

# 美洲南瓜 $\alpha$ -微管蛋白*CpTUA*基因的分离 及其作为内参基因的应用

朱海生 刘建汀 温文旭 叶新如 王彬 李永平 陈敏氩 林琿 温庆放\*

(福建省农业科学院作物研究所, 福建省农业科学院蔬菜研究中心, 福建省蔬菜工程技术研究中心, 福州 350013)

**摘要** 为了获得美洲南瓜 $\alpha$ -tubulin基因, 并设计合适的荧光定量PCR内参引物, 该研究通过转录组测序和RT-PCR方法获得了1条长达1 863 bp的cDNA, 命名为*CpTUA*, GeneBank登录号为: MH310440。生物信息学分析表明, 该序列包含1个开放读码框(open reading frame, ORF), 大小为1 353 bp, 预测共编码450个氨基酸, 理论分子大小约为49.57 kDa, 蛋白质等电点为4.84。Motif Scan分析显示, *CpTUA*蛋白质的氨基酸序列49—246位和248—393位分别为Tubulin和Tubulin-C保守区域。同源性分析表明, 基因编码的蛋白质与同为南瓜属的中国南瓜和印度南瓜同源蛋白的相似性达到99%, 具有高度的保守性。在此基础上, 设计了1对的荧光定量PCR引物, 该引物具有较高的特异性和重复性。RT-PCR和qRT-PCR分析表明, *CpTUA*基因在美洲南瓜不同组织和不同胁迫处理下均能稳定表达, 适合在美洲南瓜基因表达研究中作为内参基因。该研究为开展美洲南瓜重要功能基因的表达模式和调控机制的研究奠定基础。

**关键词** 美洲南瓜; 内参基因;  $\alpha$ -微管蛋白; 表达分析

## Isolation of $\alpha$ -Tubulin *CpTUA* Gene from *Cucurbita pepo* and It's Application as An Internal Standard

Zhu Haisheng, Liu Jianting, Wen Wenxu, Ye Xinru, Wang Bin, Li Yongping,

Chen Mindong, Lin Hui, Wen Qingfang\*

(Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Vegetable Research Center,

Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian Engineering Research Center for Vegetables, Fuzhou 350013, China)

**Abstract** The study was to obtain the  $\alpha$ -tubulin gene of zucchini and design the qRT-PCR primers. A 1 863 bp cDNA was obtained by transcriptome sequencing and RT-PCR. This gene was named *CpTUA* and the GenBank accession was MH310440. Bioinformatics analysis results indicated that the sequence contained a size of 1 353 bp open reading frame (ORF) encoding 450 amino acids, with a theoretical molecular weight of 49.57 kDa and a protein isoelectric point (PI) of 4.84. Motif Scan analysis showed that *CpTUA* protein had the Tubulin and Tubulin-C domains of conserved actin in the position of 49—246 and 248—393 sites, respectively. Homol-

收稿日期: 2018-07-04 接受日期: 2018-09-27

福建省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2018R1026-5)、福建省农业科学院“青年科技英才百人计划”(批准号: YC2017-5)、中央引导地方科技发展专项(批准号: 2018L3005)、福建省农业科学院蔬菜科技创新团队(批准号: STIT2017-1-2)和国家大宗蔬菜产业技术体系福州综合试验站(批准号: CARS-23-G-53)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0591-87573380, E-mail: fjvrc@163.com

Received: July 4, 2018 Accepted: September 27, 2018

This work was supported by Fujian Provincial Public Research Institute of Fundamental Research (Grant No.2018R1026-5), Fujian Academy of Agricultural Sciences “Youth Science and Technology Talents Program” Project (Grant No.YC2017-5), Central Guidance for Local Science and Technology Development Projects (Grant No.2018L3005), Fujian Academy of Agricultural Sciences Vegetable Science and Technology Innovation Team (Grant No.STIT2017-1-2) and the Experimental Station of Fuzhou of China Commodity Vegetable Industry System (Grant No.CARS-23-G-53)

