

网络出版时间:2013-09-22 17:09

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130922.1709.024.html>

桉属植物内参基因的筛选及评估

黄真池¹, 欧阳乐军^{1,2}, 张 龙^{1,2}, 沙月娥^{1,2}, 曾富华¹

(1 湛江师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048; 2 湖南农业大学 生物科学与技术学院, 湖南 长沙 410128)

[摘 要] **【目的】**分析桉属植物候选内参基因的表达稳定性, 筛选合适的内参基因, 为深入研究桉属植物愈伤组织芽分化及体细胞胚胎发生过程中基因的表达变化提供参考。**【方法】**以尾巨桉、粗皮桉、尾叶桉的叶片及尾叶桉的绿色、红色和白色 3 种愈伤组织为材料, 提取其总 RNA 后逆转录得 cDNA; 分别将桉属植物 *actin* 基因和拟南芥 *actin* 基因的 GenBank 序列输入 Primer3Plus 软件, 设计 Real-time quantitative PCR (qPCR) 引物, 同时选择 *RTEF* 和 *RARS* 为候选内参基因; 以 cDNA 为模板进行 qPCR, 得 4 个候选内参基因的 *Ct* 值; 并用 RefFinder 软件分析候选内参基因的表达稳定性。**【结果】**RefFinder 软件分析结果显示, 4 个候选内参基因 *RTEF*、*RARS*、*EACT*、*AACT* 的稳定系数分别为 1.189, 1.861, 2.828 和 3.224, 基因表达稳定性由高到低依次为 *RTEF*、*RARS*、*EACT*、*AACT*。**【结论】**以 *RTEF* 为内参基因分析桉属植物的基因表达变化较为理想。

[关键词] 内参基因; 桉属; 愈伤组织; RefFinder 软件

[中图分类号] S718.43

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)10-0067-06

Selection and evaluation of internal reference genes in *Eucalyptus* species

HUANG Zhen-chi¹, OUYANG Le-jun^{1,2}, ZHANG Long^{1,2}, SHA Yue-e^{1,2}, ZENG Fu-hua¹

(1 Life Science and Technology School, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048, China;

2 College of Bioscience and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: **【Objective】**The suitable internal reference gene was selected from 4 candidate internal reference genes by evaluating their expression stabilities. **【Method】**The total RNA extracted from 6 *Eucalyptus* tissues, including the *Eucalyptus urophylla* leaf, the *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* leaf, the *Eucalipu pellida* leaf, and the green callus, the red callus and the white callus of *Eucalyptus urophylla*, was used as template to get cDNA by reverse transcription PCR. 4 candidate internal reference genes, including actin of *Eucalyptus* (*EACT* AB505624.1), actin of Arabidopsis (*AACT* NM_114519.2), *RTEF* (EQ974103.1) and *RARS* (EQ973784.1) were used to perform the real-time quantitative PCR (qPCR). Then, the *Ct* values of qPCR were analyzed by RefFinder software. **【Result】**The stability values of 4 candidate reference genes, *RTEF*, *RARS*, *EACT* and *AACT*, were 1.189, 1.861, 2.828 and 3.224, respectively. *RTEF* was the most stable gene, and *AACT* transcript showed maximum variation. **【Conclusion】***RTEF* gene was suitable for gene expression analysis as internal reference gene in *Eucalyptus species*.

Key words: reference gene; *Eucalyptus*; callus; RefFinder software

[收稿日期] 2012-12-03

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(10452404801004328, 8152404801000011, S2012010008737); 国家星火计划项目(2012GA780019, 2011GA780067)

[作者简介] 黄真池(1972—), 男, 湖南岳阳人, 副教授, 博士, 主要从事植物生理生化及分子生物学研究。

[通信作者] 曾富华(1952—), 男, 湖南浏阳人, 教授, 博士, 主要从事植物生理生化及天然产物研究。

实时定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qPCR) 灵敏度高、重复性好、特异性强, 在低丰度 RNA 的转录分析中优势明显。为了消除样品间因 RNA 提取效率、RNA 纯度及完整性不同造成的误差, 采用 qPCR 技术时需要使用内参基因进行相对定量分析。目前, 常被用作内参基因的管家基因有 *actin*、*tubulin*、*ribosomal RNA* 和 *elongation factor 1- α* 等^[1-3]。有报道表明, 这些管家基因在不同的试验条件下转录水平有明显差异^[4-6]。这种表达差异会影响 qPCR 分析的准确性, 甚至得出错误的结论^[7-8]。

