

# 药用蒲公英低温和高温胁迫下内参基因筛选与相关基因表达分析

乔永刚\*, 王勇飞, 曹亚萍, 贺嘉欣, 贾孟君, 李 政, 张鑫瑞, 宋 芸  
(山西农业大学生命科学学院, 山西太谷 030801)

**摘 要:** 为研究不同温度胁迫下药用蒲公英最适内参基因与温度响应相关基因的表达, 分别以低温 (4 °C) 和高温 (38 °C) 胁迫 0、3、6、12、24 和 48 h 共 12 个处理的叶片为材料, 选取 10 个候选内参基因 *18S*、*EF1 $\alpha$* 、*TUB*、*40S*、*GAPDH*、 *$\beta$ -actin*、*ACT11*、*TUA*、*60S* 和 *SKIP*, 利用 RT-qPCR 技术以及 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件评价其稳定性。利用筛选出的最适内参基因对药用蒲公英 12 个温度响应基因 (*AP2/ERF*、*Dof*、*ICE1*、*MYB*、*bZIP*、*NTL6*、*HSF*、*Gols*、*HSP*、*NAC*、*XCT* 和 *WRKY*) 的表达水平进行定量分析。结果显示: 温度胁迫下药用蒲公英最适内参基因为 *18S* 和 *GAPDH*; 药用蒲公英 *AP2/ERF*、*HSF*、*Gols*、*HSP*、*NAC*、*XCT* 基因在低温和高温胁迫下均为先上调后下调表达, *bZIP*、*NTL6* 在温度胁迫下波动变化, *Dof*、*ICE1*、*MYB* 在低温胁迫下先上调后下调表达, 高温胁迫下持续下调表达, *WRKY* 在高温胁迫下表达量远远高于低温胁迫。依据基因表达量推测, 药用蒲公英低温和高温胁迫的响应机制存在差异, *AP2/ERF*、*Dof* 主要响应低温胁迫, *HSF*、*XCT*、*WRKY* 主要响应高温胁迫。

**关键词:** 药用蒲公英; 温度胁迫; 内参基因; 表达分析

**中图分类号:** S 649; Q 786

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2020) 06-1153-12

## Reference Genes Selection and Related Genes Expression Analysis under Low and High Temperature Stress in *Taraxacum officinale*

QIAO Yonggang\*, WANG Yongfei, CAO Yaping, HE Jiabin, JIA Mengjun, LI Zheng, ZHANG Xinrui, and SONG Yun

(College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

**Abstract:** In order to research the optimal reference genes and the responsive genes expression of *Taraxacum officinale* under different temperature stress, the leaves of *Taraxacum officinale* that were treated for 0, 3, 6, 12, 24 and 48 h under low temperature (4 °C) and high temperature (38 °C) were used as material. *18S*, *EF1 $\alpha$* , *TUB*, *40S*, *GAPDH*,  *$\beta$ -actin*, *ACT11*, *TUA*, *60S* and *SKIP* were selected as candidate reference genes, RT-qPCR technology, geNorm, NormFinder and BestKeeper were taken advantage of evaluating the stability. Utilizing the optimal selected reference genes analyzed the expression level of 12 temperature-responsive genes (*AP2/ERF*, *Dof*, *ICE1*, *MYB*, *bZIP*, *NTL6*, *HSF*, *Gols*, *HSP*, *NAC*, *XCT*, *WRKY*). The results showed that, the optimal reference genes were *18S* and

收稿日期: 2020-03-01; 修回日期: 2020-04-17

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1710800)

\* E-mail: sxndqy@163.com

*GAPDH* under different temperature stresses. The expression levels of *AP2/ERF*, *HSF*, *Glos*, *HSP*, *NAC*, *XCT* were firstly up-regulated and then down-regulated during low and high temperature stress. Changes of *bZIP* and *NTL6* were undulant under temperature stresses. *Dof*, *ICE1* and *MYB* were firstly up-regulated and then down-regulated under low temperature stress, but down-regulated continuously under high temperature. The expression of *WRKY* under high temperature stress was much higher than that under low temperature stress. Based on the genes expression, it was speculated that the response mechanism of *Taraxacum officinale* were different under low temperature and high temperature stress. *AP2/ERF* and *Dof* mainly responded to low temperature stress, and *HSF*, *XCT* and *WRKY* mainly played a role in high temperature stress.

**Keywords:** *Taraxacum officinale*; temperature stress; reference gene; expression analysis

蒲公英是菊科多年生草本，同属约 2 000 余种，是重要的药食观赏兼用植物，野生资源分布遍及中国（中国科学院中国植物志编辑委员会，1999），主要栽培于东北与华北地区，其最适生长温度为 20~25 °C，低于或高于最适温度会影响植株正常生长（张晓晖，2012）。随着全球气候变化异常，极端天气发生的频率增多，如春季“倒春寒”（王梓等，2015）与夏季高温（李小锋，2015）等都发生于蒲公英生育期内，直接影响蒲公英的产量与品质。药用蒲公英（*Taraxacum officinale* F. H. Wigg.）具有植株大、产量高等特点，是目前蒲公英生产中常用的栽培种，在山西、河南、河北等地大面积栽培，目前，对其研究多集中于药理（Menke et al., 2018）及生理（乔永刚等，2018）方面，关于不同温度胁迫下相关基因的表达情况及其内参基因知之甚少。

研究基因表达时，需要内参基因对目标基因的表达水平进行标准化衡量（龙翔宇，2011；袁伟等，2012；李丹丹等，2017；宋晓波等，2019）。常用的内参基因有肌动蛋白基因（*ACT*）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因（*GAPDH*）等，但是在许多情况下这些基因的表达水平并不是很稳定（胡瑞波等，2009；周晓慧等，2014；高金玉等，2017）。因此在研究基因表达时需要筛选适合的内参基因。常用 *geNorm*、*NormFinder* 以及 *BestKeeper* 等软件分析候选内参基因在不同试验条件的表达稳定性（蒋婷婷等，2015；马璐琳等，2019）。

本研究中对药用蒲公英幼苗进行高温和低温胁迫，利用 RT-qPCR 技术以及 *geNorm*、*NormFinder* 和 *BestKeeper* 3 种软件分析候选内参基因稳定性，根据筛选的最适内参基因对药用蒲公英温度响应相关基因进行表达分析，以期为解析药用蒲公英温度响应机制，培育耐温度胁迫的优质药用蒲公英种质提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料胁迫及其 RNA 提取与 cDNA 合成

