

沙生蜡菊 qRT-PCR 内参基因筛选与验证

刘欣欣¹, 赖成霞², 谷玉凤¹, 葛风伟^{1*}

(1. 新疆师范大学 生命科学院 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017; 2. 新疆维吾尔自治区农业与科学院棉花研究所 新疆棉花技术创新中心/自治区重点实验室/国家棉花工程技术研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要:从沙生蜡菊转录组数据中选择5个管家基因(*ACT1*、*ACT7*、*CYP*、*HIS*、*TUB*)作为候选内参基因,使用qRT-PCR检测候选内参基因在沙生蜡菊不同组织和冻害胁迫下的表达水平,使用geNorm、NormFinder、BestKeeper和RefFinder对其稳定性进行评估,筛选合适内参基因。以沙生蜡菊 *HaWRKY* 基因作为靶标基因,验证内参基因稳定性。结果表明,*HaCYP*和*HaHIS*在沙生蜡菊组织中稳定表达;*HaHIS*在冻害胁迫后稳定表达;综上所述,*HaHIS*可作为沙生蜡菊内参基因。本研究获得沙生蜡菊合适内参基因,为沙生蜡菊基因表达分析提供了可靠的技术支持,同时为深入研究其响应冻害分子机制和次生代谢调控奠定了基础。

关键词:沙生蜡菊;内参基因;qRT-PCR;基因表达分析

中图分类号:Q946

文献标识码:A

文章编号:1008-9659(2026)01-0074-09

沙生蜡菊(*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.)属菊科蜡菊属多年生草本植物,广泛分布于海拔900~2400 m的冷凉地域(如新疆阿勒泰地区)。沙生蜡菊这一传统药材正日益受到现代科学研究的关注^[1]。药理学分析显示,沙生蜡菊中特有的黄酮类和酚酸类成分使其具有抗炎、抗氧化及保肝等多种生物学活性,这些发现显著提升其在药物开发和高端保健品研制中的商业价值^[2-5]。沙生蜡菊对生长环境要求较高,在引种过程中常遭受低温冻害,这严重限制了其生长发育和自然分布。因此,开展沙生蜡菊的人工培育及其对环境的适应机制研究具有重要意义。

目前对沙生蜡菊的研究主要集中在药用成分提取与药理活性分析^[6]方面,随着对沙生蜡菊药用价值的深入研究,其分子生物学研究也逐渐受到关注。然而,对沙生蜡菊分子层面的研究尚处于起步阶段,缺乏稳定可靠的内参基因,这限制了其相关分子机制的深入研究。基因表达分析对于解析植物逆境胁迫响应机制具有关键作用。其中,qRT-PCR技术因其极高的检测灵敏度、精准的特异性以及高效的通量能力,成为当前基因表达研究的主流方法^[7-8]。qRT-PCR结果直接受到内参基因的影响,理想的内参基因应在植物体各条件下均保持稳定,以此来消除样本间的差异^[9-11]。

迄今为止,沙生蜡菊内参基因筛选的相关研究仍属空白。内参基因的稳定性被证实具有物种特异性和胁迫条件依赖性。例如,一些在正常条件下稳定的内参基因,在逆境胁迫或不同组织中可能会出现表达波动,从而影响实验结果的准确性^[12-13]。因此,沙生蜡菊内参基因的筛选在对其进行分子层面研究中尤为重要。

本研究以沙生蜡菊为实验材料,通过分析不同组织(根、茎、叶、花)以及冻害胁迫下5个候选内参基因表达的稳定性,运用多软件联合分析(geNorm+NormFinder+BestKeeper),精准筛选沙生蜡菊跨实验条件的高稳定性内参基因。本研究为沙生蜡菊的基因表达分析提供可靠的内参基因,同时也为深入研究其生长发育、代谢调控以及逆境响应机制奠定基础。

[收稿日期]2025-04-02

[修回日期]2025-05-27

[基金项目]新疆维吾尔自治区重点研发项目(2023B02023-1)。

[作者简介]刘欣欣(1999-),女,硕士研究生,主要从事植物抗逆机制方面研究,E-mail:1073740517@qq.com.

*[通讯作者]葛风伟(1976-),女,副教授,主要从事植物抗逆生物学方面研究,E-mail:14491069@qq.com.