\*Corresponding author. Tel: +86-591-87573380, E-mail: fjvrc@163.com

网络出版时间: 2018-11-29 14:33:41

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181129.1433.010.html>

ogy analysis revealed that *CpTUA* shared 99% identity with the homologous proteins from *Cucurbita moschata* and *Cucurbita maxima* which were also belong to Cucurbitaceae the same as *Cucurbita pepo*, proving that it was highly conservative. A pair of qRT-PCR primers were then derived from the *CpTUA* gene sequence which had the high specificity and repeatability. The RT-PCR and qRT-PCR indicated that the *CpTUA* gene was stable expression in different tissues and under different stress treatments, so it was suitable as a reference gene for the analysis of gene expression patterns in zucchini. The present study has provided an important reference for analysis the expression of critical genes zucchini.

**Keywords** *Cucurbita pepo*; internal reference gene;  $\alpha$ -tubulin; expression analysis

美洲南瓜(*Cucurbita pepo* L.), 又名西葫芦, 为葫芦科(Cucurbitaceae)南瓜属(*Cucurbita* spp.)一年生草本植物, 原产美洲南部, 19世纪中叶我国开始栽培<sup>[1]</sup>。美洲南瓜生长性强、种植周期较短、产品产量较高、供应周期长、味道鲜美、营养丰富, 而且具有很好的医疗保健功能, 深受大众喜爱, 在我国大范围种植, 现已成为仅次于黄瓜的第二大瓜类蔬菜<sup>[2]</sup>。我国美洲南瓜育种发展时间较短, 随着人们对美洲南瓜的品质要求越来越高, 传统的育种技术已不能满足人们的需要, 在美洲南瓜育种中运用生物技术逐渐被大家所重视, 美洲南瓜重要功能基因的表达分析和调控机制研究成为一项重要的研究内容。

实时荧光定量PCR(Real-time quantitative PCR, qRT-PCR)是在传统PCR技术基础上发展而来的一种新的核酸定量技术, 已被广泛地应用于基因的表达分析中<sup>[3-5]</sup>。在应用实时荧光定量PCR进行基因表达分析时, 为了消除不同材料细胞间RNA提取的质量和完整性、初始cDNA模板的质量和数量、目的基因PCR扩增效率等产生的偏差, 有必要选择合适的内参基因来校正靶基因的表达水平, 从而减少样本本身对定量结果的影响<sup>[6-8]</sup>。理想的内参基因应该在任何实验情况和条件下都能够稳定表达, 实际研究中常选择稳定表达的看家基因, 如肌动蛋白(actin, *ACT*)、延伸因子(elongation factor 1 alpha, *EF1a*)、18S核糖体RNA(18S ribosomal RNA, 18S rRNA)、泛素蛋白(ubiquitin, *UBQ*)以及甘油醛-3-磷酸-脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)等基因常作为内参基因<sup>[9-11]</sup>。微管蛋白(tubulin)是细胞的一种骨架蛋白, 包括 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 等多种亚族, 共同构成了微管——真核生物细胞的基本组成部分, 参与细胞内胞质环流、形状维持、运动、分裂、分化、物质运输、信号转导以及极性建成等重要的生理活动<sup>[12]</sup>, 其中,  $\alpha$ -tubulin蛋白和 $\beta$ -tubulin蛋白组

成一种异源二聚体蛋白。大量研究表明,  $\alpha$ -tubulin基因在多种植物不同器官中是非组成型表达, 作为内参基因在分析植物基因表达中应用广泛<sup>[13-14]</sup>。但目前关于美洲南瓜 $\alpha$ -tubulin基因的克隆和作为内参基因应用的研究尚未见报道。本研究获得了1条美洲南瓜内参基因 $\alpha$ -tubulin, 并以该内参基因为基础设计了1对实时荧光定量PCR引物, 为开展美洲南瓜重要功能基因的表达模式和调控机制的研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试美洲南瓜材料由福建省农业科学院蔬菜工程技术研究中心提供。采集美洲南瓜根、茎、花、幼叶、老叶、幼瓜、老瓜、高温处理(38 °C)叶片、低温处理(8 °C)叶片、干旱处理1天叶片、干旱处理3天叶片作为试验材料。以上实验样品的采集共做3次独立重复, 液氮速冻, 并于超低温冰箱(-80 °C)中保存, 用于后续RNA提取试验。