近年来, 对一些模式植物, 如拟南芥、烟草、水稻等的内参基因表达的稳定性开展了较多研究^[9-10], 但对木本植物的类似研究仅见葡萄、杨树和龙眼等^[11]。Fernández 等^[12]研究了蓝桉 (*Eucalyptus globulus*) 在冷驯化条件下 6 个基因的表达情况, 发现泛素蛋白基因和 α -微管蛋白基因的表达最为稳定。de Almeida 等^[13]报道, 蓝桉插条生根时, 不管是否经生长素处理, 组蛋白 H2B 基因和 α -微管蛋白基因的表达最为稳定。Boava 等^[14]研究表明, 巨尾桉无性系在生物和非生物逆境条件下, 延长因子 2 基因和泛素蛋白基因的表达最为稳定。de Oliveira 等^[8]的研究表明, 蓖麻转录延伸因子-Ⅱ基因 (Putative transcription elongation factors-Ⅱ, *Ricinus communis* RTEF, GenBank: EQ974103. 1) 及其天门冬氨酰-tRNA 合成酶基因 (*Aspartyl-tRNA synthetase*, putative, *Ricinus communis* RARS, GenBank: EQ973784. 1) 在巨桉等 6 种桉树的叶片、木质部和花器官等组织中的表达最为稳定。

桉树具有速生、丰产、轮伐期短等特点, 是优良的纸浆用材, 经济效益显著^[15]。目前, 世界上已知桉树有 700 多种。桉树中的尾巨桉、粗皮桉和尾叶桉具有林相整齐、树干通直、木材蓄积量高等特点, 在我国华南地区栽种面积较大。目前, 国内尚未见基于 qPCR 技术筛选桉属内参基因, 并分析其表达稳定性的研究报道。因此, 本研究以尾巨桉 *actin* 基因和拟南芥 *actin* 基因作为 2 个候选内参基因; 同时, 由于不同的组织器官、生长发育阶段、生物或非生物胁迫和激素等都会影响内参基因的特异性表达^[16], 故选用 RTEF 和 RARS 基因作为另外 2 个候选内参基因; 以尾巨桉、粗皮桉和尾叶桉 3 种桉属植物的叶片和尾叶桉的绿色、红色和白色 3 种愈伤组织为材料, 分析 4 个桉属内参基因的表达稳定性, 尝试建立适用于分析桉树愈伤组织基因表达变化的体系, 为深入研究桉属植物愈伤组织芽分化及体细

胞胚胎发生过程中基因的表达变化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料包括温室栽培的 2 年生尾叶桉 (*Eucalyptus urophylla* S. T. Blake)、尾巨桉 (*Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis*) 和粗皮桉 (*Eucalyptus pellida*) 的成熟叶片, 以及按文献^[17]的方法以尾叶桉实生苗下胚轴作为外植体培养获得的绿色、红色和白色愈伤组织。

1.2 RNA 提取与反转录

称取 100 mg 新鲜叶片或愈伤组织块于液氮中研磨成粉。先用 1 mL RNAiso-mate for Plant Tissue 处理, 再按 RNAiso Plus 试剂的操作手册说明提取总 RNA, 用非变性琼脂糖凝胶电泳 (12 g/L, 6 V/cm, 恒压) 检测提取总 RNA 的品质。在 10 μ L 反应体系中分别加入 5 × gDNA Eraser Buffer 2 μ L, gDNA Eraser 1 μ L 和总 RNA 7 μ L, 瞬时离心混匀, 室温反应 5 min, 以去除总 RNA 中残存的基因组 DNA; 然后在上述反应体系中依次加入 5 × PrimeScript Buffer 4 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μ L, RT Prime Mix 1 μ L 和 RNAase-free H₂O 4 μ L, 瞬时离心混匀, 37 °C 反应 15 min, 85 °C 5 s 使酶失活, 所得产物为初始 cDNA, 用于后续标准曲线和基因表达稳定性的分析。所用试剂均为宝生物工程 (大连) 有限公司产品。