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

本实验组织表达所用的沙生蜡菊来自新疆维吾尔自治区阿勒泰地区哈巴河县,采集其根、茎、叶、花。沙生蜡菊种子萌发后置于光照培养室(光照时间 16 h/d、温度 25 °C)培养至 1 月龄,选取长势一致的沙生蜡菊幼苗作为冻害胁迫表达材料,将其置于-5 °C 人工气候箱中进行冻害胁迫处理,分别于处理起始(0 h)、处理后 0.5 h、1 h、2 h、3 h 五个时间点采集样品。每个处理设置 3 个生物学重复。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 合成

使用天根生化科技(北京)有限公司 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(DP441)提取总 RNA,并采用 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒(KR116,去基因组)进行反转录,所得 cDNA 保存于-20 °C 备用。

1.3 内参基因的选择与引物设计及验证

从转录组中选择 5 个管家基因(*ACT1*、*ACT7*、*CYP*、*HIS*、*TUB*),利用 Primer Blast 设计引物(表 1)。通过 PCR 反应验证引物的特异性,反应体系为 5 μL 2×Taq PCR Master Mix(艾德莱,北京),0.4 μL(10mmol/L)引物,1 μL cDNA,3.2 μL ddH₂O。反应程序为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,59 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,循环 35 次;72 °C 延伸 5 min。用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的特异性。

表 1 qRT-PCR 分析候选内参基因相关参数

基因	引物序列(5'~3')	产物长度(bp)	斜率	扩增效率(%)	线性相关系数(R ²)
<i>HIS</i>	F:TACTCCAGCGCAAAGGCTTA	221	-3.1162	109.36	0.9920
	R:ATCAGCTTTGACTTCACCGT				
<i>TUB</i>	F:AGGTGCCCAACTGGTTTCAA	243	-3.1109	109.63	0.9989
	R:TGCAAGATCTTCACGGGCTT				
<i>ACT7</i>	F:AAATGTCTATTGTTGCATAGGT	220	-2.7538	130.75	0.9942
	R:AGCTTTTCCTTCATGTCACG				
<i>ACT1</i>	F:TGTTTGGCACAATGGAACCG	153	-3.2852	101.56	0.9978
	R:TGTGCTTCATCACCGACGTA				
<i>CYP</i>	F:GGCGGCGAATCGATTTATGG	239	-3.1262	108.87	0.9986
	R:GAACAAGCTCCACTGGCAGA				

注:*HIS*:组蛋白;*TUB*:微管蛋白;*ACT1*:肌动蛋白 1;*ACT7*:肌动蛋白 7;*CYP*:亲环蛋白。下同。

1.4 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 使用 CFX96 Real-Time PCR Detection System, 采用 TaKaRa 公司 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒。反应体系为 12.5 μL TB Green Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)、1 μL(10mmol/L)引物、2 μL cDNA、8.5 μL ddH₂O。反应程序为 95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,59 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 次循环,95 °C 5 s,60 °C 30 s。熔解曲线:59 °C 到 95 °C, 每 5 s 上升 0.5 °C。

1.5 引物扩增效率分析

采用 10 倍系列稀释法构建 cDNA 标准曲线。将原始 cDNA 模板按 10⁻¹至 10⁻⁵进行梯度稀释(共 5 个数量级),每个稀释梯度设置 3 个技术重复。通过 qRT-PCR 检测候选内参基因($n=5$)在各浓度梯度的扩增 Ct 值,以模板浓度的常用对数值(lg)为自变量、Ct 值为因变量进行线性回归分析。通过标准曲线斜率(K)计算扩增效率($E=10^{-1/K}-1$),同时评估回归方程的决定系数(R²)以验证线性关系可靠性。

1.6 候选内参基因表达稳定性分析与验证

根据 Ct 值,利用 3 个常用的软件(geNorm、NormFinder 和 Best Keeper)对数据进行分析,再运用 RefFinder 分析软件所得结果进行排序,综合评价候选基因的稳定性。分别选择最稳定内参基因和最不稳定内参基因

作为内参基因,验证沙生蜡菊转录组中 *WRKY40* 和 *WRKY70* 表达,确定内参基因的稳定性。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因扩增效率和特异性

通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳验证 5 个候选内参基因 PCR 产物的特异性(图 1),所有目标基因均扩增出单一且大小正确的条带,无非特异性条带或引物二聚体出现,证实了引物设计的合理性和 PCR 反应的特异性。

