

钝裂银莲花花色素合成相关基因 qRT-PCR 内参基因的筛选

马璐琳^{1,2,*}, 段青^{1,*}, 崔光芬¹, 杜文文¹, 贾文杰¹, 王祥宁¹, 王继华^{1,**}, 陈发棣^{2,**}

(¹ 云南省农业科学院花卉研究所, 云南省花卉育种重点实验室, 国家观赏园艺工程技术研究中心, 昆明 650205; ² 南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: 为了筛选适合于钝裂银莲花类黄酮/花青素合成途径中相关基因 qRT-PCR 表达分析时的内参基因, 根据钝裂银莲花蓝/白不同花色花器官组织的转录组测序结果, 选取了多聚泛素酶基因 (polyubiquitin, *UBQ*)、微管蛋白基因 (β -tubulin, β -*TUB*)、水通道蛋白基因 (aquaporin, *AQP*)、肌动蛋白基因 (actin, *ACT*)、甘油醛-3-磷酸-脱氢酶基因 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)、组蛋白基因 (histone, *HIS*)、转录延伸因子基因 (elongation factor 1- β , *EF-1 β*) 和 60S 核糖体蛋白基因 (60S ribosomal protein L13-1, *RPL13*) 等 8 个常用内参基因作为候选基因, 以钝裂银莲花的叶片、茎秆和蓝/白色花器官等不同组织为试验材料, 通过 qRT-PCR 检测这 8 个候选内参基因的表达情况, 利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 等软件对其稳定性进行分析评价。结果表明: 8 个候选内参基因中, *UBQ* 表现最稳定, 而 β -*TUB* 相对稳定性最差。以最稳定的 *UBQ* 为内参对钝裂银莲花类黄酮/花青素合成途径中 16 个相关基因表达情况进行 qRT-PCR 分析, 结果与前期转录组测序结果一致。*UBQ* 为钝裂银莲花花色素合成途径相关基因表达分析的最适内参基因。

关键词: 钝裂银莲花; 实时荧光定量 PCR; 内参基因; 筛选; 稳定性; 类黄酮/花青素合成途径

中图分类号: S 682

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2021) 02-0377-12

Selection and Validation of Reference Genes for qRT-PCR Analysis of the Correlated Genes in Flower Pigments Biosynthesis Pathway of *Anemone obtusiloba*

MA Lulin^{1,2,*}, DUAN Qing^{1,*}, CUI Guangfen¹, DU Wenwen¹, JIA Wenjie¹, WANG Xiangning¹, WANG Jihua^{1,**}, and CHEN Fadi^{2,**}

(¹ Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Flower Breeding Key Lab, National Engineering Research Center for Ornamental Horticulture, Kunming 650205, China; ² College Horticulture of Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to screen the appropriate reference genes for qRT-PCR analysis of the flavonoids/

收稿日期: 2020 - 09 - 27; **修回日期:** 2020 - 12 - 10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31960612); 云南省农业科学院应用基础研究重点项目 (YJZ201701); 云南省科技领军人才计划项目 (2016HA005); 云南省现代农业花卉苗木产业技术体系建设项目 (2017KJTX0010); 云南省重大科技专项计划项目 (2019ZG006)

* 同等贡献作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wangjh0505@sohu.com; chenfd@njau.edu.cn)

anthocyanins biosynthetic pathway related genes of *Anemone obtusiloba*, eight traditional reference genes including polyubiquitin (*UBQ*), β -tubulin (β -*TUB*), aquaporin (*AQP*), actin (*ACT*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), histone (*HIS*), elongation factor 1- β (*EF-1 β*) and 60S ribosomal protein L13-1 (*RPL13*) were selected as candidate reference genes based on the RNA-seq data of *A. obtusiloba* blue/white flowers. The expression of eight candidate reference genes were assessed by qRT-PCR in different tissues such as leaves, stems and blue/white different color flowers of *A. obtusiloba*, and the stability of them were analyzed by geNorm, NormFinder and BestKeeper programs. The relative expression of some pigments synthesis related genes in the biosynthetic pathway of flavonoids/anthocyanins were assessed to confirm the utility of the most stable reference gene. The results showed that *UBQ* was the most stable reference gene, while the stability of β -*TUB* was the lowest among all candidate reference genes. The qRT-PCR results of several pigments synthesis related genes using *UBQ* as the reference gene were in accordance with the results of RNA-seq. Thus, it was concluded that *UBQ* was the most suitable reference gene for gene expression analysis of flower pigments biosynthetic pathway in *A. obtusiloba*.

Keywords: *Anemone obtusiloba*; qRT-PCR; reference gene; selection; stability; flavonoids/anthocyanins biosynthetic pathway

实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 由于具有定量准确、特异性强、敏感度高、重复性好等特点而被广泛用于目标基因表达水平的检测和定量研究 (Bustin, 2002; Huggett et al., 2005; Kou et al., 2017)。但 qRT-PCR 结果的准确性受 RNA 质量、反转录效率、引物特异性、初始样品量及扩增效率等因素的影响 (Nolan et al., 2006; Kou et al., 2017)。为了确保 qRT-PCR 结果的准确性, 需要引入 1 个或多个表达稳定的内参基因来进行校正和标准化 (Quackenbush, 2002; Xu et al., 2017)。在植物学研究中, 一些相对表达量较高且稳定的看家基因 (house-keeping gene) 如多聚泛素酶基因 (polyubiquitin, *UBQ*)、微管蛋白基因 (tubulin, *TUB*)、肌动蛋白基因 (actin, *ACT*)、甘油醛 - 3 - 磷酸 - 脱氢酶基因 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)、转录延伸因子基因 (elongation factor, *EF*) 以及 18S 核糖体 RNA 基因 (*18S rRNA*, *18S*) 等, 常被用作内参基因 (孙美莲 等, 2010; Debashree & Joshua, 2014; 付媛媛 等, 2014; 蒋婷婷 等, 2015; 刘传娇 等, 2015; 朱海生 等, 2016; Xu et al., 2017; Liu et al., 2018; 刘晓婷 等, 2018; Chen et al., 2019; 宋晓波 等, 2019; Zhang et al., 2019; 乔永刚 等, 2020)。理想的内参基因应在所有生理状态下的细胞和样品类型中均能较稳定地表达 (孙美莲 等, 2010; 袁伟 等, 2012; Liu et al., 2018)。然而近年来大量研究表明, 并没有表达绝对稳定的基因, 任何一种看家基因的所谓恒定表达都只是在一定类型的细胞或试验因素作用下的稳定 (Volkov et al., 2003; Song et al., 2008; Yi et al., 2012; 蒋婷婷 等, 2015)。因此, 根据不同物种、样品材料和试验条件筛选适合的内参基因至关重要 (袁伟 等, 2012; Liu et al., 2018; 马璐琳 等, 2019)。