1.3 引物设计及 qPCR

根据尾巨桉 *actin* 基因 (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* mRNA, similar to *actin* sequence EACT, GenBank: AB505624. 1) 和拟南芥 *actin* 基因 (*Arabidopsis thaliana actin*-12 mRNA, complete cds AACT, NCBI Reference Sequence: NM_114519. 2) 的序列, 用 Primer3Plus 软件设计 2 对引物。分别为: EACT (扩增 268 — 510 片段): F. 5'-gttggaatgggtcagaagga-3', R. 5'-ttcgaacatgattgggtca-3'; AACT (扩增 983 — 1039 片段): F. 5'-acattgtgcttagtggtggca-3', R. 5'-caagatagagcctccgac-3'。参考 de Oliveira 等^[8]的方法设计 2 对引物, 分别为 RTEF (GenBank: EQ974103. 1): F. 5'-tc-caatccgagtcgctgtcattgt-3', R. 5'-tgatgagcctctctggttgacct-3'; RARS (GenBank: EQ973784. 1): F. 5'-agaggtgaaattccagaagcccg-3', R. 5'-cttcctttggttc-cgccaatta-3'。取 3 种桉树叶片和尾叶桉的 3 种愈伤组织材料初始 cDNA 各 30 μ L, 等体积混合得 cD-

NA 母液,设其模板数为 10^5 拷贝。再取 $30\ \mu\text{L}$ cDNA 母液进行 10 倍梯度稀释,设其模板数分别为 $10^4, 10^3, 10^2, 10^1$ 拷贝。以梯度稀释的 cDNA 溶液作模板,进行 qPCR 扩增。qPCR 反应仪器为 Chromo 4™ System(Bio-Rad)。qPCR 反应体系为:iQ™ 2×SYBR Green Supermix (2× Mix for Real-time PCR,Bio-Rad) $12.5\ \mu\text{L}$, $10\ \mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物各 $1\ \mu\text{L}$, ddH₂O $8.5\ \mu\text{L}$, 模板 $2\ \mu\text{L}$, 总体积为 $25\ \mu\text{L}$ 。扩增程序: $94\ ^\circ\text{C}\ 10\ \text{s}$, $58\ ^\circ\text{C}\ 10\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}\ 15\ \text{s}$, 延伸后荧光读数,共 40 个循环;从 $70\sim 95\ ^\circ\text{C}$, 每升高 $1\ ^\circ\text{C}$ 荧光读数 1 次。每个反应 3 次重复。用 Opticon Monitor 3.1 软件,分析 4 个内参基因的扩增效率、标准曲线斜率、相关性、目的片段解链温度等。同时,用琼脂糖凝胶电泳($18\ \text{g/L}$, $6\ \text{V/cm}$, 恒压)检测扩增产物的大小。将 6 种组织的初始 cDNA 稀释 1 倍后作为模板,按 qPCR 方法同时进行 4 个基因片段的 PCR 扩增,得 *Ct* 值。

数据处理用 DPS 3.01 软件。基因表达稳定性比较用 Cotton EST database 数据库(<http://www.leonxie.com>)的 RefFinder 软件进行综合分析。

2 结果与分析

2.1 桉属植物 RNA 的提取及品质检测

桉树组织中的多糖、酚类和醌类物质含量丰富,这些物质的化学性质与核酸相似,严重干扰 RNA 的提取;预试验中用几种市售 RNA 提取试剂盒均未能得到高品质的总 RNA,或者总 RNA 得率非常低;但桉树组织经 RNAiso-mate for Plant Tissue 预处理,再用 RNAiso Plus 提取,即可得到高品质的总 RNA。经紫外分光光度法检测,所得桉树组织总 RNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值为 $1.8\sim 2.1$ 。非变性琼脂糖凝胶电泳结果显示提取的总 RNA 完整,28S rRNA 条带亮度高,约为 18S rRNA 条带亮度的 2 倍,无可见的 DNA 污染(图 1)。

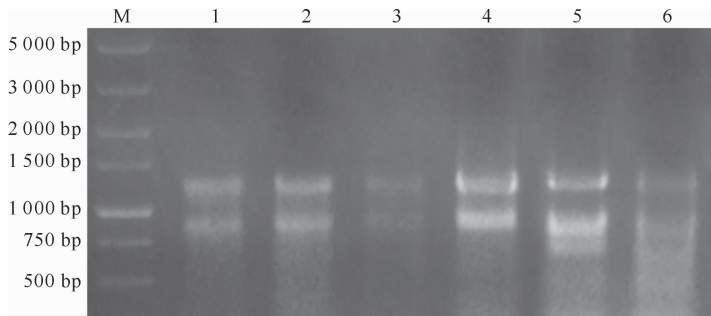


图 1 6 种桉树组织总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳结果
M. 5 kb DNA Marker;1~6. 分别对应尾叶桉绿色、红色、白色愈伤组织及尾叶桉、尾巨桉和粗皮桉叶片

Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of total RNA from 6 *Eucalyptus* tissues
M. 5 kb DNA Marker;1~6. Green callus, red callus, white callus, *Eucalyptus urophylla* leaf, *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* leaf and *Eucalyptus pellida* leaf, respectively

2.2 桉属植物 4 个候选内参基因的 qPCR 标准曲线

从图 2 可以看出,桉属组织 4 个候选内参基因 *RTEF*、*RARS*、*EACT* 和 *AACT* qPCR 的融链曲线均只有 1 个特征峰值,说明扩增特异性较好。从表 1 可以看出,以 cDNA 母液为模板扩增时, *EACT* 基

因对应的 *Ct* 值最小,说明其在 6 种材料中的综合表达量最高;Opticon Monitor 3.1 软件分析结果显示,各内参基因扩增效率为 100% 左右,标准曲线的 r^2 值大于 0.98。琼脂糖凝胶电泳结果表明,扩增片段条带整齐,无可见引物二聚体(图 3)。

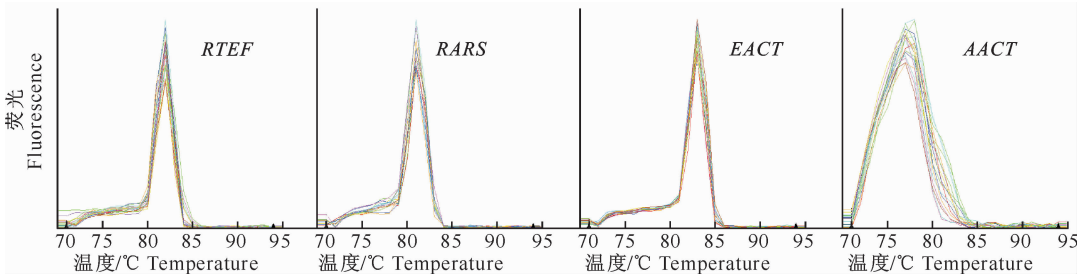


图 2 桉属 4 个候选内参基因的 qPCR 扩增融链曲线
Fig. 2 Melting curves of 4 candidate reference genes in 6 *Eucalyptus* by real-time quantitative PCR

表 1 桉属植物 4 个候选内参基因的 qPCR 标准曲线及扩增条带参数

Table 1 Real-time quantitative PCR standard curves and amplified fragments references of 4 candidate internal reference genes in *Eucalyptus* species

基因 Gene	cDNA 母液的 Ct 值 Ct value of initial cDNA solution	扩增效率/% Amplification efficiency	曲线斜率 Slope of amplification curve	r^2	条带大小/bp Fragment size	解链温度/℃ Tm
RTEF	26.8	98.8	-3.35	0.988	152	82
RARS	26.9	103.0	-3.25	0.987	155	81
EACT	22.5	99.3	-3.34	0.992	243	83
AACT	27.5	100.0	-3.32	0.987	158	78

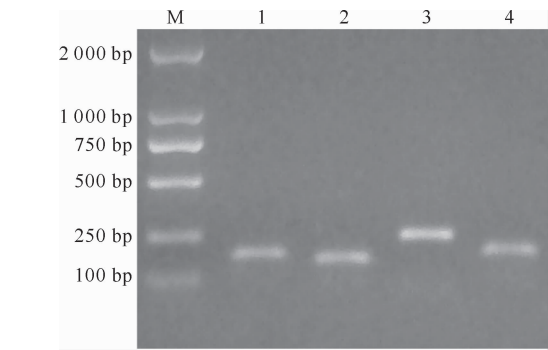


图 3 桉属植物 4 个候选内参基因 qPCR 扩增条带的琼脂糖凝胶电泳结果

M. DNA Marker; 1~4. 分别为 RARS、
RTEF、EACT 和 AACT

Fig. 3 Agarose gel electrophoretogram of amplified fragments of 4 candidate internal reference genes in *Eucalyptus* species by real-time quantitative PCR