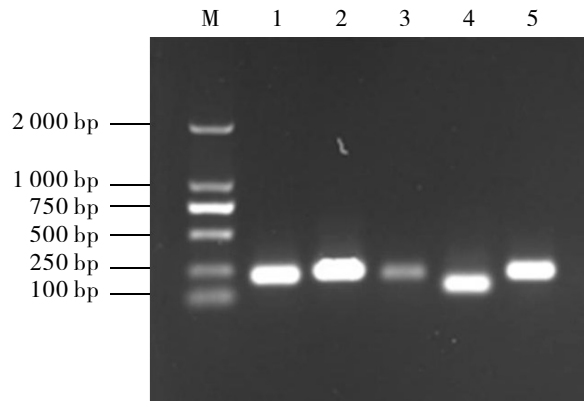


图1 沙生蜡菊 5 个内参候选基因 PCR 产物

M: DL2000 DNA Marker; 1~5 PCR 产物依次为 *HIS*、*TUB*、*ACT7*、*ACT1*、*CYP*。

熔解曲线表明,经 qRT-PCR 扩增的各内参基因产物均显示单一特征峰(图 2),未见引物二聚体或其他非特异性信号,说明引物设计合理且扩增特异性良好。

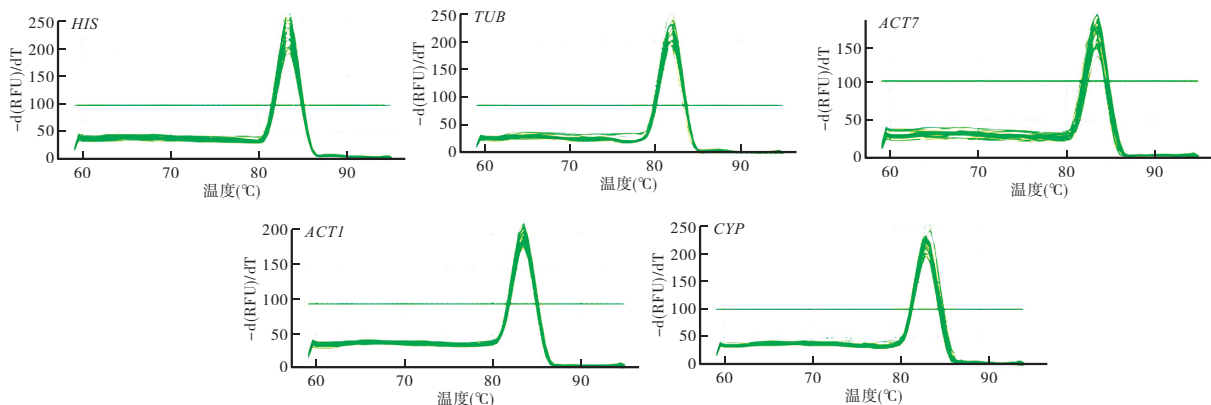


图2 候选内参基因的熔解曲线

本研究选取 5 个 10 倍梯度稀释的 cDNA 作为模板,进行 qRT-PCR 扩增。根据不同稀释浓度下获得的 Ct 值,构建标准曲线并获得其斜率(表 1)。实验数据表明,各标准曲线的 R^2 值均超过 0.9920,且引物扩增效率范围在 101.56%~130.75% 之间。上述结果证明这些候选内参基因在扩增效率和产物特异性方面均符合 qRT-PCR 实验标准,适合用于后续的稳定性和分析。

2.2 候选内参基因的表达量分析

每个样品设置 3 次生物学重复,通过 SYBR Green II 荧光定量 PCR 技术分析沙生蜡菊 5 个候选内参基因的转录水平。结果显示(图 3),5 个候选内参基因在不同处理组中的 Ct 值分布范围存在显著差异。*TUB* 基因(16.50~36.27)和 *ACT7* 基因(23.81~37.83)分别表现出最低和最高 Ct 值。值得注意的是,*HIS* 基因(23.84~32.99)的表达变化最小,而 *TUB* 基因的表达变化最大。在不同组织和冻害胁迫条件下,*CYP* 基因(平均 $C_t=23.81$)和 *ACT7* 基因(平均 $C_t=29.15$)分别呈现最高和最低的平均表达水平。这些数据表明候选内参基因的表达丰度和变异程度缺乏明显规律性,需借助专业分析软件进一步评估其稳定性。

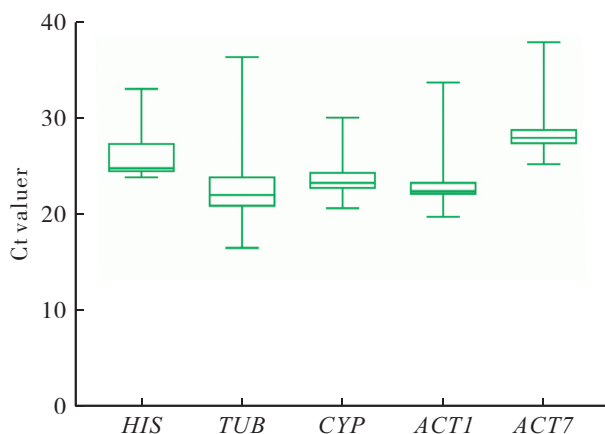


图3 全部样品中每个内参基因的平均循环阈值(Ct值)

2.3 候选内参基因稳定性分析

2.3.1 geNorm 软件分析

基于 geNorm 算法对候选内参基因的表达稳定性进行系统评估。该程序通过计算基因配对变异系数,量化各基因的平均表达稳定值(M 值),其中 M 值与基因稳定性呈负相关关系。由图 4 可知,在沙生蜡菊不同组织中, *HIS* 与 *CYP* 基因呈现最高稳定性,随后依次为 *ACT7*、*ACT1* 及 *TUB* 基因;在冻害处理下,候选内参基因的稳定性从高到低依次为 $HIS = CYP > ACT7 > ACT1 > TUB$ 。