钝裂银莲花 (*Anemone obtusiloba*) 为毛茛科 (Ranunculaceae) 银莲花属 (*Anemone* L.) 多年生草本植物, 主要分布于中国的西藏南部和东部以及四川西部等地 (中国植物志, 1980)。由于其生长海拔高、生境分布广泛、进化程度较低, 作为毛茛科的一类原始类群, 是很好的分子学研究材料 (赵志刚, 2006; 胡春 等, 2013)。笔者前期已完成钝裂银莲花蓝/白不同花色花器官组织的转录组测序工作, 从转录组测序结果中发现了一批与钝裂银莲花花色形成相关的类黄酮/花青素合成途径基因,

拟通过 qRT-PCR 对这些基因的表达情况进行分析, 同时验证转录组结果的准确性。本研究中从该转录组测序结果数据库中初步筛选了 8 个常用的内参基因, 通过 qRT-PCR 对它们在钝裂银莲花的叶片、茎秆和蓝/白不同花色花器官等样品组织中的表达稳定性进行比较评价, 以期筛选出适合于钝裂银莲花相关基因表达最稳定的内参基因, 同时也为其目标基因表达研究提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 试材及取样

以自然生长于云南省迪庆州香格里拉县城郊外的野生钝裂银莲花为试验材料。2018 年 6—7 月于钝裂银莲花花期选择同一地点发育程度、大小等条件一致的植株, 分别采取叶片、茎秆及完全开放的蓝色和白色的花器官等组织 (图 1), 用液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱备用 (因钝裂银莲花植株矮小, 单个植株的取样量难以满足试验需要, 所以本研究中及之前转录组测序中所用试材均是选取约 50 株钝裂银莲花的样品材料的混合样)。3 次重复。叶片、茎秆、及蓝/白色花器官等样品用于内参基因稳定性分析, 蓝/白两种不同花色花器官材料用于之前的转录组测序分析及本研究中类黄酮/花青素合成途径中目标基因表达情况的 qRT-PCR 检测分析。

RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; HiScript II Q RT Super Mix for qPCR (+gDNA wiper)、 $2\times$ Taq Master Mix 等购自南京诺唯赞生物科技有限公司; QuantiFast[®] SYBR[®] Green PCR Kit 试剂盒购自德国 Qiagen 公司, 其他常规试剂均购自北京全式金生物技术有限公司。



图 1 钝裂银莲花

Fig. 1 *Anemone obtusiloba*

1.2 候选内参基因筛选

根据已测序完成的钝裂银莲花蓝/白 2 种不同花色花器官组织的转录组结果数据, 以估算的基因表达量 FPKM 值大于 100 (转录组测序结果以 FPKM 值大于 60 作为目标基因表达明显的指标), 且

样品间 (Fragments per kilobase per million) FPKM 值基本一致作为筛选标准 (马璐琳 等, 2019), 筛选了 8 个较常用的内参基因 (表 1) 进行稳定性分析。

表 1 根据钝裂银莲花转录组测序结果筛选到的 8 个候选内参基因
Table 1 Eight candidate reference genes in RNA-seq libraries of *Anemone obtusiloba*

基因 ID Gene ID	FPKM 蓝花 Blue flower			白花 White flower			比对结果 Blast result	基因 Gene
	1	2	3	1	2	3		
DN35855_c0_g1_i10_1	354.26	385.74	422.52	336.35	354.00	390.89	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [<i>Gynura bicolor</i>] (GenBank: AB550243.1)	<i>GAPDH</i>
DN24449_c0_g1_i2_1	314.43	331.50	366.20	272.08	300.62	327.47	Elongation factor 1-beta 2-like [<i>Pistacia vera</i>] (NCBI reference sequence: XM_031416658.1)	<i>EF-1β</i>
DN38564_c0_g2_i1_1	434.91	450.67	464.33	473.54	517.63	522.32	Actin 7 [<i>Prunus dulcis</i>] (GenBank: BBH05534.1)	<i>ACT</i>
DN25341_c0_g2_i1_2	153.63	173.57	173.87	143.18	160.60	185.16	Tubulin beta chain [<i>Ricinus communis</i>] (NCBI reference sequence: XM_025156136.1)	<i>β-TUB</i>
DN24929_c0_g1_i4_2	1 016.78	975.95	933.45	1 206.08	1 170.53	1 067.26	Polyubiquitin, partial [<i>Wolffia australiana</i>] (GenBank: AEZ49160.1)	<i>UBQ</i>
DN34836_c0_g2_i6_2	1 052.09	1 172.91	1 294.86	1 140.09	1 193.46	1 301.07	Aquaporin TIP1-2 [<i>Brassica rapa</i>] (NCBI reference sequence: XP_009129499.)	<i>AQP</i>
DN24035_c0_g1_i2_1	131.24	122.16	141.00	106.95	108.04	119.61	Histone H2A variant 1 [<i>Phalaenopsis equestris</i>] (NCBI reference sequence: XP_020573071.1)	<i>HIS</i>
DN25248_c0_g2_i7_1	197.63	210.20	236.21	157.42	172.19	188.42	60S ribosomal protein L13-1 [<i>Camellia sinensis</i>] (NCBI reference sequence: XP_028086825.1)	<i>RPL13</i>

