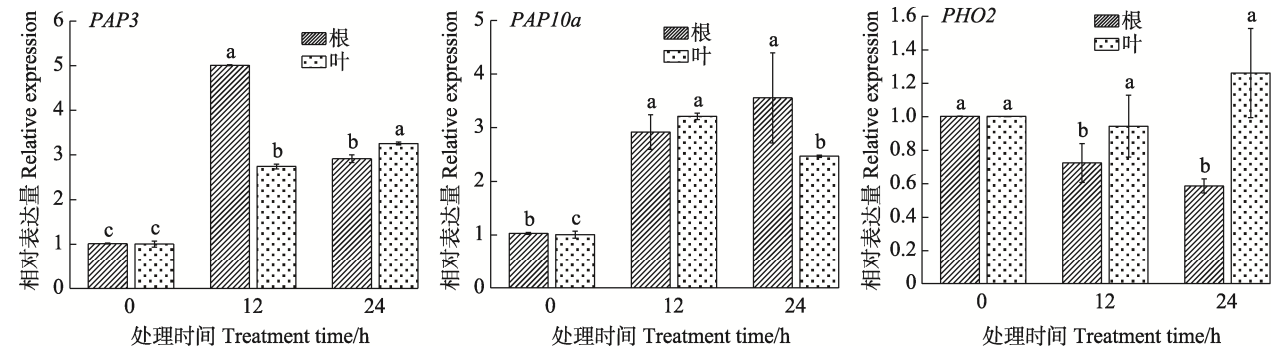
Tab. 6 Comprehensive analysis results of RefFinder software (leaf)

基因 Gene	ΔCt		Genorm		Normfinder		BestKeeper		RefFinder 综合 分析排序 RefFinder comprehensive analysis ranking
	标准偏差 SD	排序 Ranking	表达稳定值 <i>M</i>	排序 Ranking	表达稳定值 <i>M</i>	排序 Ranking	标准偏差 SD	排序 Ranking	
<i>EF1a1</i>	0.972	6	0.546	6	0.326	6	0.75	5	5
<i>GAPDH</i>	0.935	4	0.465	5	0.238	5	1.02	6	6
<i>Actin</i>	0.594	2	0.435	3	0.232	4	0.62	2	4
<i>UBQ</i>	0.765	3	0.351	1	0.048	1	0.69	4	3
<i>ETIF3H</i>	0.563	1	0.422	2	0.210	2	0.48	1	1
<i>TUB2</i>	0.971	7	0.439	4	0.212	3	0.69	3	2

2.4 内参基因稳定性验证

以 *ETIF3H* 为参照, 分别检测低磷处理前后 H4 油茶根与叶片中 *PAP10a*、*PAP3* 和 *PHO2* 的表达水平。在根中, *PAP10a* 在低磷处理 12 h 和 24 h 表达显著上调, 而 *PAP3* 表达水平呈先上升后下降的趋势, 在 12 h 时表达最高 (图 9), 与前人研究结果一致^[22]。*PHO2* 基因表达随低磷胁迫时间显著下调, 与拟南芥、玉米研究结果一致^[23-24]。在叶片中, *PAP10a* 表达水平呈先上升后下降的趋势, 低磷胁迫 12 h 时表达最高, *PAP3* 基因表达

则随处理时间延长而持续上调。而 *PHO2* 基因表达未出现显著差异 (图 9)。这些结果表明 *ETIF3H* 作为内参基因在 qRT-PCR 检测低磷响应基因表达方面的可靠性。同时, 从表型变化来看 (图 10), 低磷培养 30 d 的海南油茶植株与全磷培养的相比, 油茶的侧根更为发达, 这些表型差异与上述 *PAP10a*、*PAP3*、*PHO2* 基因在低磷胁迫下的表达模式相呼应^[25], 进一步说明基因表达与表型的一致性, 为解释低磷胁迫下表型出现的原理提供依据。



不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments ($P<0.05$).

图 9 低磷响应基因在 H4 油茶根部、叶片中的表达水平验证

Fig. 9 Verification of expression levels of low Pi responsive genes in roots and leaves of H4



图中比例尺为 5 cm。
Scale bars were 5 cm.