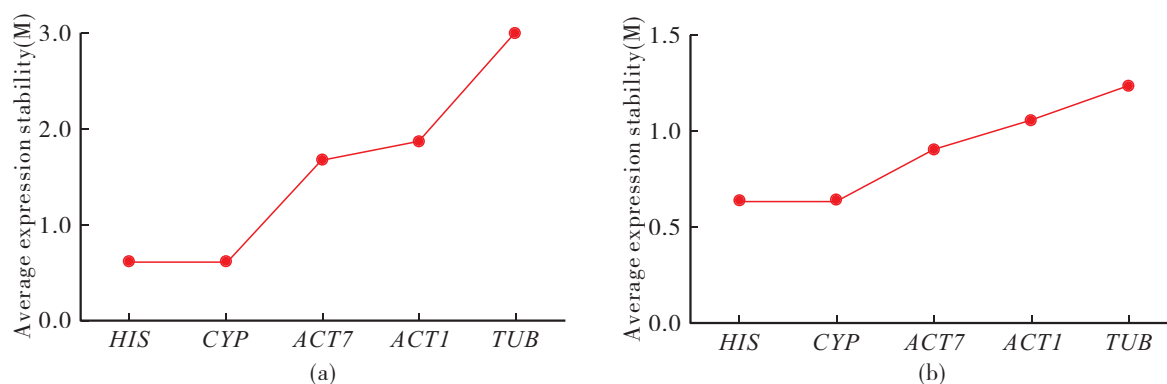


图4 不同组织(a)和冻害(b)处理下内参基因稳定性的geNorm分析

geNorm 分析程序可基于标准化因子的配对差异值(V_n/V_{n+1})来确定不同实验条件下的最优内参基因数量。根据其判定标准,当 V_n/V_{n+1} 比值低于 0.15 时,选择 n 个内参基因即可;若该比值超过 0.15,则需采用 $n+1$ 个基因。本研究结果显示(图 5),在各种组织和冻害处理组合中, V_2/V_3 值均维持在 0.15 以下,表明选取 2 个内参基因可以对目标基因起到较好的矫正作用。

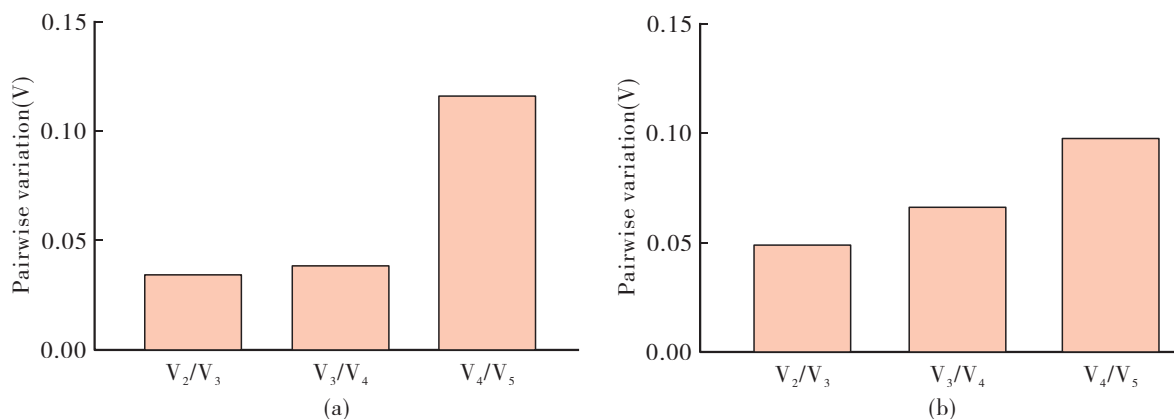


图5 通过geNorm软件分析内参基因的配对差异值(V)

2.3.2 NormFinder 软件分析

采用 NormFinder 算法评估候选内参基因的表达稳定性。该软件通过计算每个基因的稳定值(M 值)进行排序,其中 M 值越小表明基因表达稳定性越高。分析沙生蜡菊不同组织和冻害处理下的内参基因稳定性(表 2),可以得出在沙生蜡菊不同组织中候选内参基因稳定性由高到低为 $HIS > CYP > ACT1 > ACT7 > TUB$;在冻害处理下可以得出候选内参基因稳定性由高到低为 $TUB = HIS > ACT1 > CYP > ACT7$ 。由此可知, HIS 在沙生蜡菊中较为稳定。