M. DNA Marker; 1-4. Amplified fragments of
RARS, RTEF, EACT and AACT, respectively

2.3 桉属植物 4 个候选内参基因的 Ct 值

将各材料的初始 cDNA 稀释 1 倍后作为模板，进行 RT-qPCR 反应，得 Ct 值(图 4)。从图 4 可以看出，由于桉属 6 种材料的含水量、发育状态、RNA 提取得率和 RNA 完整性不同，不同材料在扩增同一基因，或同一材料在扩增不同基因时，Ct 值均有明显差异，其原因主要是同一组织中不同基因的表达强度不同。DPS 3.01 软件统计分析显示，同一扩增反应的 3 个重复的标准差很小，Ct 值非常接近，说明扩增反应重复性好，能准确反映基因的转录水平。

2.4 桉属植物 4 个候选内参基因的表达稳定性

Cotton EST database 数据库的 RefFinder 软件整合了 Delta CT、BestKeeper、Normfinder、Genorm 等内参基因稳定性分析软件，能综合评估基因的表达变化，得出可靠的结论。经分析，桉属 4 个内参基因表达的稳定性由高到低依次为 RTEF、RARS、EACT、AACT(表 2)。从表 2 可以看出，由于不同软件评价基因表达稳定性的计算方法不同，用单个

软件分析时，BestKeeper 软件的评价结果与其他 3 个软件不一致；BestKeeper 软件评价结果显示，AACT 为最适内参基因，而其他软件认为 RTEF 的表达最为稳定。由此可见，由于软件间的算法和判断标准不同，不同软件得出同一内参基因的表达稳定性系数不一致，因此评估内参基因时宜综合分析后进行排序比较。

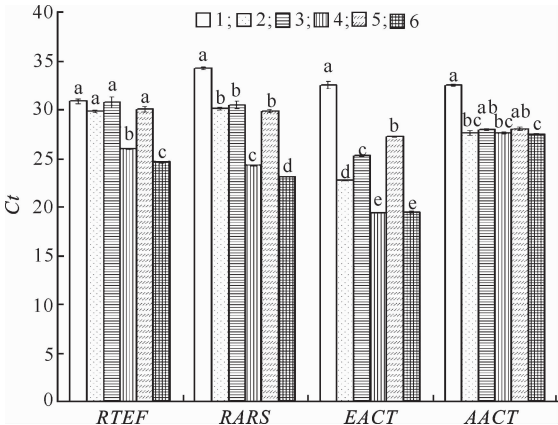


图 4 6 种桉树组织中 4 个候选内参基因 qPCR Ct 值的比较

1~3. 分别为尾巨桉、粗皮桉和尾叶桉的叶片组织；
4~6. 分别为尾叶桉的绿色、红色和白色愈伤组织

Fig. 4 Comparison of real-time quantitative PCR Ct of 4 reference genes from 6 *Eucalyptus* tissues
1-3. *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* leaf, *Eucalipu pellida* leaf, *Eucalyptus urophylla* leaf, respectively;
4-6. Green callus, red callus and white callus of *Eucalyptus urophylla*, respectively

应用 RefFinder 软件分析 6 种桉树组织，尾叶桉 3 种愈伤组织、尾叶桉叶片和 3 种愈伤组织中内参基因表达的稳定性，结果(图 5)显示，4 种内参基因的稳定性评估结果完全一致，不仅稳定性排序相同，而且稳定性系数也完全一致，均以 RTEF 的表达最为稳定；对尾巨桉、粗皮桉和尾叶桉 3 种桉树叶片的稳定系数分析结果与上述 3 种分析稍有不同，但也以 RTEF 的表达最为稳定，AACT 稳定性最低(图 5)。

表 2 桉属植物 4 个候选内参基因的表达稳定性评估

Table 2 Evaluation of the expression stabilities of 4 candidate internal reference genes in *Eucalyptus* species

软件 Software	表达稳定性由高到低排序 Ranking order of expression stabilities			
Delta CT	<i>RTEF</i> 2.37	<i>RARS</i> 2.45	<i>EACT</i> 3.14	<i>AACT</i> 3.49
BestKeeper	<i>AACT</i> 0.261	<i>RTEF</i> 2.249	<i>RARS</i> 3.322	<i>EACT</i> 3.894
Normfinder	<i>RTEF</i> 0.876	<i>RARS</i> 1.006	<i>EACT</i> 2.701	<i>AACT</i> 3.216
Genorm	<i>RTEF</i> 1.753	<i>RARS</i> 1.753	<i>EACT</i> 2.235	<i>AACT</i> 2.864
RefFinder	<i>RTEF</i> 1.189	<i>RARS</i> 1.861	<i>EACT</i> 2.828	<i>AACT</i> 3.224

注:表中数据为用软件计算得出的稳定系数,数值越小,内参基因的表达水平越稳定。
Note:Data are the stability coefficients of gene calculated by software. The smaller the value,the more stable the gene expression is.