试验所用材料为山西农业大学培育的‘铭贤 1 号’药用蒲公英。挑选饱满无虫蛀的种子，2019 年 2 月 20 日播种于装有营养土和蛭石（营养土：蛭石 = 1:1）的营养钵（规格：10 cm × 10 cm）中，人工气候室[昼温（25 ± 2）°C，夜温（20 ± 2）°C，相对湿度 65%，光照强度 12 000 lx，光周期为光照 16 h/黑暗 8 h]培养，出苗后每营养钵定苗 1~2 株，在 6~7 叶期进行胁迫试验。

选取长势一致、生长良好的幼苗，分别置于低温（4 °C）冷光培养箱和恒温（38 °C）恒湿培养箱中处理 0、3、6、12、24 和 48 h，每处理 10 株，每个胁迫处理 3 次生物学重复。采取第 2 节

位叶片于液氮中速冻, -80 °C 保存备用。

利用华越洋试剂盒 (0416-50) 提取各处理材料总 RNA, 用 Nanodrop 2000C 测定样品 RNA 的浓度和纯度。利用琼脂糖凝胶电泳 (2%) 检测其完整性。将 RNA 稀释至 100 ng · μL<sup>-1</sup>, 以其为模板, 利用全式金反转录试剂盒 (AE311-03) 合成 cDNA, -20 °C 保存。

## 1.2 候选内参基因和温度响应相关基因的选择及引物设计

以水稻 (Kimet al., 2003)、马铃薯 (Nicot et al., 2005)、番茄 (王艳和刘瑜, 2015) 以及药用蒲公英近缘物种橡胶草 (覃碧 等, 2016) 等已被验证的内参基因序列为参考, 选择植物中常用的 10 个内参基因 (表 1)。根据拟南芥、烟草、水稻等模式植物已验证的 12 个温度响应相关基因 (表 2)。利用刘晓婷等 (2018) 的方法设计荧光定量 PCR 引物。

表 1 药用蒲公英候选内参基因引物信息

Table 1 Primer information of candidate reference genes in *Taraxacum officinale*

基因 Gene	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	扩增产物长度/bp Products length	退火温度/°C T <sub>m</sub>
<i>18S</i>	F: GGTTTACTCGTCCCTTTTGT; R: CCTATGATGTATCCCATGCT	141	52.1/50.9
<i>EF1α</i>	F: TCTCACGAGGTTTCAAAGAC; R: GAGGGTAAGTTCGTCTCTTTTC	167	51.8/52.7
<i>TUB</i>	F: GGAAATATGTCGGTAAACAGC; R: GTACGTAGACTGTCCATAGTACCAG	133	50.6/55.9
<i>40S</i>	F: CACTCAAAGGTTGTTAGAGTCC; R: AACTCTTAAGTACGGACAGGAG	155	52.9/53.3
<i>GAPDH</i>	F: AGTTGGTTTCGTGGTATGAC; R: ACATGTCAGTGAACAGGTAGAC	154	52.2/54.0
<i>β-actin</i>	F: GGAAGGATCTTTATGGGAAC; R: CAGACACTATACTTCTCTCAGG	151	49.8/53.8
<i>ACT11</i>	F: CGAGCGTGGTTACTCATTC; R: TTTCCATCTCTTGCTCGTAGTC	104	54.8/54.1
<i>TUA</i>	F: CTTCCTCATCTTCCACTCCTC; R: CTTGGACTTCTTGCCGTAGT	97	54.8/54.6
<i>60S</i>	F: ATGAACGTTGGTGCTGGT; R: CTGGTTCGCTCTTCTTCTC	118	54.5/51.0
<i>SKIP</i>	F: GAAAGAGAGAGGGAGAGAAGGT; R: CCAGTAGATGCCATTCCAAGAG	122	55.4/55.4

表 2 药用蒲公英温度响应相关基因引物信息

Table 2 The related genes primer information of temperature responses in *Taraxacum officinale*

基因 Gene	基因名称 Gene name	功能 Function	引物序列 (5' - 3') Primer sequences
<i>AP2/ERF</i>	AP2/ERF 转录因子基因 AP2/ERF transcription factor gene	参与逆境防御信号途径 Involved in adversity defense signal way	F: GCTAACCCCTAGACGGACTTTG R: CTTGACTGCCCTTCTCTTCTAC
<i>Dof</i>	Dof 转录因子家族基因 Dof transcription factor gene	参与逆境响应过程 Involved in stress response process	F: CCGATTTACCCTTACCTTACT R: GATTCCGGTTCCTCGAATGT
<i>ICE1</i>	<i>CBF</i> 基因转录激活因子 <i>CBF</i> transcription activator	ICE-CBF 级联反应 ICE-CBF cascade reaction	F: CACCACCATGTCTTGAATTG R: GGTGAGAGAAGCGTAGGTATTG
<i>MYB</i>	<i>CBF</i> 基因家族基因 <i>CBF</i> gene family gene	激活下游低温响应基因 Activating low temperature responsive gene	F: GACTCCTAAAGGGACCAATAC R: CCTGTCCGTAATCTCTCTAAC
<i>bZIP</i>	碱性亮氨酸拉链类转录因子基因 Basic leucine zipper motif transcription factor gene	降低 <i>COR</i> (cold-responsive) 基因表达 Reduce <i>COR</i> gene expression	F: GTATCACCACCCAGCATTACA R: TCCAGAGGTTGGTACATCAAAG
<i>NTL6</i>	低温应答 <i>PR</i> 基因 Cold response <i>PR</i> gene	参与低温胁迫响应 Involved in cold stress responses	F: CAAGAGTCAACAAAGGGTCAAC R: TCCCTGACACTTCCAAATC
<i>HSF</i>	热激转录因子 Heat stress transcription factors	高温响应信号转导途径的末端组分 Terminal components of high temperature response signal transduction pathway	F: CGCAACCAATGGAAGGTCTA R: TGACCTCTCTACTCCATGAAA
<i>Gals</i>	肌醇半乳糖苷合成酶 Galactinol synthase	参与植物应对非生物胁迫 Involved in abiotic stress responses of plants	F: CCGAAACCGTGTCTCTTCTT R: GGTGTCACCATTAGGGTCTTT
<i>HSP</i>	热休克蛋白 Heat shock proteins	对高温应激产生应答 Response to heat stress	F: CATAAAGGGTGTCTCGGATTAG R: CAACCCGTGACTCCAGAATAC
<i>NAC</i>	<i>NAC</i> 转录因子基因 <i>NAC</i> transcription factor gene	参与植物对非生物胁迫响应 Involved in abiotic stress responses of plants	F: CCGTATGTGCTCTGTCGTTTA R: CTGAGGGAGGTGAAGCAATAC
<i>XCT</i>	红光响应基因 XAPS circadian timekeeper gene	参与植物应对温度胁迫过程 temperature stress responses in plant	F: GTCACAAGGGAGCAGTATGT R: GTCCTCTTCTCTTGTGTAG
<i>WRKY</i>	<i>WRKY</i> 转录因子基因 <i>WRKY</i> transcription factor gene	参与植物非生物胁迫响应 Involved in abiotic stress responses of plants	F: GGGTATGATGGTGAAGGAGATG R: AACGACTCTTGGCTCTCTATG