同时根据转录组测序 KEGG 数据, 选取钝裂银莲花类黄酮/花青素合成途径中的 16 个花色素合成相关基因 (其中有 6 个基因在钝裂银莲花的蓝/白 2 种不同花色的花器官组织中差异表达) (表 2), 对最终筛选到的内参基因进行评价鉴定。

表 2 钝裂银莲花转录组测序数据中的类黄酮/花青素合成途径中 16 个相关基因
Table 2 Some genes in the flavonoids/anthocyanins pathways of *Anemone obtusiloba*

KEGG 途径 KEGG pathway	基因表达情况 (白花为对照) Gene expression (White flower was the control group)	基因 ID Gene ID	FPKM 蓝花 Blue flower			白花 White flower		
			1	2	3	1	2	3
类黄酮生物合成 Flavonoid biosynthetic	上调 Up	DN26579_c0_g1_i3_2	569.86	469.94	406.45	109.46	98.07	113.44
	上调 Up	DN27520_c0_g1_i2_2	341.41	278.90	233.47	38.08	29.97	27.08
	上调 Up	DN27888_c0_g1_i1_1	1 023.47	839.09	694.98	89.89	74.08	65.41
	上调 Up	DN34928_c0_g1_i4_1	237.71	182.14	158.62	19.84	21.50	18.22
	上调 Up	DN37635_c0_g1_i7_1	390.62	309.90	252.52	27.24	22.26	25.06
	无差异 No-difference	DN29460_c0_g1_i3_1	1.66	2.73	1.54	1.08	0.85	0.93
	无差异 No-difference	DN29383_c0_g1_i2_1	16.90	15.95	20.66	9.54	11.30	13.71
	无差异 No-difference	DN32877_c0_g1_i3_2	64.45	55.33	49.30	53.18	40.37	68.46
	无差异 No-difference	DN32877_c0_g2_i5_2	132.45	137.58	136.64	119.78	124.61	149.95
	无差异 No-difference	DN33447_c0_g1_i2_2	99.69	101.66	84.61	93.18	87.51	108.33
	无差异 No-difference	DN34032_c0_g1_i1_1	100.37	101.35	92.38	92.69	86.81	93.82
	无差异 No-difference	DN34871_c2_g3_i1_2	34.07	41.26	40.60	34.36	36.08	45.69
	无差异 No-difference	DN35887_c0_g1_i1_2	133.36	129.04	121.26	96.60	102.29	115.96
	无差异 No-difference	DN36570_c0_g2_i4_1	81.57	91.62	87.44	81.32	80.35	109.16
花青素生物合成 Anthocyanin biosynthetic	上调 Up	DN36200_c0_g1_i3_1	589.72	479.41	394.60	57.97	47.95	45.82
	无差异 No-difference	DN35376_c0_g1_i4_2	31.79	31.73	30.26	37.08	37.12	34.80

根据候选基因核苷酸序列通过 Roche LCPDS2 软件设计 qRT-PCR 引物并交由北京擎科新业生物技术有限公司合成 (表 3)。

表 3 引物列表
Table 3 Primers in this study

用途 Purpose	基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物长度/bp Product length
内参基因 Reference gene	<i>GAPDH</i>	F: ATGGGTGTGAATGAGAAGGA; R: CGTGGACGGTTGTCATAAG	142
	<i>EF1-β2</i>	F: GAAAGAGAGTGGCAAATCCT; R: GCATCTCGATGCTGCGAA	101
	<i>ACT</i>	F: GCCGTGCTTCTCTCTATG; R: TTGGGACTGTGTGGCTAAC	82
	<i>β-TUB</i>	F: ATATCCCACTCACTGGACT; R: ACTGTTCTGAACTCTGCG	90
	<i>UBQ</i>	F: CTTTGCCGGGAAACAATTAG; R: GACGGAGCACCAAGTGAA	86
	<i>AQP</i>	F: CCGGCGGAAAGTCTTATAAT; R: AATGTTTCCACCGAGAAGAG	135
	<i>HIS</i>	F: AGCTTGATACACTGATCAAAGG; R: GGTAGACTTGTTGATGAGTGAC	83
	<i>RPL13</i>	F: TGCAGTTACTCAGCTCACAG; R: CTTTGAAGGCTTTCATCTCCTC	98
鉴定基因 Identification gene	DN26579_c0_g1_i3_2	F: AAGACGTGGATCACGGTTA; R: CTTGAACCTCCCATTGCT	90
	DN27520_c0_g1_i2_2	F: GCACCGAAGAGGAATGCAA; R: GTCGATAACTGGAATCTGCG	86
	DN27888_c0_g1_i1_1	F: GTGGTGGCGGAGATGTTA; R: CCTTTGGTGAGAAACACTCG	83
	DN34928_c0_g1_i4_1	F: CCTAGTGACAAAGGTGCTG; R: TTAGTAAGTCGTCCATGCCG	95
	DN37635_c0_g1_i7_1	F: ATGCCTCCTAGCCTGCTAA; R: TACCAGTTGAACCTGTTTCAGA	84
	DN29460_c0_g1_i3_1	F: ATCAACCTCTCCCTTATAGACC; R: TTTCGTTCTTCTCCCTGAGT	82
	DN29383_c0_g1_i2_1	F: ACCAAGATCAAGAATGGCG; R: TTGATATTGTGTCGGTGAGC	122
	DN32877_c0_g1_i3_2	F: GAACGGATCTGTTGTCGC; R: GGTAGCTGGCAAATCTCAAT	126
	DN32877_c0_g2_i5_2	F: TGGCAATGGACATAAACCG; R: CTTTGAACCTCAATCTTGTGACC	87
	DN33447_c0_g1_i2_2	F: TGACCACTGGTACAACGC; R: GACTGTAGTCCGATGAAACAC	115
	DN34032_c0_g1_i1_1	F: GGAGGAGGAATCATTTGCC; R: TCAACGAAATGTTGCTTAGCG	117
	DN34871_c2_g3_i1_2	F: ACCAAGATCAAGAATGGCG; R: TTGATATTGTGTCGGTGAGC	122
	DN35887_c0_g1_i1_2	F: CACCATGATCTTGCCATTAAAC; R: CATTAGCTTTCCAGTAGGCG	80
	DN36570_c0_g2_i4_1	F: GAACGGATCTGTTGTCGC; R: AGCCAAAGCCTTGTTAAGT	94
	DN36200_c0_g1_i3_1	F: CAGGAATGTCATCTGTACGG; R: ATGCAACAAGTTACCCAAGTAG	80
	DN35376_c0_g1_i4_2	F: TGCTTCTTCCCTCACCTG; R: TTCTCGTGGCAAATCCCG	130