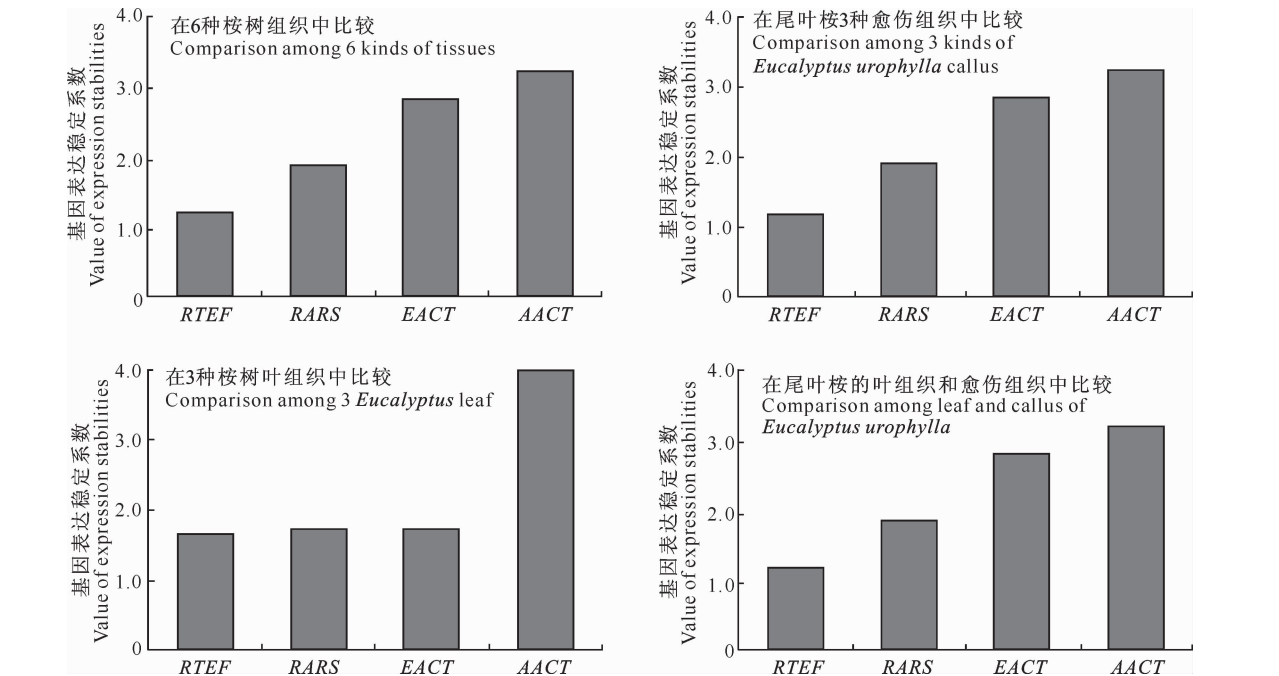


图 5 基于 RefFinder 软件评估 6 种桉树组织中 4 个候选内参基因的表达稳定性
Fig. 5 Valuation of reference genes from 6 *Eucalyptus* materials by RefFinder software

3 结论与讨论

qPCR 是分析基因表达的快捷、准确的技术,但其结果是否准确依赖于内参基因是否可信。多数研究直接选用 *actin*、*tubulin*、*ubiquitin C* 等基因作为内参基因,而未对这些基因在研究材料中的表达稳定性进行评估^[18-19];如果内参基因在不同组织或不同发育阶段的表达有明显变化,则有可能导致研究者得出完全相反的结论^[7-8]。本研究比较了桉属 *actin* 基因、拟南芥 *actin* 基因、*RTEF* 基因和 *RARS* 基因的表达稳定性,通过比对发现,桉属 *actin* 和拟南芥 *actin* 基因的表达稳定性都不够理想;*RTEF* 基因在桉属的 6 种组织中的表达均最为稳定,表明 *RTEF* 基因可作为评估桉属植物基因表达的理想内参基因。