### 1.3 内参基因引物特异性检测与 RT-qPCR

以药用蒲公英低温胁迫 0 h 的 cDNA 为模板进行 PCR。反应体系(10  $\mu$ L)为 2 $\times$  Es Taq MasterMix (康为世纪) 5  $\mu$ L, 上游引物 0.5  $\mu$ L, 下游引物 0.5  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu$ L。反应程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 72  $^{\circ}$ C 再延伸 2 min, 32 个循环。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

利用 Bio-Rad CFX-96 进行实时荧光定量 PCR。反应体系具体为: 2 $\times$  TransStart<sup>®</sup> Tip Green qPCR SuperMix 5  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, 上游引物 0.2  $\mu$ L, 下游引物 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3.6  $\mu$ L, 3 次重复。实时荧光定量 PCR 反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 94  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 45 个循环, 70~95  $^{\circ}$ C 熔解曲线: 0.5  $^{\circ}$ C 5 s, 信号采集。

### 1.4 数据处理和内参基因稳定性评价

利用 Microsoft Excel 2016 处理基因的 C<sub>T</sub> 值, 使用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 评价内参基因稳定性。根据 3 种软件评价结果, 综合分析内参稳定性 (Wang et al., 2017)。根据筛选出的内参基因, 检测温度响应相关基因的表达水平, 每个样品 3 次重复。表达量计算参照刘霞宇 (2017) 的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 质量检测与内参基因引物特异性分析

对 RNA 进行电泳检测, 结果 (图 1, A) 显示各处理 RNA 的 18S 和 28S 条带完整无拖尾, 说明提取的 RNA 完整性较好。对其浓度和质量进行检测, RNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值在 1.9~2.1 之间, A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> 值在 2.1~2.3 之间, RNA 可用于 cDNA 合成。

以药用蒲公英低温胁迫 0 h 的 cDNA 为模板对 10 个内参基因进行 PCR, 琼脂糖电泳结果 (图 1, B) 显示, 各内参基因片段在 100~200 bp 之间, 与预期结果一致, 产物扩增良好, 无二聚体, 说明筛选的内参基因引物可用于后续试验。

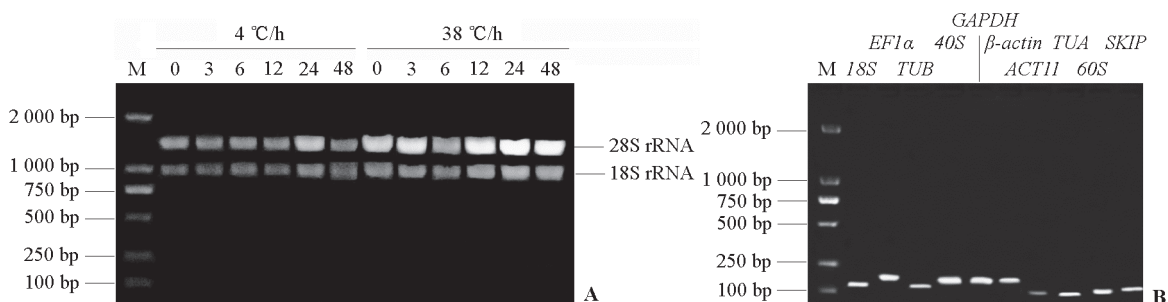


图 1 药用蒲公英 RNA (A) 和候选内参基因琼脂糖电泳图谱 (B)

Fig. 1 RNA (A) and candidate reference genes agarose gel electrophoresis map (B) in *Taraxacum officinale*

### 2.2 候选内参基因表达分析

C<sub>T</sub> 值是反映基因表达丰度的重要参数。对各处理 10 个候选内参基因的 C<sub>T</sub> 值进行统计 (图 2),

10 个基因  $C_T$  值在 17~38 之间,  $18S$  和  $GAPDH$  的  $C_T$  比较小, 其基因表达丰度高,  $ACT11$ 、 $TUA$ 、 $60S$ 、 $SKIP$  的  $C_T$  比较大, 基因表达丰度低,  $EF1\alpha$ 、 $TUB$ 、 $40S$ 、 $\beta$ -actin 的  $C_T$  处于中间范围。简单从  $C_T$  值可以看出  $18S$  在不同胁迫时期表达较为稳定, 且表达较高, 可以作为内参基因。

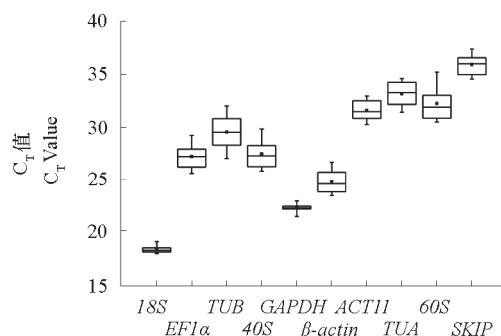


图2 药用蒲公英 10 个候选内参基因  $C_T$  值

Fig. 2  $C_T$  value of candidate reference genes in *Taraxacum officinale*

## 2.3 药用蒲公英温度胁迫下候选内参基因的表达稳定性

### 2.3.1 geNorm

geNorm 软件 V 值 (配对变异值, Pairwise variation value) 可以确定筛选内参基因的数量, M 值 (表达稳定值, Expression stability) 可以判断基因稳定性, M 值越小越稳定。由图 3, A 可知, 配对变异值  $V_{2/3}$  小于 0.15, 所以 2 个基因作为温度胁迫下内参基因组合便可满足要求。由图 3, B 可知, M 值以  $18S$  和  $GAPDH$  最小, 稳定性最好, 因此选择  $18S$  和  $GAPDH$  组合作为药用蒲公英温度胁迫下内参基因。