图 10 H4 全磷培养 (A) 和低磷胁迫 (B) 30 d 的表型
Fig. 10 Phenotypes of H4 under total Pi (A) and low Pi (B) conditions for 30 days

3 讨论

qRT-PCR 具有操作简便、准确度高、能检测到痕量模板等优点, 广泛应用于基因表达定量检测研究领域。qRT-PCR 相对定量结果的准确性依赖于合适的内参基因的选择^[26]。内参基因一般选择表达水平不受研究条件影响且在多种样本间恒定表达的管家基因。然而, 在胁迫处理条件下和不同的植物组织中, 内参基因的表达水平可能存在差异。筛选出特定试验条件下稳定表达的内参基因是保证 qRT-PCR 试验结果准确性和可比性的必要前提^[27]。

本研究选择了 6 个常见的候选内参基因 (*EF1a1*、*GAPDH*、*Actin*、*UBQ*、*ETIF3H*、*TUB2*), 在低磷处理不同时间点 (0、3、7 d) 和不同组织部位 (根和叶) 共 6 种试验条件下, 选用 ΔCt 、geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 4 种算法并结合 RefFinder 在线工具对候选内参基因进行了稳定性分析, 筛选出低磷胁迫下热带油茶品种——海大油茶 4 号的根和叶组织中表达最稳定的内参基因 *ETIF3H*。

本研究采用多种算法对候选内参基因进行稳定性评估的结果显示, *ETIF3H* 在不同软件中计算出的稳定性均较高, 但不同算法对同一组候选内参基因的稳定性排序有所不同。使用 ΔCt 分析得出 *UBQ* 在 H4 油茶根部稳定性最高, 而在叶片中 *ETIF3H* 表达最稳定。通过 geNorm 软件分析得出的结果为 *ETIF3H* 在根部表达最稳定, 而在叶片中表达最稳定的内参基因是 *UBQ*。NormFinder 分析显示 *ETIF3H* 和 *Actin* 在根部、*UBQ* 在叶片中稳定性最佳; BestKeeper 软件则认为 *ETIF3H* 在根和叶片均表达最稳定。不同软件计算得出的基因稳定性结果存在差异可能与统计软件算法不同有关, 类似的差异也存在于对不同非生物胁迫下水稻和大豆^[28-29]、不同木本油料作物之间^[30]和不同生物胁迫下茶树^[11]等植物稳定内参基因的筛选研究中。为合理评价候选内参基因表达的稳定性, 本研究还采用 RefFinder 在线软件综合分析了低磷处理过程中候选内参基因在 H4 油茶根和叶组织中的表达稳定性, 以避免单一算法的局限性, 更全面、准确地筛选出稳定的内参基因 *ETIF3H*。

作为真核翻译起始因子 3 亚基 H (eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H), *ETIF3H* 编码产物参与蛋白质翻译起始过程, 在细胞基础代谢中起到关键作用^[31]。前人在亚麻 (*Linum usitatissimum*) 的缺磷胁迫研究中, 同样通过多算法联合分析 (如 geNorm、NormFinder 等) 得出 *ETIF3H* 为表达最稳定的内参基因^[32-33]。*Actin* 和 *GAPDH* 是常用的内参基因^[12, 14, 34], 但在本研究中, 虽然 *Actin*、*GAPDH* 也具有较好的扩增效果和稳定性, 但在低磷胁迫下的 H4 油茶根和叶组织中, *ETIF3H* 表现更为优异。这也说明不同植物在不同胁迫条件下, 最适内参基因存在差异, 不能简单沿用传统内参基因, 需根据具体研究对象和条件进行筛选。

以 *ETIF3H* 作为内参基因能够检测到 H4 油茶

根和叶片中磷信号响应基因的差异表达。在低磷胁迫 0、12、24 h 分别检测 H4 油茶根和叶片中 *PAP10a*、*PAP3* 和 *PHO2* 的基因表达水平, 结果显示这 3 个基因表现出不同的表达模式。其中, *PAP10a*、*PAP3* 在叶片和根部均迅速响应低磷信号且表达上调。*PHO2* 在 H4 油茶根部随低磷处理时间的延长而下调, 这与 *miR399* 主要在地上部受低磷诱导表达上调, 随后通过韧皮部运输到根中抑制 *PHO2* mRNA 的表达一致^[35]。而在叶片中, 本研究结果显示 *PHO2* 在低磷处理 24 h 内与低磷处理前的表达水平无显著差异。这是否是 H4 油茶特异的表型还需要进一步研究。本研究为后续研究热带油茶低磷胁迫下的分子机制提供可靠内参基因支撑。