表 2 NormFinder对候选内参基因排序

排名	不同组织		冻害处理	
	基因	稳定值(M 值)	基因	稳定值(M 值)
1	<i>HIS</i>	0.15	<i>TUB</i>	0.06
2	<i>CYP</i>	0.19	<i>HIS</i>	0.06
3	<i>ACT1</i>	0.20	<i>ACT1</i>	0.08
4	<i>ACT7</i>	0.27	<i>CYP</i>	0.12
5	<i>TUB</i>	0.59	<i>ACT7</i>	0.26

2.3.3 BestKeeper 软件分析

基于 qRT-PCR 检测数据,运用 BestKeeper 算法对候选内参基因的表达稳定性进行系统评估。该分析方法主要通过以下两个统计学参数进行综合判断:标准偏差(SD)可以反映基因表达量的离散程度;变异系数(CV)用来表征数据相对变异水平。当基因的 SD 值较低时,其表达稳定性更好。由表 3 可知,在不同组织和冻害处理下,内参基因的稳定性从高到低为 $CYP > HIS > ACT7 > ACT1 > TUB$,其中 CYP 最为稳定, TUB 最不稳定。

表 3 BestKeeper对候选内参基因排序

	基因	排名	标准差(SD)	变异系数(CV)	相关系数(R)
不同组织	<i>CYP</i>	1	1.500	6.510	0.807
	<i>HIS</i>	2	1.710	6.550	0.922
	<i>ACT7</i>	3	2.630	9.150	0.986
	<i>ACT1</i>	4	3.110	13.250	0.977
	<i>TUB</i>	5	5.550	23.250	0.995
冻害处理	<i>CYP</i>	1	2.140	8.740	0.992
	<i>HIS</i>	2	2.580	9.830	0.998
	<i>ACT7</i>	3	2.800	9.500	0.985
	<i>ACT1</i>	4	3.330	13.490	0.996
	<i>TUB</i>	5	3.430	14.330	0.988

2.3.4 RefFinder 分析

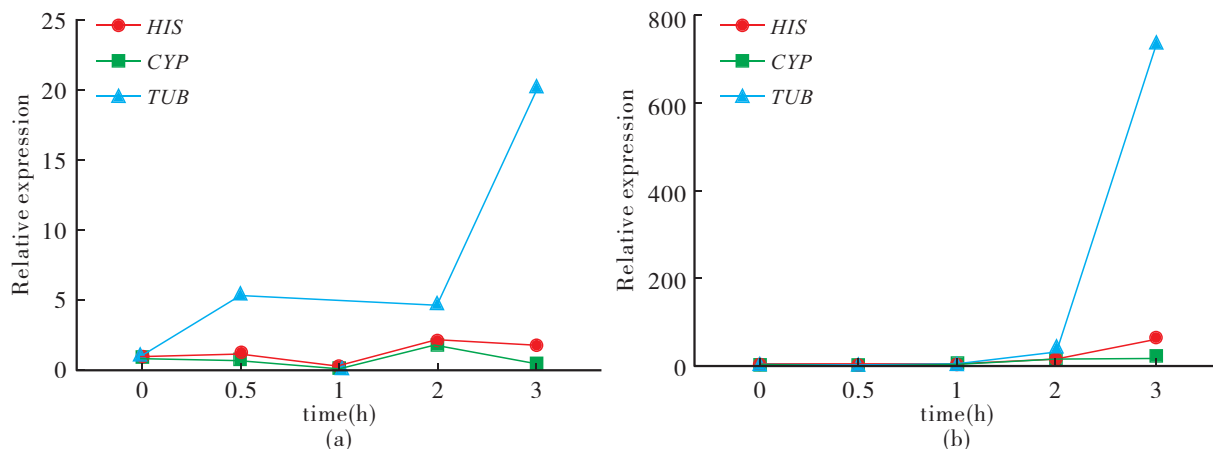
为确保研究结论的准确性,整合不同算法的评估结果,并利用 RefFinder 网络分析平台进行综合比较,最终建立内参基因的稳定性等级排序体系。由表 4 可知,在沙生蜡菊冻害胁迫下和在不同组织中 HIS 较为稳定,可以作为沙生蜡菊中的内参基因。

表4 RefFinder软件分析内参基因

基因		排名		
		GeNorm	NormFinder	BestKeeper
不同组织	<i>HIS</i>	1	1	2
	<i>CYP</i>	1	2	1
	<i>TUB</i>	5	5	5
	<i>ACT7</i>	3	4	3
	<i>ACT1</i>	4	3	4
冻害处理	<i>HIS</i>	1	1	2
	<i>CYP</i>	1	4	1
	<i>ACT1</i>	4	3	4
	<i>ACT7</i>	3	5	3
	<i>TUB</i>	5	1	5