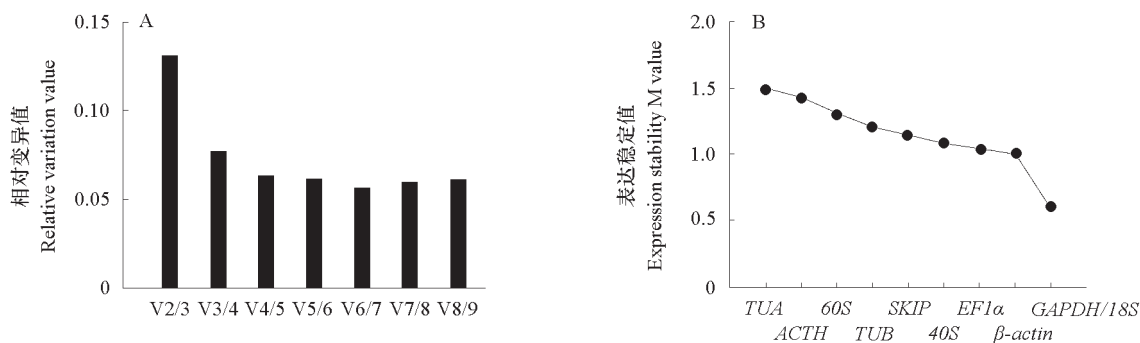


图3 geNorm 分析内参基因配对变异值 (A) 和表达稳定性 (B)

Fig. 3 Analyzing pairwise variation value (A) and expression stability (B) of reference genes by geNorm

### 2.3.2 NormFinder

NormFinder 软件根据基因的表达稳定值筛选内参基因, 稳定值越小, 基因越稳定。由表 3 可知, 内参基因稳定性以  $GAPDH$  和  $18S$  最好 ( $GAPDH > 18S$ )。

表 3 NormFinder 分析药用蒲公英温度胁迫下内参基因稳定性

Table 3 The expression stability ranking of candidate reference genes under temperature stress in *Taraxacum officinale* by NormFinder

基因 Gene	稳定值 Stability value	标准差 Standard deviation	排名 Ranking
<i>GAPDH</i>	0.247	0.119	1
<i>18S</i>	0.421	0.128	2
<i>40S</i>	0.603	0.154	3
<i>β-actin</i>	0.609	0.155	4
<i>EF1α</i>	0.613	0.156	5
<i>SKIP</i>	0.737	0.177	6
<i>60S</i>	0.978	0.223	7
<i>ACT11</i>	0.985	0.224	8
<i>TUB</i>	0.996	0.226	9
<i>TUA</i>	1.163	0.259	10

### 2.3.3 BestKeeper

BestKeeper 主要通过比较基因  $C_T$  值的标准偏差 ( $SD$ ) 和变异系数 ( $CV$ ) 来判断各基因的稳定性,  $SD$  值越小, 稳定性越好。由表 4 可知, 各内参基因稳定性以 *18S* 和 *GAPDH* 最好 ( $18S > GAPDH$ )。

表 4 BestKeeper 分析候选内参基因稳定性结果

Table 4 The expression stability results of reference genes by BestKeeper

基因 Gene	最大值 Maximum value	最小值 Minimum value	几何平均数 Geometric mean	算术平均数 Arithmetic mean	变异系数/% $CV$	标准差 $SD$	排名 Ranking
<i>18S</i>	19.13	17.98	18.35	18.35	1.52	0.28	1
<i>GAPDH</i>	22.93	21.48	22.31	22.32	1.29	0.29	2
<i>ACT11</i>	32.93	30.23	31.53	31.54	2.55	0.80	3
<i>SKIP</i>	37.38	34.53	35.83	35.84	2.51	0.90	4
<i>EF1α</i>	29.21	25.58	27.13	27.15	3.81	1.03	5
<i>β-actin</i>	26.65	23.45	24.75	24.78	4.22	1.05	6
<i>40S</i>	29.82	25.81	27.32	27.34	3.91	1.07	7
<i>TUA</i>	34.58	31.40	33.12	33.14	3.36	1.11	8
<i>60S</i>	35.20	30.46	32.03	32.06	3.96	1.27	9
<i>TUB</i>	31.99	27.03	29.45	29.49	5.27	1.56	10