1.3 候选内参基因 qRT-PCR 分析

按照 RNaprep Pure 总 RNA 提取试剂盒说明书提取钝裂银莲花不同样品组织总 RNA, 利用 NanoDrop 2000 分光光度计检测总 RNA 浓度及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值, 再通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性。按照 HiScript II Q RT Super Mix for qPCR 说明书将总 RNA 合成 cDNA, 合成的 cDNA 稀释后置于 - 20℃冰箱保存备用。

利用 LightCycler® 480 II 型荧光定量 PCR 仪 (罗氏, 瑞士), 参照 QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 反应。qRT-PCR 反应体系: cDNA 1 μL, 上、下游引物 (10 μmol · L⁻¹) 各 0.2 μL, 2× QuantiFast® SYBR® Green PCR Master Mix 5 μL, Nuclease-free H₂O 3.6 μL; 反应程序: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 10 s, 60℃退火 + 延伸 30 s, 40 个循环。每反应设置 3 次技术重复。反应结束后通过熔解曲线检测产物特异性: 从 60℃缓慢升温至 97℃, 每升温 1℃采集 5 次荧光信号 (马璐琳 等, 2019)。

1.4 候选内参基因稳定性分析及最适内参基因鉴定

通过 Microsoft Excel 2016 对 qRT-PCR 原始 C_t 值进行计算得出平均 C_t 值 (Mean C_t)。再利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件分析候选内参基因在钝裂银莲花 12 个组织样品中的稳定性。geNorm 和 NormFinder 在分析数据时, 先将每个样品的原始 C_t 值根据公式 $Q = 2^{C_{t\min} - C_{t\text{sample}}}$ (C_{t min} 为依次从各候选内参基因中选出的各样品中的最小 C_t 值, C_{t sample} 为该候选内参基因的各样品 C_t 值) 算出相对表达量 Q, 再将 Q 值输入 geNorm 或 NormFinder 软件, 计算得到各内参基因的平均表达稳

定值 (M 或 S), 该值的大小反映了基因稳定性的高低 (王彦杰 等, 2017; 马璐琳 等, 2019)。利用 BestKeeper 软件通过直接分析各候选内参基因原始 C_t 值之间的标准差 (standard deviation, SD) 和变异系数 (co-variance, CV) 即可筛选出最适内参基因。 SD 和 CV 值越小, 基因表达越稳定, 若 SD 值大于 1, 说明该基因稳定性较差 (王彦杰 等, 2017; 马璐琳 等, 2019)。根据 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件分析得到的候选内参基因的稳定性值, 再采用几何平均值法 (Chen et al., 2011) 计算 8 个候选内参基因表达稳定性的综合排名, 通过综合排名筛选出表现最稳定的内参基因。

以表现最稳定的候选基因 *UBQ* 作为内参, 对从钝裂银莲花转录组测序结果中筛选到的类黄酮/花青素合成途径中的 16 个花色素合成相关基因在裂银莲花蓝/白不同花色花器官组织中的表达量进行 qRT-PCR 分析。qRT-PCR 反应体系及程序等参照 1.3。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算不同样品材料之间的基因表达变化, 统计学分析采用平均数 \pm 标准差方式, 蓝/白花色花器官组织样品间比较采用独立样本 t 检验 ($\alpha = 0.01$) (马璐琳 等, 2017), $P < 0.01$ 被认为差异极显著。运用 Microsoft Excel 2016 和 R 3.2.3 软件处理数据, 绘制图表。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因的 qRT-PCR

8 个候选内参基因的 qRT-PCR 熔解曲线均表现为明显的单一峰, 不存在引物二聚体, 说明每个内参基因的引物特异性好, 专一性高, 结果准确可靠, 符合 qRT-PCR 标准。在钝裂银莲花的叶片、茎秆及蓝/白花色花器官中, 8 个候选内参基因的平均 C_t 值介于 21.075 (*ACT*) ~ 31.269 (*EF1- β 2*), 波动较大; 而单个候选内参基因的平均 C_t 差异较小。 C_t 值与表达量成反比, 因此 *ACT* 的表达量最高, *EF1- β 2* 的表达量最低, 其他候选内参基因 C_t 值介于二者之间。

分析样品中每个候选内参基因的 C_t 平均值、 SD 和 CV (表 4), *ACT* 变异系数最低 (1.658%), 稳定性也最好, 而 *β -TUB* 的稳定性较差 (CV 为 6.270%)。

表 4 候选内参基因 C_t 值分析
Table 4 Analysis of the C_t values of candidate reference genes

内参基因 Reference gene	最大值 Maximum value	最小值 Minimum value	平均值 Mean	标准差 SD	变异系数/% CV
<i>GAPDH</i>	22.86	21.81	22.315	0.381	1.709
<i>EF1-β2</i>	31.99	30.38	31.269	0.614	1.963
<i>ACT</i>	21.77	20.60	21.075	0.349	1.658
<i>β-TUB</i>	27.02	23.03	24.289	1.523	6.270
<i>UBQ</i>	22.96	21.51	22.184	0.586	2.641
<i>AQP</i>	22.06	20.51	21.150	0.599	2.831
<i>HIS</i>	27.82	26.03	27.006	0.714	2.645
<i>RPL13</i>	25.66	23.04	24.303	1.091	4.490