2.4 内参基因稳定性验证

为进一步验证筛选出内参基因的稳定性,本研究选择沙生蜡菊中较为稳定的 *HIS* 和 *CYP* 及最不稳定的 *TUB*, 分别对两个 *WRKY* 基因进行表达量验证。由图6可知,在以 *HIS* 和 *CYP* 作为标准化内参基因时, *WRKY70* 基因在0~1h呈下降趋势,在2~3 h呈下降趋势; *WRKY40* 基因在2~3 h变化趋势较小。而以 *TUB* 为内参基因时, *WRKY70* 基因在0~0.5 h呈上升趋势,在2~3 h呈上升趋势; *WRKY40* 基因在2~3 h呈显著上升趋势。综上可知,本研究筛选得到的内参基因的稳定性较为准确可靠。

图6 冻害胁迫下沙生蜡菊 *WRKY70*(a)和 *WRKY40*(b)的内参稳定性验证

3 结论

qRT-PCR 技术因其特异性强和灵敏度高优势,已成为检测基因表达水平的一种有效方式^[14-15]。然而,尽管 qRT-PCR 技术具有诸多优点,其实验结果仍可能受到多种技术因素的影响,例如, RNA 提取效率、反转录效率以及 PCR 扩增效率等。为了消除技术差异带来的误差,确保实验结果的可靠性,通常需要在实验中使用一组稳定的内参基因对目标基因的表达数据进行归一化处理^[9,12]。内参基因通常选择在植物体中稳定表达,参与维持基本生命活动的管家基因。内参基因筛选已在多个物种中展开。例如,拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[16]、大豆 (*Glycine max*)^[17]、番茄 (*Solanum lycopersicum*)^[18]、柴胡 (*Bupleurum marginatum*)^[19]、牡丹 (*Paeonia*)^[20]等。本研究基于沙生蜡菊转录组数据,选择了5个管家基因(*ACT1*、*ACT7*、*TUB*、*HIS* 和 *CYP*)作为候选内参基因,筛选出最适合沙生蜡菊的内参基因。

内参基因作为定量分析的参照基准,其表达稳定性是确保实验结果可靠的关键因素。研究表明,在未经系统验证的情况下随意选择内参基因,可能导致目的基因表达量评估出现数量级偏差(最高可达100倍),严重影响研究结论的可信度^[21]。本研究分别采用高稳定性内参基因(*HIS*和*CYP*)与低稳定性基因(*TUB*)对沙生蜡菊*WRKY*基因表达进行标准化,结果显示,2个*WRKY*基因呈现出不同的变化趋势。这一结果充分证实了选择合适内参基因对于准确量化基因表达的必要性。

目前,geNorm、NormFinder、BestKeeper和RefFinder常被用于内参基因筛选。例如,朋冬琴等人^[22]通过上述软件分析得到当归(*Angelica sinensis*)最适内参基因为*EEFIG*;李浩霞等人^[23]利用在线软件发现*Ef1a*为不同基因型枸杞(*Lycium chinense*)的不同组织和5个发育时期果实中表达较稳定的内参基因;张秋悦等人^[24]通过软件分析得到盐胁迫下杜梨(*Pyrus betulifolia*)叶片的最佳内参基因。本研究利用4个软件对不同处理下沙生蜡菊内参基因进行分析。在不同组织中,*CYP*和*HIS*在geNorm和RefFinder软件中表现同样稳定,*HIS*在NormFinder中表现稳定,在BestKeeper中*CYP*更为稳定,而*TUB*在三个软件中均表现为最不稳定内参。在冻害胁迫下,*CYP*和*HIS*在geNorm软件中表现稳定;*TUB*和*HIS*在NormFinder中表现较为稳定;*CYP*在BestKeeper中表现最为稳定;*HIS*在RefFinder中表现最为稳定。这些结果表明,上述软件之间也存在着一定的差别,这与其计算方式有关^[25],因此在内参选择上选择多种软件进行对比分析十分重要。

前人研究表明,内参基因的选择具有显著的物种和组织特异性。在秋石斛(*Dendrobium phalaenopsis*)中, β -actin、*TUB*及*CYP*基因在花芽发育阶段呈现稳定表达,而*CYP*、*TUB*与*PGK*基因则适用于唇瓣组织的表达分析^[26];何首乌(*Polygonum multiflorum*)中*PP2A*基因被证实具备跨组织表达稳定性^[27];红苞凤梨(*Ananas comosus* var. *bracteatus*)中*HIS*基因被推荐为组织特异性研究的参考基因^[28]。本研究基于沙生蜡菊的转录组数据,通过稳定性评估首次确定*CYP*与*HIS*基因在沙生蜡菊不同组织中表达稳定,可作为组织表达的内参基因。