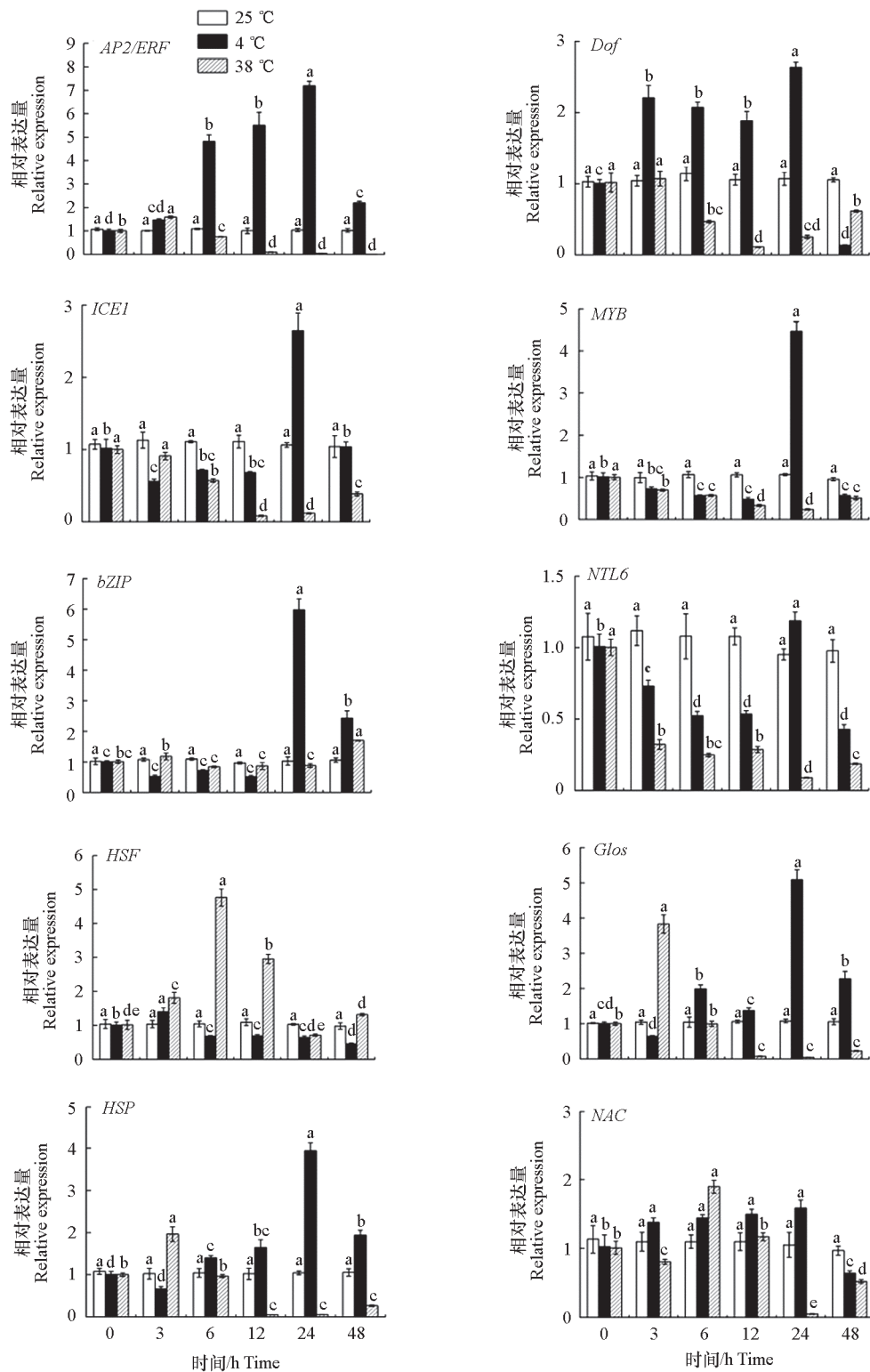
综上所述, *18S* 和 *GAPDH* 可作为药用蒲公英温度胁迫的最佳内参基因组合。

## 2.4 药用蒲公英温度响应相关基因表达分析

以 *18S* 和 *GAPDH* 为内参基因, 利用 RT-qPCR 分析 12 个温度响应相关基因的表达水平 (图 4)。随着胁迫时间延长, *AP2/ERF*、*HSF*、*Glos*、*HSP*、*NAC* 和 *XCT* 在高温胁迫和低温胁迫中表达均有先上调后下势, *bZIP* 和 *NTL6* 在温度胁迫中表达量波动变化, 以上基因表达峰值均显著高于 25 °C 对照; 说明这些基因以不同的调控方式参与药用蒲公英高温胁迫和低温胁迫响应过程。

*Dof*、*ICE1*、*MYB* 低温胁迫中表达先上调后下调, 而在高温胁迫中表达量逐渐下调, 说明 *Dof*、*ICE1*、*MYB* 可能在低温胁迫过程中通过表达上调响应生理过程, 而在高温胁迫中则相反。

*HSF*、*XCT*、*WRKY* 在高温胁迫下表达量明显高于低温胁迫, 尤其是 *WRKY* 基因在高温胁迫中表达量比低温中高 10 倍以上, 它们可能在药用蒲公英高温生理响应中发挥重要作用; *AP2/ERF* 和 *Dof* 在低温胁迫下表达量较高, 可能主要参与低温应答调节, 说明药用蒲公英在高低温胁迫过程中温度响应基因可能存在不同的调控模式。另外, 在低温胁迫 24 h, *AP2/ERF*、*Dof*、*ICE1*、*MYB*、*Glos*、*HSP* 和 *NAC* 表达量最高, 可能是随着低温胁迫时间的延长, 药用蒲公英幼苗出现耐受低温的临界时间点。



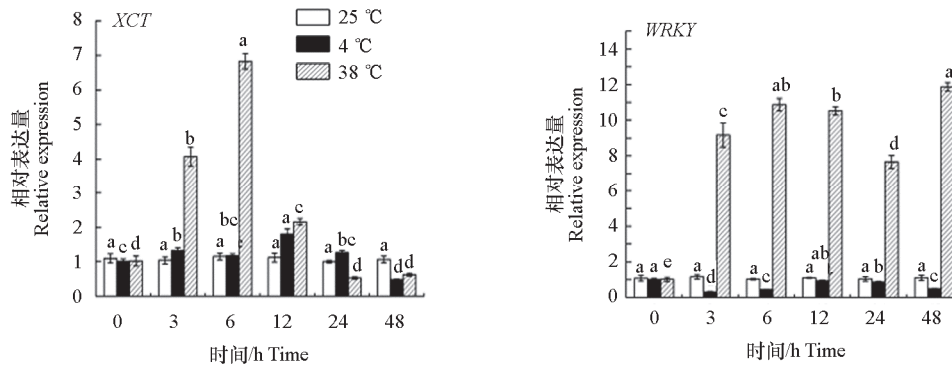


图4 药用蒲公英温度响应相关基因表达分析  
Fig.4 Genes expression analysis of temperature responses in *Taraxacum officinale*  
 $P < 0.05$ .

### 3 讨论

随着药用植物分子生物学领域研究的深入, 对其功能基因的表达研究逐渐成为热点 (马莹 等, 2017), 选择合适的内参基因作为参照是研究目的基因在不同试验条件下或者不同组织中表达的关键 (Yu et al., 2018; 苏西娅 等, 2019), 因此针对特定物种特定试验环境需要开发和筛选最适的内参基因。本研究中筛选出 *GAPDH* 和 *18S* 作为药用蒲公英温度胁迫下的最适内参基因, *GAPDH* 是植物常用的内参基因, 本研究也不例外, *18S* 在部分植物中表达丰度过高被证明在目的基因表达量低时不适宜作为内参 (周晓馥 等, 2016), 本研究中 *18S* 表达稳定, 是药用蒲公英温度胁迫下的最适内参基因之一。