2.2 候选内参基因的稳定性

利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件对 8 个候选内参基因的稳定性进行分析 (表 5)。geNorm 软件是根据计算所得的 M 值来表示候选基因的表达稳定性, M 值越小则稳定性越好 (杨丹 等, 2017)。本研究 geNorm 分析结果表明: 除了 *β -TUB* 的 M 值大于 1 外, 其他 7 个候选内参基因的 M 值相对都较低 (0.413 ~ 0.644), 其中 *UBQ* 的 M 值最低 (0.413), 其稳定性最好, 也最适合

作为内参基因。NomFinder 软件是根据候选基因的表达稳定值 (stability value, SV) 选出稳定性最好的基因, SV 值越小, 候选基因越稳定 (杨丹 等, 2017)。本研究中 NormFinder 分析结果也是 β - TUB 的 SV 值最大, UBQ 的 SV 值最小, 其稳定性也最好。BestKeeper 软件是通过导入 C_t 值来计算获得候选内参基因在所有样品中的 SD 值。BestKeeper 分析结果也显示 β - TUB 的 SD 值最大 (1.283), 为最不稳定的内参基因; 但表现最稳定的基因却为 ACT (SD 值为 0.282)。BestKeeper 分析筛选出表现最稳定的内参基因与 geNorm 和 Normfinder 的分析结果不一致。

表 5 候选内参基因稳定性分析
Table 5 Stability analysis of candidate reference genes

排序 Ranking	geNorm		NormFinder		BestKeeper	
	内参基因 Reference gene	M 值 M	内参基因 Reference gene	稳定值 SV	内参基因 Reference genes	标准差 SD
1	UBQ	0.413	UBQ	0.068	ACT	0.282
2	$EF1-\beta 2$	0.425	AQP	0.071	$GAPDH$	0.356
3	AQP	0.441	$EF1-\beta 2$	0.113	AQP	0.531
4	HIS	0.460	HIS	0.160	UBQ	0.567
5	$GAPDH$	0.535	ACT	0.287	$EF1-\beta 2$	0.574
6	ACT	0.543	$GAPDH$	0.311	HIS	0.678
7	$RPL13$	0.644	$RPL13$	0.325	$RPL13$	1.055
8	β - TUB	1.128	β - TUB	0.784	β - TUB	1.283

对 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 个软件分析出的 8 个候选内参基因的稳定性进行综合性 (几何平均数) 评价结果 (表 6) 表明: UBQ 稳定性最高, 最适合作为本研究的内参基因, 而 β - TUB 稳定性最低, 相对也最不适合用来作为本研究中的内参基因。

表 6 候选内参稳定性综合排序分析
Table 6 The comprehensive ranking of stability of candidate reference genes

排序 Ranking	内参基因 Reference gene	几何平均数 Geomean of ranking values
1	UBQ	1.587
2	AQP	2.621
3	$EF1-\beta 2$	3.107
3	$GAPDH$	3.107
5	ACT	3.915
6	HIS	4.579
7	$RPL13$	7.000
8	β - TUB	8.000

2.3 最适内参基因稳定性鉴定

以筛选出的 UBQ 作为内参基因, qRT-PCR 分析结果 (图 2) 显示: 16 个花色素合成相关基因中有 6 个 unigene 表现为差异表达, 以钝裂银莲花白色花器官为对照, 蓝色花中这 6 个 unigene 全部上调表达, 其他 10 个 unigene 表达无差异。这 16 个花色素合成相关基因在钝裂银莲花蓝/白色花器官组织中总的表达规律 (如: 上调或无差异表达) 以及单个基因的表达趋势 (如: 上调表达的倍数) 的 qRT-PCR 检测结果与转录组测序分析结果 (表 2) 相一致。

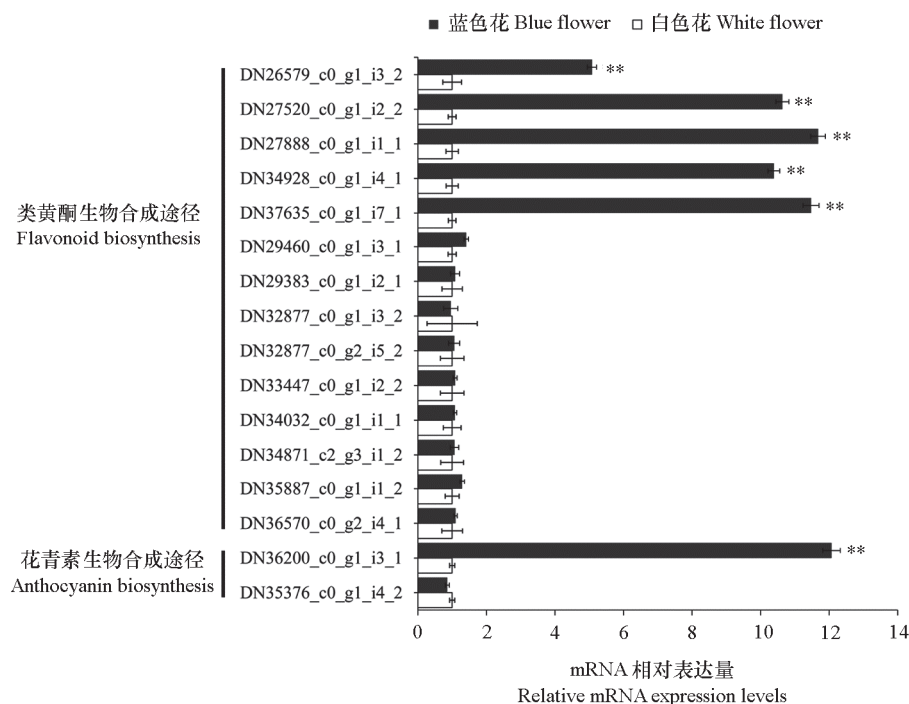


图 2 钝裂银莲花类黄酮/花青素合成途径中相关基因的 qRT-PCR 表达结果

Fig. 2 The qRT-PCR expression pattern of the pigments synthesis related genes in the flavonoids/anthocyanins pathways of *Anemone obtusiloba*

$\alpha = 0.01$.