致谢 感谢海南大学赖杭桂教授提供海大油茶 4 号作为试验材料。

参考文献

- [1] 陈丰林, 谢海, 游昌乔, 蒋帅, 彭果, 周苹, 郭新红. 我国油茶资源研究与开发利用现状及展望[J]. 生命科学研究, 2021, 25(5): 425-431.
CHEN F L, XIE H, YOU C Q, JIANG S, PENG G, ZHOU P, GUO X H. Current situation and prospect of research, development and utilization of *Camellia oleifera* resources in China[J]. Life Science Research, 2021, 25(5): 425-431. (in Chinese)
- [2] LIN P, WANG K L, WANG Y P, HU Z K, YAN C, HUANG H, YIN H F. The genome of oil-*Camellia* and population genomics analysis provide insights into seed oil domestication[J]. Genome Biology, 2022, 23(1): 14.
- [3] NIU J, OU Q J, CHEN Y Z, WANG Y L, LING P, SONG X Q, FENG X P. Comprehensive evaluation of wild *Camellia oleifera* germplasm for biodiesel production in Hainan island[J]. Industrial Crops and Products, 2025, 232: 121282.
- [4] XU Z G, YUAN D Y, TANG Y C, WU L, ZHAO Y L. *Camellia hainanica* (Theaceae) a new species from Hainan, supported from morphological characters and phylogenetic analysis[J]. Pakistan Journal of Botany, 2020, 52(3): 1025-1032.
- [5] 叶洲辰, 吴友根, 于靖, 张军锋, 杨东梅, 胡新文. 不同产地油茶籽油提取物的抗氧化活性比较分析及其营养评价[J]. 生物技术通报, 2019, 35(10): 80-88.
YE Z C, WU Y G, YU J, ZHANG J F, YANG D M, HU X W. Comparative analysis of antioxidant activities of *Camellia oleifera* oil extracts from different areas and their nutritional assessments[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(10):

- 80-88. (in Chinese)
- [6] 付登强, 杨伟波, 陈良秋, 李艳, 刘立云. 海南油茶林土壤养分状况调查[J]. 热带农业科学, 2013, 33(7): 17-20, 29. FU D Q, YANG W B, CHEN L Q, LI Y, LIU L Y. Soil nutrient status of oil *Camellia* forests in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2013, 33(7): 17-20, 29. (in Chinese)
- [7] 郭照彬, 韦建杏, 郑伟, 王世存, 田乐宇. 海南油茶种质资源研究进展[J]. 林业科技通讯, 2025, 67(3): 1-5. GUO Z B, WEI J X, ZHENG W, WANG S C, TIAN L Y. Research progress of *Camellia oleifera* germplasm resources in Hainan[J]. Forest Science and Technology, 2025, 67(3): 1-5. (in Chinese)
- [8] 刘进平, 周扬, 胡海燕, 吴文婧, 胡新文, 赖杭桂. 热带油茶种质资源综述[J]. 热带林业, 2022, 50(4): 70-76, 66. LIU J P, ZHOU Y, HU H Y, WU W Q, HU X W, LAI H G. Germplasm resources of *Camellia* sp. in tropical area of China[J]. Tropical Forestry, 2022, 50(4): 70-76, 66. (in Chinese)
- [9] CHEN J J, HAN X J, YE S C, LIU L X, YANG B B, CAO Y Q, YAO X H. Integration of small RNA, degradome, and transcriptome sequencing data illustrates the mechanism of low phosphorus adaptation in *Camellia oleifera*[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 932926.
- [10] WAGNER E M. Monitoring gene expression: quantitative real-time RT-PCR[J]. Methods in Molecular Biology, 2013, 1027: 19-45.
- [11] XU W, DONG Y, YU Y, XING Y, LI X, ZHANG X, HOU X, SUN X. Identification and evaluation of reliable reference genes for quantitative real-time PCR analysis in tea plants under differential biotic stresses[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 2429.
- [12] FAN W N, SHI Y Q, SHI P F, YANG Y X, ZHANG M Y. Selection and validation of reference genes in alfalfa based on transcriptome sequence data[J]. Scientific Reports, 2025, 15(1): 6324.
- [13] 谭晓风. 油茶分子育种研究进展[J]. 中南林业科技大学学报, 2023, 43(1): 1-24. TAN X F. Advances in the molecular breeding of *Camellia oleifera*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2023, 43(1): 1-24. (in Chinese)
- [14] 宋志波, 刘敏, 贾宝光, 田雷, 曾艳玲, 周俊琴, 张琳. 油茶总 RNA 的提取与内参基因的初选[J]. 经济林研究, 2014, 32(2): 93-98. SONG Z B, LIU M, JIA B G, TIAN L, ZENG Y L, ZHOU J Q, ZHANG L. RNA extraction and primary screening of reference genes in *Camellia oleifera*[J]. Non-wood Forest Research, 2014, 32(2): 93-98. (in Chinese)
- [15] 张宸辉, 周俊琴, 卢梦琪, 袁军. 油茶低磷响应转录因子 *CoPHR1*、*CoPHR2* 的克隆与表达分析[J]. 植物生理学报, 2020, 56(4): 827-836. ZHANG C H, ZHOU J Q, LU M Q, YUAN J. Cloning and expression analysis of low-phosphorus-responsive transcription factors *CoPHR1* and *CoPHR2* in *Camellia oleifera*[J]. Plant Physiology Journal, 2020, 56(4): 827-836. (in Chinese)
- [16] 吴建阳, 何冰, 杜玉洁, 李伟才, 魏永赞. 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. WU J Y, HE B, DU Y J, LI W C, WEI Y Z. Analysis method of systematically evaluating stability of reference genes using geNorm, NormFinder and BestKeeper[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2017(5): 278-281. (in Chinese)
- [17] 田甜, 李慧, 隋明明, 张富满, 耿乐, 叶冬梅, 白玉娥. 蒙古沙冬青内参基因筛选与验证[J]. 中南林业科技大学学报, 2025, 45(5): 154-165. TIAN T, LI H, SUI M M, ZHANG F M, GENG L, YE D M, BAI Y E. Verification and validation of reference genes in *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2025, 45(5): 154-165. (in Chinese)
- [18] VANDESOMPLE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. Genome Biology, 2002, 3(7): RESEARCH0034.
- [19] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ORNTOFT 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.
- [20] PFAFFL M W, TICHOPAD A, PRGOMET C, NEUVIANS T P. 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.
- [21] XIE F L, WANG J Y, ZHANG B H. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes[J]. Functional & Integrative Genomics, 2023, 23(2): 125-125.
- [22] 叶思诚. 不同油茶无性系对低磷胁迫的响应及其分子基础研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2016. YE S C. Study on the response of different oil-tea (*Camellia oleifera* Abel.) clones to low phosphate stress and its molecular basis[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2016.