植物中 *AP2/ERF*、*bZIP*、*HSF*、*Glos*、*HSP*、*NAC* 和 *XCT* 等基因参与温度等非生物胁迫响应机制 (王冰和程宪国, 2017; 吴昊 等, 2018), 本研究的结果也证实这些基因参与药用蒲公英温度胁迫响应。植物在不同非生物胁迫下受多基因共同调控, *AP2/ERF* (杜春芳, 2016) 被认为是低温响应基因, *HSF* (庞强强 等, 2017) 是高温响应基因, 本研究的结果与此相符合。而 *Dof* (却枫 等, 2015)、*XCT* (王玉晗, 2014) 和 *WRKY* (陆畅 等, 2015; 王利彬, 2018) 在高温和低温胁迫下均发挥作用, 本研究中 *Dof* 主要在低温中响应, *XCT* 和 *WRKY* 在高温胁迫下表达量远远高于低温胁迫, 表明其在响应高温胁迫中发挥作用。

有研究发现 *AP2/ERF* 类转录因子通过响应水杨酸、脱落酸 (ABA) 等多种信号转导网络来调控植物非生物胁迫应答反应 (张计育 等, 2012); *Dof* 转录因子可以调控植物保卫细胞特异基因表达和参与水杨酸信号途径, 进而调节植物防御反应 (蔡晓锋 等, 2013)。本研究中药用蒲公英 *AP2/ERF* 在低温胁迫初期基因表达上调, 可能是其参与乙烯、ABA 等信号转导途径, 诱导 *COR* 基因的表达调控网络, 促使保护酶和渗透调节物质发挥作用, 从而增加药用蒲公英的低温耐受性 (Zhou et al., 2011; 郭仰东 等, 2018); 胁迫后期基因表达水平下调, 可能是药用蒲公英胁迫后期叶片细胞亚显微结构遭到严重破坏 (乔永刚 等, 2018), 使相关基因调控网络中断, 从而降低基因表达水平。*Dof* 在低温胁迫 24 h 内表达上调, 可能是 *Dof* 基因的高度表达促使保卫细胞特异基因表达水平上调, 增强了保卫细胞抗低温能力, 积极参与水杨酸信号途径, 减弱细胞损伤。Nishizawa 等 (2006) 证实了 *HSF* 可以调控胁迫防御相关基因的转录和表达; 王玉晗 (2014) 研究发现温度胁迫通过诱导 DNA 甲基化水平降低促使 *XCT* 表达水平升高, 参与植物红光信号途径, 调控植物生命活动过程; *WRKY*



转录因子作为水杨酸、ABA 等信号通路中的关键组分, 参与植物应对非生物逆境响应途径 (李冉和娄永根, 2011)。本研究的结果揭示药用蒲公英 *HSF* 基因在高温胁迫胁迫 6 h 内表达持续上调, 可能是 *HSF* 通过转录调控途径使得 *HSF* 蛋白增加, 对药用蒲公英叶片细胞结构起保护作用, 胁迫后期持续下调说明 *HSF* 蛋白的保护作用有一定限度 (Jacob et al., 2017)。*WRKY* 持续上调表达, 可能是由于 *WRKY* 通过积极响应多种激素信号网络, 增强药用蒲公英的耐高温性; 也可能是 *WRKY* 高表达促进脯氨酸的积累从而保护叶片免受高温损伤 (Sun et al., 2015)。此外, *XCT* 表达上调说明药用蒲公英可能在高温胁迫过程中积极参与红光信号途径, 增强其高温耐受性。

本试验中利用 qRT-PCR 对药用蒲公英温度胁迫的内参基因进行了筛选, 确定了 2 个最适内参基因组合 *GAPDH* 和 *18S*, 药用蒲公英低温和高温胁迫的响应机制存在差异, *AP2/ERF*、*Dof* 主要响应低温胁迫, *HSF*、*XCT*、*WRKY* 主要响应高温胁迫。

## References

- Cai Xiao-feng, Zhang Yu-yang, Zhang Jun-hong, Li Han-xia, Ye Zhi-biao. 2013. Advances in research on function of the *Dof* gene family in plant. *Plant Physiology Journal*, 49 (1): 1 - 12. (in Chinese)
- 蔡晓锋, 张余洋, 张俊红, 李汉霞, 叶志彪. 2013. 植物 *Dof* 基因家族功能研究进展. *植物生理学报*, 49 (1): 1 - 12.
- Chinese Flora Editorial Board of the Chinese Academy of Sciences. 1999. *Flora reipublicae populairs scinicase*. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 1999. 中国植物志. 北京: 科学出版社.
- Du Chun-fang. 2016. Analysis of transcriptomics and proteomics induced by cold stress in *Brassica napus* L. [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 杜春芳. 2016. 甘蓝型油菜低温诱导的转录组和蛋白组分析 [博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Gao Jin-yu, Guo Hui-qin, Cao Lu, Han Bing. 2017. Identification and validation of reference genes for quantitative real-time PCR in *Stipa breviflora* under conditions of simulated warming. *Acta Agrestia Sinica*, 25 (5): 1020 - 1028. (in Chinese)
- 高金玉, 郭慧琴, 曹 路, 韩 冰. 2017. 模拟增温下短花针茅实时荧光定量内参基因的筛选及验证. *草地学报*, 25 (5): 1020 - 1028.
- Guo Yang-dong, Zhang Lei, Li Shuang-tao, Cao Yun-yun, Qi Chuan-dong, Wang Jin-fang. 2018. Progresses in research on molecular biology of abiotic stress responses in vegetable crops. *Scientia Agricultura Sinica*, 51 (6): 1167 - 1181. (in Chinese)
- 郭仰东, 张 磊, 李双桃, 曹芸运, 齐传东, 王晋芳. 2018. 蔬菜作物应答非生物逆境胁迫的分子生物学研究进展. *中国农业科学*, 51 (6): 1167 - 1181.
- Hu Rui-bo, Fan Cheng-ming, Fu Yong-fu. 2011. Reference gene selection in plant real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 11 (6): 30 - 36. (in Chinese)
- 胡瑞波, 范成明, 傅永福. 2009. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择. *中国农业科技导报*, 11 (6): 30 - 36.
- Jacob P, Hirt H, Bendahmane A. 2017. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal*, 15 (4): 405 - 414.
- Jiang Ting-ting, Gao Yan-hui, Tong Zai-kang. 2015. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Lycoris*. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (6): 1129 - 1138. (in Chinese)
- 蒋婷婷, 高燕会, 童再康. 2015. 石蒜属植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择. *园艺学报*, 42 (6): 1129 - 1138.
- Kim B R, Nam H Y, Kim S U, Kim S I, Chang Y J. 2003. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnol Lett*, 25 (21): 1869 - 1872.
- Li Dan-dan, Hu Bo, Wang Qing, Wu Wei. 2017. The research on reference genes in medicinal plant. *Molecular Plant Breeding*, 15 (13): 903 - 910. (in Chinese)