3 讨论

植物花瓣中的色素类型主要有类黄酮/花青素 (flavonoids/anthocyanins)、类胡萝卜素 (carotenoids) 和甜菜碱素 (betalains) 等 3 种, 每种色素的合成过程皆涉及多个相关基因 (Tanaka & Ohmiya, 2008; Tanaka et al., 2008)。类黄酮/花青素类色素是调控花色变异幅度最大的一类色素 (Forkmann et al., 1991)。

对于类黄酮/花青素合成途径中相关基因表达情况的分析, 不同的研究者所选用的内参基因也不尽相同: Kriangphan 等 (2015) 以 *18S* 作为内参基因对石斛兰 (*Dendrobium* Hybrids) 类黄酮/花青素合成途径中的 8 个花色素合成相关基因在 4 种花色的花器官中的表达情况进行了 qRT-PCR 分析; Lou 等 (2014) 是以 *ACT* 作为内参基因对蓝/白色葡萄风信子 (*Muscari armeniacum*) 花蕾中部分花色素合成相关基因的表达情况进行了 qRT-PCR 检测; Ahn 等 (2015) 是以 β -*ACT* 对结缕草 (*Zoysia japonica* Steud.) 的绿/紫色穗组织转录组测序结果中筛选到的 2 个类黄酮/花青素合成途径中的差异表达基因进行了 qRT-PCR 验证; 马璐琳等 (2019) 也是以从西南鸢尾 (*Iris bulleyana* Dykes) 的蓝色花和白花西南鸢尾 (*I. bulleyana* Dykes f. *alba* Y. T. Zhao) 的白色花转录组测序结果中筛选到的 1 个表现最稳定的 *ACT* 作为内参基因, 对西南鸢尾蓝/白花器官组织中部分花色素合成相关基因的表达情况进行了 qRT-PCR 鉴定; 而 Ma 等 (2016) 则是以 *TUB* 为内参基因对紫薯 (*Ipomoea batatas* L.) 及其果肉和果皮都由紫色变为白色的突变材料的类黄酮/花青素合成途径中部分相关基因在紫/白薯中的表达情况进行了 qRT-PCR 分析; 徐凌云等 (2017) 以 1 个 *TUB* 基因作为内参对从转录组测序

结果筛选到的类黄酮/花青素合成途径中的 2 个基因在黄色的喜盐鸢尾 (*Iris halophila* Pall) 及其花色变种—蓝花喜盐鸢尾 [*I. halophila* Pall. var. *sogdiana* (Bung) Grubov] 中进行了 qRT-PCR 表达差异分析; Yoshihara 等 (2005, 2006) 则是用 *AQP* 基因作为内参对来自于荷兰鸢尾 (*I. hollandica* Hort. cv.) 类黄酮/花青素合成途径中 2 个基因的表达量进行 RT-PCR 分析。本研究中根据钝裂银莲花蓝/白不同花色花器官的转录组测序数据筛选了 8 个常用内参基因, 通过 qRT-PCR 分析他们的表达量, 同时结合 3 个不同软件分析它们的稳定性, 综合评价筛选出在钝裂银莲花不同组织部位中表现最稳定的内参基因为 *UBQ*, 同时也适合作为花色素合成途径相关基因表达分析的内参基因, 与部分学者的研究结果 (Hyun et al., 2012; Yi et al., 2012; 蒋婷婷 等, 2015; 刘传娇 等, 2015) 一致。而前人研究中应用较多的 *TUB* 类基因在本研究中却表现最不稳定。

以筛选到的表现最稳定的 *UBQ* 作为内参基因, 对部分花色素合成相关基因的表达量 qRT-PCR 验证发现: qRT-PCR 结果与转录组测序结果及钝裂银莲花的表型特征都一致。同一类同源基因在亲缘关系相近的物种中保守性相对会更高, 因此本研究筛选出的内参基因 *UBQ* 不仅可用作钝裂银莲花不同花色材料 (或品种) 间类黄酮/花青素合成途径花色素合成相关基因表达量分析的内参基因, 也可为与钝裂银莲花亲缘关系较近的银莲花属其他植物的同类型基因表达分析内参基因的选择提供一定参考。同时, 该内参基因在钝裂银莲花的叶片、茎秆及花器官等不同组织表现稳定, 因此也可作为银莲花属其他植物的叶、茎、花等不同部位组织间目标基因表达分析的内参基因。另外, 相比直接引用其他物种 (或试验条件下) 的内参基因, 从物种本身 (或一定试验条件下) 材料的转录组测序数据中可能会筛选到更适合于本物种 (或本试验条件下) 的内参基因, 尤其对于一些相关研究基础相对较薄弱的物种, 这也与前人的结果一致, 如: 杨丹等 (2017) 根据转录组测序数据筛选适合于平欧杂种榛 (*Corylus heterophylla* Fisch. × *Corylus avellana* L.) 的内参基因 *ChaActin* 和 *Ch18S rRNA*; Kou 等 (2017) 根据转录组测序数据筛选到适合桃 (*Prunus persica* L. Batsch) 的内参基因 *PpMUB6*; Liu 等 (2018) 利用转录组测序结果筛选到黑麦草 (*Lolium multiflorum*) 最稳定的内参基因 *Unigene14912* 等; 马璐琳等 (2019) 从西南鸢尾的蓝/白色花器官转录组测序结果中筛选到 1 个相比台湾百合 (*Lilium formosanum* Wallace) *18S* 基因表现更稳定的 *ACT* 内参基因; Zhang 等 (2019) 通过转录组测序结果筛选到适合于雷公藤 (*Tripterygium wilfordii*) 的内参基因 *ACTIN7* 和 *TBP* (TATA-box binding protein)。