植物内参基因的表达稳定性受非生物胁迫类型显著影响。张玲玲等人^[21]在梭梭(*Haloxylon ammodendron*)内参筛选时可知*ALB*在ABA处理和昼夜节律下表达较为稳定,而在干旱处理时稳定性较差;武兆昕等人^[29]研究沙芥(*Pugionium cornutum*)发现*PP2A*在ABA、MeJA和SA处理时较为稳定,而在高温处理后稳定性较差;邓嘉硕等人^[30]发现*ACT*在茄子(*Solanum melongena*)冷胁迫、热胁迫、大丽轮枝菌侵染和盐胁迫下最为稳定,在干旱胁迫下*EF2*最为稳定,水杨酸处理下*EF-1a*最为稳定。本研究发现,沙生蜡菊冻害胁迫下*HIS*稳定表达,这为沙生蜡菊在冻害胁迫下的qRT-PCR实验提供了内参基因,有助于鉴定响应冻害的基因,为作物抗寒育种提供可靠分子标记。

综上所述,*HIS*在不同组织和冻害胁迫条件下表现出较高的表达稳定性,适合作为沙生蜡菊的内参基因。本研究首次从沙生蜡菊转录组中筛选得到不同组织和冻害胁迫下合适的内参基因,这一发现为沙生蜡菊的基因表达分析提供了可靠的技术支持,同时为深入研究其耐冻害分子机制和次生代谢调控奠定了基础。

参考文献:

- [1] 阿斯亚·拜山伯,库丽夏西·马尼,白杰,等. 新疆哈萨克族传统医药柯孜木克颗粒的急性毒性及抗炎作用研究[J]. 新疆中医药,2007,25(06):27-31.
- [2] KRAMBERGER K, JENKO P Z, BARUCA A A, et al. A Comparative Study of the Antioxidative Effects of Helichrysum Italicum and Helichrysum Arenarium Infusions[J]. Antioxidants, 2021, 10:380.
- [3] RANCIC A, SOKOVIC M, VUKOJEVIC J, et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils of Myrrhis Odorata (L.) Scop, Hypericum Perforation L and Helichrysum Arenarium (L.) Moench[J]. Journal of Essential Oil Research, 2005, 17(03):341-345.
- [4] MAO Z, GAN C, ZHU J, et al. Anti-atherosclerotic Activities of Flavonoids from the Flowers of Helichrysum Arenarium L. Moench through the Pathway of Anti-Inflammation[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017, 27(12):2812-2817.