- (in Chinese)
- [23] AUNG K, LIN S I, WU C C, HUANG Y T, SU C L, CHIOU T J. *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a non-sense mutation in a microRNA399 target gene[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(3): 1000-1011.
- [24] DU Q, WANG K, ZOU C, XU C, LI W. The *PILNCRI*-miR399 regulatory module is important for low phosphate tolerance in maize[J]. *Plant Physiology*, 2018, 177(4): 1743-1753.
- [25] BHADOURIA J, GIRI J. Purple acid phosphatases: roles in phosphate utilization and new emerging functions[J]. *Plant Cell Reports*, 2022, 41: 33-51.
- [26] HUGGETT J F, DHEDA K, BUSTIN S A, ZUMLA A. Real-time RT-PCR normalisation strategies and considerations[J]. *Genes & Immunity*, 2005, 6(4): 279-284.
- [27] YANG Y J, CAO G H, TANG L L. Selection and validation of reference genes for qRT-PCR normalization in dayflower (*Commelina communis*) based on the transcriptome profiling[J]. *BMC Plant Biology*, 2024, 24(1): 1131.
- [28] 王蕊, 胡绍旺, 刘金凤, 张毓哲, 姜玉石, 刘思言, 史安迪. 大豆不同发育时期及非生物胁迫下实时荧光定量 PCR 内参基因筛选[J]. *吉林农业大学学报*, 2024, 46(1): 17-27.
- WANG R, HU S W, LIU J F, ZHANG Y Z, JIANG Y S, LIU S Y, SHI A D. Screening of reference genes under abiotic stress and different development stages of soybean by real-time fluorescence quantitative PCR[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2024, 46(1): 17-27. (in Chinese)
- [29] XIE Y J, LE K Y, CHEN X Y, SHEN Q P, QIU X Z, SUN L Q, YU J S. Screening of new reference genes for qRT-PCR normalisation in rice under heat stress[J]. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 2024, 52(1): 1-18.
- [30] 张莞晨, 阮成江, 李景滨, 韩平, 丁健, 刘袞悦, 阮东. 四种木本油料内参基因筛选及 *Actin* 基因时空表达分析[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(14): 4576-4582.
- ZHANG W C, RUAN C J, LI J B, HAN P, DING J, LIU L Y, RUAN D. Screening of reference genes in four woody-oil trees and spatio-temporal expression analysis of *Actin* gene[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(14): 4576-4582. (in Chinese)
- [31] KIM T H, KIM B H, YAHALOM A, CHAMOVITZ D A, VON ARNIM A G. Translational regulation via 5' mRNA leader sequences revealed by mutational analysis of the *Ara-bidopsis* translation initiation factor subunit *eIF3h*[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(12): 3341-3356.
- [32] MELNIKOVA N V, DMITRIEV A A, BELENIKIN M S, KOROBAN N V, SPERANSKAYA A S, KUDRYAVTSEVA A V. Identification, expression analysis, and target prediction of flax genotroph microRNAs under normal and nutrient stress conditions[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 399.
- [33] HUIS R, HAWKINS S, NEUTELINGS G. Selection of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.)[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 71.
- [34] WANG H B, WANG J J, JIANG J F, CHEN S M, GUAN Z Y, LIAO Y, CHEN F D. Reference genes for normalizing transcription in diploid and tetraploid *Arabidopsis*[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4(1): 6781.
- [35] PANT B D, BUHTZ A, KEHR J, SCHEIBLE W R. Micro-RNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis[J]. *Plant Journal*, 2008, 53(5): 731-738.