本着对野生资源的保护性开发利用的理念, 本研究中仅选取了钝裂银莲花的地上部位组织作为试验材料, 没有挖取钝裂银莲花的地下根部组织。本研究中筛选出的表现最稳定的内参基因在钝裂银莲花的根中是否也稳定还有待验证。

References

- Ahn J H, Kim J S, Kim S, Soh H Y, Shin H, Jang H, Ryu J H, Kim A, Yun K Y, Kim S, Kim K S, Choi D, Huh J H. 2015. *De novo* transcriptome analysis to identify anthocyanin biosynthesis genes responsible for tissue-specific pigmentation in zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *PLoS ONE*, 10 (4): e0124497
- Bustin S A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29 (1): 23 - 39.
- Chen C B, Wu J Y, Hua Q Z, Tel-Zur N, Xie F F, Zhang Z K, Chen J Y, Zhang R, Hu G B, Zhao J T, Qin Y H. 2019. Identification of reliable reference genes for quantitative real-time PCR normalization in pitaya. *Plant Methods*, 15: 70.
- Chen D L, Pan X P, Xiao P, Farwell M A, Zhang B H. 2011. Evaluation and identification of reliable reference genes for pharmacogenomics, toxicogenomics, and small RNA expression analysis. *Journal of Cellular Physiology*, 226 (10): 2469 - 2477.

- Debashree L R, Joshua C J. 2014. Validation of reference genes for gene expression analysis in olive (*Olea europaea*) mesocarp tissue by quantitative real-time RT-PCR. BMC Research Notes, 7: 304.
- Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agenda Academiae Sinicae Edita. 1980. Flora reipublicae popularis sinicae. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 中国科学院中国动植物志编委会. 1980. 中国植物志. 北京: 科学出版社.
- Forkmann G. 1991. Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. Plant Breeding, 106 (1): 1 - 26.
- Fu Yuan-yuan, Mu Chun-sheng, Gao Hong-wen, Li Jun, Wang Xue-min. 2014. Cloning of *18S rRNA* gene and stability evaluation of reference genes in *Medicago sativa*. Plant Physiology Journal, 50 (12): 1809 - 1815. (in Chinese)
- 付媛媛, 穆春生, 高洪文, 李俊, 王学敏. 2014. 紫花苜蓿 *18S rRNA* 基因的克隆及内参基因表达稳定性评价. 植物生理学报, 50 (12): 1809 - 1815.
- Hu Chun, Liu Zuo-jun, Li Fu-xiang, Liu Feng-mei. 2013. Detection Methods for pollen viability of *Anemone obtusiloba*. Bulletin of Botanical Research, 33 (5): 582 - 586.
- 胡春, 刘左军, 李富香, 刘凤梅. 2013. 钝裂银莲花花粉活力测定方法的研究. 植物研究, 33 (5): 582 - 586. (in Chinese)
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation: strategies and considerations. Genes and Immunity, 6 (4): 279 - 284.
- Hyun T K, Rim Y, Jang H J, Kim C H, Park J, Kumar R, Lee S, Kim B C, Bhak J, Nguyen-Quoc B, Kim S W, Lee S Y, Kim J Y. 2012. *De novo* transcriptome sequencing of *Momordica cochinchinensis* to identify genes involved in the carotenoid biosynthesis. Plant Molecular Biology, 79 (4/5): 413 - 427.
- 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.
- Kou X Y, Zhang L, Yang S Z, Li G H, Ye J L. 2017. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis in peach fruit under different experimental conditions. Scientia Horticulturae, 225 (1): 195 - 203.
- Kriangphan N, Vuttipongchaikij S, Kittiwongwattana C, Suttangkakul A, Pinmanee P, Sakulsathaporn A, Suwimon R, Suputtitada S, Chanvivattana Y, Apisitwanich S. 2015. Effects of sequence and expression of eight anthocyanin biosynthesis genes on floral coloration in four *Dendrobium* hybrids. The Horticulture Journal, 84 (1): 83 - 92.
- Liu Chuan-jiao, Wang Shun-li, Xue Jing-qi, Zhu Fu-yong, Ren Xiu-xia, Li Ming-yang, Zhang Xiu-xin. 2015. Molecular cloning of ubiquitin protein gene and study on this gene as reference gene in tree peony. Acta Horticulturae Sinica, 42 (10): 1983 - 1992. (in Chinese)
- 刘传娇, 王顺利, 薛璟祺, 朱富勇, 任秀霞, 李名扬, 张秀新. 2015. 牡丹泛素延伸蛋白基因 *ubiquitin* 的克隆及其作为内参基因的研究. 园艺学报, 42 (10): 1983 - 1992.
- Liu Q X, Qi X, Yan H D, Huang L K, Nie G, Zhang X Q. 2018. Reference gene selection for quantitative real-time reverse-transcriptase PCR in annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) subjected to various abiotic stresses. Molecules, 23 (1): 172 - 184.
- 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, 薛璟祺, 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.
- Lou Q, Liu Y L, Qi Y Y, Jiao S Z, Tian F F, Jiang L, Wang Y J. 2014. Transcriptome sequencing and metabolite analysis reveals the role of delphinidin metabolism in flower colour in grape hyacinth. Journal of Experimental Botany, 65 (12): 3157 - 3164.
- Ma Lu-lin, Cui Guang-fen, Wang Xiang-ning, Jia Wen-jie, Duan Qing, Du Wen-wen, Wang Ji-hua. 2017. Cloning and expression analysis of catalase (*Ls-Cat1*) gene in *Lilium sargentiae* Wilson. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 31 (9): 1700 - 1707. (in Chinese)
- 马璐琳, 崔光芬, 王祥宁, 贾文杰, 段青, 杜文文, 王继华. 2017. 泸定百合过氧化氢酶 (*Ls-Cat1*) 基因的克隆及表达分析. 核农学报, 31 (9): 1700 - 1707.