- 李丹丹, 胡博, 王庆, 吴卫. 2017. 药用植物内参基因研究进展. 分子植物育种, 15 (13): 903 - 910.
- Li Ran, Lou Yong-gen. 2011. Research advances on stress responsive WRKY transcription factors in plants. Acta Ecologica Sinica, 31 (11): 3223 - 3231. (in Chinese)
- 李冉, 娄永根. 2011. 植物中逆境反应相关的 WRKY 转录因子研究进展. 生态学报, 31 (11): 3223 - 3231.
- Li Xiao-feng. 2015. Study on the extreme high temperature events in summer and its mechanism in recent 30 years in North China [M. D. Dissertation]. Lanzhou: Lanzhou University. (in Chinese)
- 李先锋. 2015. 近 30 年华北地区夏季极端高温天气事件及其影响机理研究 [硕士学位论文]. 兰州: 兰州大学.
- Liu Xia-yu. 2017. Section of candidate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time PCR in *Lonicera japonica* Thunb [M. D. Dissertation]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University. (in Chinese)
- 刘霞宇. 2017. 基于实时荧光定量 PCR 的忍冬内参基因筛选 [硕士学位论文]. 晋中: 山西农业大学.
- Liu Xiao-ting, Wang Shun-li, Xue Jing-qi, Xue Yu-qian, Lü Ying-min, Zhang Xiu-xin. 2018. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in different tissue and organ of barbadoslily. Acta Horticulturae Sinica, 45 (5): 919 - 930. (in Chinese)
- 刘晓婷, 王顺利, 薛璟琪, 薛玉前, 吕英民, 张秀新. 2018. 朱顶红实时荧光定量 PCR 中不同组织器官内参基因的筛选. 园艺学报, 45 (5): 919 - 930.
- Long Xiang-yu. 2011. Identification and evaluation of novel internal control genes and FHB resistance genes by microarray in wheat [Ph. D. Dissertation]. Chengdu: Sichuan Agricultural University. (in Chinese)
- 龙翔宇. 2011. 利用基因芯片技术发掘小麦内参基因及抗赤霉病相关基因 [博士学位论文]. 成都: 四川农业大学.
- Lu Chang, Li Bin, Zheng Yong-qi. 2015. Analysis on differential expression of cold resistance related genes of *Liriodendron chinense* under low temperature stress. Journal of Plant Resources and Environment, 24 (3): 25 - 31. (in Chinese)
- 陆畅, 李斌, 郑勇奇. 2015. 低温胁迫下鹅掌楸抗寒性相关基因的差异表达分析. 植物资源与环境学报, 24 (3): 25 - 31.
- Ma Lu-lin, Cui Guang-fen, Wang Xiang-ning, Jia Wen-jie, Duan Qing, Du Wen-wen, Wang Ji-hua, Chen Fa-di. 2019. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Iris bulleyana* during flower color variation. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 33 (9): 1707 - 1716. (in Chinese)
- 马璐琳, 崔光芬, 王祥宁, 贾文杰, 段青, 杜文文, 王继华, 陈发棣. 2019. 西南鸢尾花色变异实时定量 PCR 内参基因的筛选与验证. 核农学报, 33 (9): 1707 - 1716.
- Ma Ying, Guo Juan, Mao Ya-ping, Zeng Wen, Zhan Zhi-lai, Meng Fan-yun, Huang Lu-qi. 2017. Analysis for biosynthetic pathways of active constituents in medicinal plants and its availability. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 32 (5): 2079 - 2083. (in Chinese)
- 马莹, 郭娟, 毛亚平, 曾雯, 詹志来, 孟繁蕴, 黄璐琦. 2017. 药用植物有效成分生物合成途径解析及其应用. 中华中医药杂志, 32 (5): 2079 - 2083.
- Menke K, Schwerme M, Schwerme J, Beckmann C, Stintzing F, Schramm A, Zuzak T J. 2018. *Taraxacum officinale* extract shows antitumor effects on pediatric cancer cells and enhance mistletoe therapy. Complementary Therapies in Medicine, 40: 158 - 164.
- Nicot N, Hausman J F, Hoffmann L, Evers D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. J Exp Bot, 56 (421): 2907 - 2914.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Yoshida E, Maruta T, Yoshimura K, Shigeoka S. 2006. *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. Plant Journal, 48 (4): 535 - 547.
- Pang Qiangqiang, Li Zhiliang, Luo Shaobo, Chen Riyuan, Jin Qingmin, Li Zhenxing, Li Deming, Sun Baojuan, Sun Guangwen. 2017. Selection and stability analysis of reference gene for qRT-PCR in eggplant under high temperature stress. Acta Horticulturae Sinica, 44 (3): 475 - 486. (in Chinese)