桉属植物再生难度大,但其遗传改良又必须以

高效再生体系为基础^[20]。本研究探讨了尾叶桉愈伤组织中内参基因表达的稳定性的,证实 *RTEF* 基因可作为桉属植物基因表达变化分析的内参基因。本研究结果可为分析桉属愈伤组织芽分化和体细胞胚胎发生过程中基因表达的变化及桉属植物再生的分子机理提供参考。

[参考文献]

[1] Li L,Xu J,Xu Z H,et al. Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in *Brassica* and *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*,2005,17:2738-2753.
[2] Jeong Y M,Mun J H,Lee I,et al. Distinct roles of the first introns on the expression of *Arabidopsis* profiling gene family members [J]. *Plant Physiol*,2006,140:196-209.
[3] Nicot M,Hausman J F,Hoffmann L,et al. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress [J]. *J Exp Bot*,2005,56:2907-2914.
[4] Czechowski T,Stitt M,Altmann T,et al. Genome-wide identifi-

- cation and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139: 5-17.
- [5] Libault M, Thibivilliers S, Radwan O, et al. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization [J]. *Plant Genome*, 2008, 1: 44-54.
- [6] Hruz T, Wyss M, Docquier M, et al. RefGenes: Identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 156.
- [7] Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems [J]. *J Mol Endocrinol*, 2002, 29: 23-39.
- [8] de Oliveira L A, Breton M C, Bastolla F M, et al. Reference genes for the normalization of gene expression in *Eucalyptus* species [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 405-422.
- [9] Reid K, Olsson N, Schlosser J, et al. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development [J]. *BMC Plant Biol*, 2006, 6: 27.
- [10] Gutierrez L, Mauriat M, Guénin 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 Biotechnol J*, 2008, 6: 609-618.
- [11] Lin Y L, Lai Z X. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree [J]. *Plant Sci*, 2010, 178: 359-365.
- [12] Fernández M, Villarroel C, Balbontín C, et al. Validation of reference genes for real-time qRT-PCR normalization during cold acclimation in *Eucalyptus globulus* [J]. *Trees*, 2010, 24: 1109-1116.
- [13] de Almeida M R, Ruedell C M, Ricachenevsky F K, et al. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during *in vitro* adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill [J]. *BMC Mol Biol*, 2010, 11: 73-84.
- [14] Boava L P, Laia M L, Jacob T R, et al. Selection of endogenous genes for gene expression studies in *Eucalyptus* under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses using RT-qPCR [J]. *BMC Res Notes*, 2010, 3: 43-51.
- [15] Poke F S, Vaillancourt R E, Potts B M, et al. Genomic research in *Eucalyptus* [J]. *Genetica*, 2005, 125: 79-101.
- [16] 袁 伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择 [J]. *植物学报*, 2012, 47(4): 427-436.
Yuan W, Wan H J, Yang Y J. Characterization and selection of reference genes for real-time quantitative RT-PCR of plants [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, 47(4): 427-436. (in Chinese)
- [17] 黄真池, 欧阳乐军, 曾富华, 等. 尾叶桉的不同类型愈伤组织芽分化与某些相关生理生化指标的关系 [J]. *植物生理学通讯*, 2010, 46(2): 147-149.
Huang Z C, Ouyang L J, Zeng F H, et al. Relationship between bud differentiation and several physiological and biochemical indexes of three types of *Eucalyptus urophylla* s. t. blake callus [J]. *Plant Physiology Communication*, 2010, 46(2): 147-149. (in Chinese)
- [18] 周 琳, 王 雁, 任 磊, 等. 牡丹二氢黄酮醇 4-还原酶基因 *PsDFR1* 的克隆及表达分析 [J]. *植物生理学报*, 2011, 47(9): 885-892.
Zhou L, Wang Y, Ren L, et al. Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene psdfr1 from tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. *Plant Physiology Journal*, 2011, 47(9): 885-892. (in Chinese)
- [19] Pawłowicz I, Kosmala A, Rapacz M. Expression pattern of the *psbO* gene and its involvement in acclimation of the photosynthetic apparatus during abiotic stresses in *Festuca arundinacea* and *F. pratensis* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2012, 34: 1915-1924.
- [20] Huang Z C, Zeng F H, Lu X Y. Efficient regeneration of *Eucalyptus urophylla* from seedling-derived hypocotyls [J]. *Biol Plantarum*, 2010, 54: 131-134.