- 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 P Y, Bian X F, Jia Z D, Guo X D, Xie Y Z. 2016. *De novo* sequencing and comprehensive analysis of the mutant transcriptome from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Gene*, 575 (3): 641 - 649.
- Nolan T, Hands R E, Bustin S A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1 (3): 1559 - 1582.
- Qiao Yong-gang, Wang Yong-fei, Cao Ya-ping, He Jia-xin, Jia Meng-jun, Li Zheng, Zhang Xin-rui, Song Yun. 2020. Reference genes selection and related genes expression analysis under low and high temperature stress in *Taraxacum officinale*. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (6): 1153 - 1164. (in Chinese)
- 乔永刚, 王勇飞, 曹亚萍, 贺嘉欣, 贾孟君, 李 政, 张鑫瑞, 宋 芸. 2020. 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. *园艺学报*, 47 (6): 1153 - 1164.
- Quackenbush J. 2002. Microarray data normalization and transformation. *nature genetics*, 32: 496 - 501.
- Song S Y, Seo P J, Yang M S, Xiang F N, Park C M. 2008. Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *Bmc Plant Biology*, 8 (1): 112 - 132.
- Song Xiao-bo, Chang Ying-ying, Liu Hao, Xu Hui-min, 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.
- Sun Mei-lian, Wang Yun-sheng, Yang Dong-qing, Wei Chao-ling, Gao Li-ping, Xia Tao, Shan Yu, Luo Yang. 2010. Reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Camellia sinensis*. *Chinese Bulletin of Botany*, 45 (5): 579 - 587. (in Chinese)
- 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 韦朝领, 高丽萍, 夏 涛, 单 育, 骆 洋. 2010. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择. *植物学报*, 45 (5): 579 - 587.
- Tanaka Y, Ohmiya A. 2008. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, 19 (2): 190 - 197.
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54 (4): 733 - 749.
- Volkov R A, Panchuk I I, Schöffl F. 2003. Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. *Journal of Experimental Botany*, 54 (391): 2343 - 2349.
- Wang Yan-jie, Chen Ye-qing, Xue Ze-yun, Zhou Hua, Jin Qi-jiang, Xu Ying-chun. 2017. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR normalization in lotus (*Nelumbo nucifera*) during petal coloration. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 40 (3): 408 - 415. (in Chinese)
- 王彦杰, 陈叶清, 薛泽云, 周 华, 金奇江, 徐迎春. 2017. 荷花花瓣着色过程实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选及验证. *南京农业大学学报*, 40 (3): 408 - 415.
- Xu L F, Xu H, Cao Y W, Yang P P, Feng Y Y, Tang Y C, Yuan S X, Ming J. 2017. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during bicolor tepal development in asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.). *Frontiers in Plant Science*, 8: 669.
- Xu Ling-yun, Wang Jun-li, Zhou Yi-jun. 2017. Cloning and expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes from *Iris halophila* (Iridaceae). *Journal of Plant Genetic Resources*, 18 (2): 340 - 348. (in Chinese)
- 徐凌云, 王俊丽, 周宜君. 2017. 喜盐鸢尾花色形成关键基因的克隆及表达分析. *植物遗传资源学报*, 18 (2): 340 - 348.
- Yang Dan, Li Qing, Wang Gui-xi, Ma Qing-hua, Zhu Li-quan. 2017. Reference genes selection and system establishment for real-time qPCR analysis in ping'ou hybrid hazelnut (*C. heterophylla* Fisch. \times *C. avellana* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 50 (12): 2399 - 2410. (in Chinese)
- 杨 丹, 李 清, 王贵禧, 马庆华, 朱利泉. 2017. 平欧杂种榛实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选与体系建立. *中国农业科学*, 50 (12): 2399 - 2410.
- Yi S J, Qian Y Q, Han L, Sun Z Y, Fan C M, Liu J X, Ju G S. 2012. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in

- Rhododendron micranthum* Turcz. Scientia Horticulturae, 99 (2): 128 - 133.
- Yoshihara N, Imayama T, Fukuchi-Mizutani M, Okuhara H, Tanaka Y, Ino I, Yabuya T. 2005. cDNA cloning and characterization of UDP-glucose: Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase in *Iris hollandica*. Plant Science, 169 (3): 496 - 501.
- Yoshihara N, Imayama T, Matsuo Y, Fukuchi-Mizutani M, Tanaka Y, Ino I, Yabuya T. 2006. Characterization of cDNA clones encoding anthocyanin 3-*p*-coumaroyltransferase from *Iris hollandica*. Plant Science, 171 (5): 632 - 639.
- 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 J, Zhu C S, Huo Y B, Zhang B, Ma Z Q, Feng J T. 2019. Validation of suitable reference genes for quantitative gene expression analysis in *Tripterygium wilfordii*. Molecular Biology Reports, 46: 4161 - 4174.
- Zhao Zhi-gang. 2006. Reproductive strategies of common species of Ranunculaceae at Alpine Meadow in Qinghai Tibetan Plateau [Ph. D. Dissertation]. Lanzhou: Lanzhou University. (in Chinese)
- 赵志刚. 2006. 青藏高原高寒草甸常见毛茛科植物繁殖对策研究 [博士论文]. 兰州: 兰州大学.
- Zhu Hai-sheng, Chen Min-dong, Wen Qing-fang, Lan Xin-long, Li Yong-ping, Wang Bin, Zhang Qian-rong, Wu Wei-dong. 2016. Cloning of 18S *rRNA* gene from *Luffa cylindrical* and its application as an internal standard. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 30 (1): 35 - 41. (in Chinese)
- 朱海生, 陈敏东, 温庆放, 蓝新隆, 李永平, 王 彬, 张前荣, 吴卫东. 2016. 丝瓜 18S *rRNA* 基因克隆及其作为内参基因的应用. 核农学报, 30 (1): 35 - 41.