- 庞强强, 李植良, 罗少波, 陈日远, 金庆敏, 黎振兴, 李德明, 孙保娟, 孙光闻. 2017. 高温胁迫下茄子 qRT-PCR 内参基因筛选及稳定性分析. 园艺学报, 44 (3): 475 - 486.
- Qiao Yong-gang, Wang Yong-fei, Chen Liang, Cui Fen-fen, Cao Ya-ping, Song Yun. 2018. Effects of low temperature above zero on ultrastructure and physiological characteristics of *Taraxacum officinale*. Acta Agrestia Sinica, 26 (6): 1467 - 1472. (in Chinese)
- 乔永刚, 王勇飞, 陈 亮, 崔芬芬, 曹亚萍, 宋 芸. 2018. 零上低温胁迫对药蒲公英亚显微结构和生理特性的影响. 草地学报, 26 (6): 1467 - 1472.
- Qin Bi, Pan Min, Yu Hai-yang, Yang Yu-shuang, Gan Lin, Liu Shi-zhong. 2016. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in *Taraxacum kok-saghyz* Rodin. Plant Physiology Journal, 52 (7): 1059 - 1065. (in Chinese)
- 覃 碧, 潘 敏, 余海洋, 杨玉双, 甘 霖, 刘实忠. 2016. 橡胶草实时荧光定量 PCR 内参基因评价. 植物生理学报, 52 (7): 1059 - 1065.
- Que Feng, Huang Ying, Wang Feng, Xu Zhi-sheng, Wang Guang-long, Xiong Ai-sheng. 2015. Cloning and expression analysis of a transcription factor, DcDofD1 related to abiotic stress reaction in carrot. Journal of Plant Genetic Resources, 16 (5): 1073 - 1079. (in Chinese)
- 却 枫, 黄 莹, 王 枫, 徐志胜, 王广龙, 熊爱生. 2015. 胡萝卜中 DcDofD1 转录因子的克隆及其对非生物逆境胁迫的响应分析. 植物遗传资源学报, 16 (5): 1073 - 1079.
- Song Xiaobo, Chang Yingying, Liu Hao, Xu Huimin, Pei Dong. 2019. Reference gene selection and genes expression analysis during adventitious root formation in walnut. Acta Horticulturae Sinica, 46 (10): 1907 - 1918. (in Chinese)
- 宋晓波, 常英英, 刘 昊, 徐慧敏, 裴 东. 2019. 核桃不定根发生阶段内参基因筛选与关键基因表达分析. 园艺学报, 46 (10): 1907 - 1918.
- Su Xi-ya, Shi Yuan-bao, Yang Xiao-ming, Wang Gui-bin, Cao Fu-liang. 2019. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Ginkgo biloba*. Plant Physiology Journal, 55 (6): 875 - 882. (in Chinese)
- 苏西娅, 石元豹, 杨晓明, 汪贵斌, 曹福亮. 2019. 银杏实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择与验证. 植物生理学报, 55 (6): 875 - 882.
- Sun X C, Gao Y F, Li H R, Yang S Z, Liu Y S. 2015. Over-expression of *SlWRKY39* leads to enhanced resistance to multiple stress factors in tomato. Journal of Plant Biology, 58 (1): 52 - 60.
- Wang Bing, Cheng Xian-guo. 2017. Physiological responses and regulatory pathways of transcription factors in plants under drought, high-salt, and low temperature stresses. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 23 (6): 1565 - 1574. (in Chinese)
- 王 冰, 程宪国. 2017. 干旱、高盐及低温胁迫下植物生理及转录因子的应答调控. 植物营养与肥料学报, 23 (6): 1565 - 1574.
- Wang H, Zhang X, Liu Q H, Liu X C, Ding S X. 2017. Selection and evaluation of new reference genes for RT-qPCR analysis in *Epinephelus akaara* based on transcriptome data. PLoS ONE, 12(2): e0171646.
- Wang Li-bin. 2018. The study on response mechanism and screening of key factors under drought and high temperature stresses in soybean [*Glycine max* (L.) Merri] [Ph. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
- 王利彬. 2018. 大豆苗期干旱和高温胁迫应答机制研究及关键转录因子的筛选 [博士论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Wang Yan, Liu Yu. 2015. Research advance of reference gene selection in tomato real-time quantitative PCR. Northern Horticulture, (23): 198 - 201. (in Chinese)
- 王 艳, 刘 瑜. 2015. 番茄实时定量 PCR 内参基因选择的研究进展. 北方园艺, (23): 198 - 201.
- Wang Yu-han. 2014. Study of the epigenetic regulatory mechanisms on temperature and red light responsive gene XCT in *Arabidopsis* [M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 王玉晗. 2014. 拟南芥温度胁迫和红光响应基因 XCT 表观遗传机理探究 [硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Wang Zi, Xu Jun-liang, Wei Hong-xu. 2015. Spring frost following and its effect on the growth of trees in spring. Northern Horticulture, (16): 195 - 201. (in Chinese)

- 王 梓, 徐军亮, 魏红旭. 2015. 中国“倒春寒”天气的发生及对树木春季生长影响. 北方园艺, (16): 195 - 201.
- Wu Hao, Li Yan-min, Xie Chuan-xiao. 2018. Research advances on physiological basis and gene discovery for thermal tolerance in crops. Crops, (5): 1 - 9. (in Chinese)
- 吴 昊, 李燕敏, 谢传晓. 2018. 作物耐热生理基础与基因发掘研究进展. 作物杂志, (5): 1 - 9.
- Yu M, Liu D, Li Y C, Sui C, Chen G D, Tang Z K, Yang C M, Hou D B, Wei J H. 2018. Validation of reference genes for expression analysis in three *Bupleurum* species. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 33 (1): 154 - 161.
- Yuan Wei, Wan Hong-jian, Yang Yue-jian. 2012. Characterization and selection of reference genes for real-time quantitative RT-PCR of plants. Chinese Bulletin of Botany, 47 (4): 427 - 436. (in Chinese)
- 袁 伟, 万红建, 杨悦俭. 2012. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择. 植物学报, 47 (4): 427 - 436.
- Zhang Ji-yu, Wang Qing-ju, Guo Zhong-ren. 2012. Progresses on plant AP2/ERF transcription factors. Hereditas, 34 (7): 835 - 847. (in Chinese)
- 张计育, 王庆菊, 郭忠仁. 2012. 植物 AP2/ERF 类转录因子研究进展. 遗传, 34 (7): 835 - 847.
- Zhang Xiao-hui. 2012. Study on the effect of salt stress on seeding germination and growth of *Taraxacum mongolicum* [M. D. Dissertation]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University. (in Chinese)
- 张晓晖. 2012. 盐碱胁迫对蒲公英种子萌发及幼苗生长影响的研究[硕士论文]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学.
- Zhou M Q, Shen C, Wu L H, Tang K X, Lin J. 2011. CBF-dependent signaling pathway: a key responder to low temperature stress in plants. Critical Reviews in Biotechnology, 31 (2): 186 - 192.
- Zhou Xiaofu, Wang Jing, Shi Hongwei, Xu Hongwei. 2016. The exploration of 18S rRNA for quantitative RT-PCR as reference gene in plant. Journal of Jilin Normal University (Natural Science Edition), 37 (2): 115 - 119. (in Chinese)
- 周晓馥, 王 晶, 史宏伟, 徐洪伟. 2016. 18S rRNA 作为植物实时荧光定量 PCR 内参基因的探究. 吉林师范大学学报 (自然科学版), 37 (2): 115 - 119.
- Zhou Xiao-hui, Liu Jun, Zhuang Yong. 2014. Selection of appropriate reference genes in *Solanum aculeatissimum* for quantitative gene expression studies under different experimental conditions. Acta Horticulturae Sinica, 41 (8): 1731 - 1738. (in Chinese)
- 周晓慧, 刘 军, 庄 勇. 2014. 喀西茄内参基因实时荧光定量 PCR 表达稳定性评价. 园艺学报, 41 (8): 1731 - 1738.