- [5] LES F, VENDITTI A, CASEDAS G, et al. Everlasting Flower (*Helichrysum Stoechas* Moench) as a Potential Source of Bioactive Molecules with Antiproliferative, Antioxidant, Antidiabetic and Neuroprotective Properties[J]. *Ind. Crops Prod*, 2017, 108: 295–302.
- [6] MIHAELA S D, CARMEN M E, DORINA L D, et al. *Helichrysum Arenarium*: From Cultivation to Application[J]. *Applied Sciences*, 2022, 12(20): 10241.
- [7] 张玉璿, 吉军, 肖鑫, 等. 杜鹃兰 qRT-PCR 内参基因的筛选及稳定性评价[J]. *农业生物技术学报*, 2024, 32(04): 926–938.
- [8] HU A S, YANG X Y, ZHU J F, et al. Selection and Validation of Appropriate Reference Genes for RT-qPCR Analysis of *Nitraria Sibirica* under Various Abiotic Stresses[J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(01): 592–606.
- [9] DERVEAUX S, VANDESOMPELE J, SHELLEMAN J. How to do Successful Gene Expression Analysis Using Real-time PCR[J]. *Methods*, 2010, 50(04): 227–430.
- [10] KANAKACHARI M, SOLANKE A U, PARBHAKARAN N, et al. Evaluation of Suitable Reference Genes for Normalization of qPCR Gene Expression Studies in Brinjal (*Solanum melongena* L.) during Fruit Developmental Stages[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 178(03): 433–450.
- [11] CHEN Y, HU B, TAN Z, et al. Selection of Reference Genes for Quantitative Real-time PCR Normalization in Creeping Bentgrass Involved in Four Abiotic Stresses[J]. *Plant Cell Rep*, 2015, 34(10): 1825–1834.
- [12] HU X, ZHANG L, NAN S, et al. Selection and Validation of Reference Genes for Quantitative Real-time PCR in *Artemisia Sphaerocephala* based on Transcriptome Sequence Data[J]. *Gene*, 2018, 657: 39–49.
- [13] GUTIERREZ L, MAURIAT M, GUENIN S, et al. The Lack of a Systematic Validation of Reference Genes: A Serious Pitfall Undervalued in Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis in Plants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6(06): 609–618.
- [14] FEDICK A, SU J, JALAS C, et al. High-throughput Real-time PCR-based Genotyping without DNA Purification[J]. *BMC Res Notes*, 2012, 5: 573.
- [15] LI H P, QIN Y X, XIAO X H, et al. Screening of Valid Reference Genes for Real-time RT-PCR Data Normalization in *Hevea Brasiliensis* and Expression Validation of a Sucrose Transporter Gene *HbSUT3*[J]. *Plant Science*, 2011, 181(02): 132–139.
- [16] CZECHOWSKI T, STITT M, ALTMANN T, et al. Genome-wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2005, 139: 5–17.
- [17] JIAN B, LIU B, BI Y R, et al. Validation of Internal Control for Gene Expression Study in Soybean by Quantitative Real-time PCR[J]. *BMC Molecular Biology*, 2008, 9(01): 59.
- [18] MARINO E R, ANDRES A B, ANDRES B P, et al. Selection of Internal Control Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Studies During Tomato Development Process[J]. *BMC Plant Biology*, 2008, 8(01): 131.
- [19] 孙哲, 杜晓蓉, 花龙, 等. 窄竹叶柴胡内参基因筛选及皂苷合成关键酶基因表达分析[J]. *草地学报*, 2023, 31(04): 1001–1007
- [20] 尚申申, 樊琳婷, 周爽, 等. 伊藤牡丹“巴茨拉”内参基因筛选及花瓣衰老相关基因的表达分析[J]. *植物生理学报*, 2023, 59(01): 153–164.
- [21] 张玲玲, 王淑冉, 张胜. 梭梭 qRT-PCR 内参基因的筛选及稳定性分析[J]. *西北植物学报*, 2023, 43(12): 2005–2017.
- [22] 朋冬琴, 罗蜜蜜, 郭欣慰, 等. 当归实时荧光定量 PCR 内参基因筛选[J]. *中草药*, 2024, 55(01): 269–278.
- [23] 李浩霞, 黄稳娥, 柳西宁, 等. 枸杞实时荧光定量 RT-qPCR 内参基因筛选与验证[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(09): 41–51.
- [24] 张秋悦, 刘昌来, 于晓晶, 等. 盐胁迫条件下杜梨叶片差异表达基因 qRT-PCR 内参基因筛选[J]. *园艺学报*, 2022, 49(07): 1557–1570.
- [25] XIE F L, WANG J Y, ZHANG B H. RefFinder: A Web-based Tool for Comprehensively Analyzing and Identifying Reference Genes[J]. *Funct. & Integr. Genomics*, 2023, 23(02): 125.
- [26] 侯天泽, 易双双, 张志群, 等. 秋石斛 RT-qPCR 内参基因的筛选与验证[J]. *园艺学报*, 2022, 49(11): 2489–2501.
- [27] 王浩, 蔡启忠, 刘露, 等. 何首乌实时荧光定量 PCR 内参基因筛选[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(01): 80–85.
- [28] 李瑞雪, 余三森, 李夏, 等. 红苞凤梨实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选[J]. *热带亚热带植物学报*, 2017, 25(03): 250–256.
- [29] 武兆昕, 商凯凡, 王萍. 沙芥 qRT-PCR 内参基因的筛选与验证[J]. *植物生理学报*, 2025, 61(03): 359–370.
- [30] 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, (08): 37–46.

Screening and Verification of Reference Genes for qRT-PCR in *Helichrysum Arenarium*(L.) Moench.

LIU Xin-xin¹, LAI Cheng-xia², GU Yu-feng¹, GE Feng-wei^{1*}

(1.Laboratory of Conservation and Regulatory Biology of Special Environmental Species in Xinjiang, College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang, 830017, China; 2.Xinjiang Cotton Technology Innovation center/Xinjiang Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement and Intelligent Production/ National Cotton Engineering Technology Research Center, Cotton Research Institute of Xinjiang Uyghur Autonomous Region Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang, 830091, China)

Abstract: Five reference genes (*ACT1*, *ACT7*, *CYP*, *HIS*, *TUB*) were selected as candidate reference genes from the transcriptome data of *Helichrysum arenarium*, and qRT-PCR was used to detect the expression levels of candidate reference genes in different tissues and under freezing stress of *Helichrysum arenarium*. geNorm, NormFinder, BestKeeper and RefFinder were used to evaluate their stability. The stability of the reference gene was verified by using *HaWRKY* gene as the target gene. The expression of *HaWRKY* gene in *Helichrysum arenarium* was analyzed to verify the effect of reference genes on the experimental results. It was found that *CYP* and *HIS* were stably expressed in *Helichrysum arenarium*, but *HIS* was stably expressed after freezing stress. In summary, *HIS* can be used as an internal reference gene of *Helichrysum arenarium*. In this study, the suitable reference genes of *Helichrysum arenarium* were obtained, which provided reliable technical support for gene expression analysis of *Helichrysum arenarium*, and also laid a foundation for further study on the molecular mechanism of freezing tolerance and regulation of secondary metabolism.

Keywords: *Helichrysum arenarium*; Internal reference gene; qRT-PCR; Gene expression analysis