1.1.2 仪器和试剂 ABI 7500实时荧光定量PCR仪、PCR扩增环仪(ABI ProFlex 96-well)购自美国ABI公司。总RNA提取试剂盒为北京百泰克生物技术有限公司产品。RNA逆转录试剂盒(PrimeScript™ 1st Strand cDNA)、Taq DNA Polymerase、dNTPs、pMD18-T simple均为宝生物工程(大连)有限公司产品。胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒为Omega公司产品。引物合成和克隆测序委托尚亚生物技术(福州)有限公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 美洲南瓜 $\alpha$ -tubulin基因的ORF扩增 参考Zhu等<sup>[15]</sup>的方法, 根据获得的美洲南瓜RNA-seq数据库, 筛选得到1条 $\alpha$ -tubulin基因全长序列。设计美洲南瓜的 $\alpha$ -tubulin基因ORF扩增引物, 正向引物F: 5'-ATG AGA GAG TGC ATT TCA ATC C-3', 反向引物

R: 5'-CTG GCA TAT CAT CAT GTT CA-3'。提取1.1中所有美洲南瓜样品的总RNA, 并按照反转录试剂盒(PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit)提供的方法将提取的总RNA反转录为cDNA第1链。PCR反应体系为: 反应体系的总体积为25  $\mu$ L, 含25 ng模板、0.4  $\mu$ mol/L正向引物、0.4  $\mu$ mol/L反向引物、0.15 mmol/L dNTP、1 U Taq DNA聚合酶、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>的10 $\times$ PCR缓冲液2.5  $\mu$ L, 其余成分为灭菌的超纯水。PCR反应程序为: 94  $^{\circ}$ C预变性3 min; 94  $^{\circ}$ C变性30 s, 56  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸60 s, 35个循环; 最后, 72  $^{\circ}$ C延伸7 min; 于4  $^{\circ}$ C下保存。

1.2.2 美洲南瓜 $\alpha$ -tubulin基因生物信息学分析 采用EditSeq(版本5.01)软件分析美洲南瓜 $\alpha$ -tubulin基因序列理化性质; 采用Oligo Analyzer 3.1在线软件(<http://sg.idtdna.com/calc/analyzer>)设计基因引物; 使用在线分析软件(<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>)分析基因和蛋白序列; 采用MEGA(版本4.0)软件和Clustal W2软件进行同源蛋白多序列比对; 采用SMART在线分析软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行蛋白保守结构域分析; 采用MotifScan在线软件([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan))进行蛋白质翻译后修饰; 采用ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)和ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)在线软件进行一级结构分析; 采用PRABI([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_consensus.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_consensus.pl))在线软件进行二级结构预测; 采用在线软件SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)进行三级结构建模。

1.2.3 美洲南瓜 $\alpha$ -tubulin基因引物设计与常规PCR检测 利用Primer Premier 3.0软件, 设计出1对荧光定量特异引物D1/D2, 上游D1: 5'-TTC TCC CGA ATT GAC CAC AA-3', 下游D2: 5'-ATC GTT TAC GGC ATG GAC TA-3'。按照北京百泰克生物技术有限公司通用植物总RNA提取试剂盒的方法提取美洲南瓜总RNA, 并按照PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒的方法合成cDNA第1链。PCR反应体系为: 反应体系的总体积为25  $\mu$ L, 含25 ng模板、0.4  $\mu$ mol/L正向引物、0.4  $\mu$ mol/L反向引物、0.15 mmol/L dNTP、1 U Taq DNA聚合酶、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>的10 $\times$ PCR缓冲液2.5  $\mu$ L, 其余成分为灭菌的超纯水。PCR反应程序为: 94  $^{\circ}$ C预变性3 min; 94  $^{\circ}$ C变性30 s, 58  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸30 s, 35个循环;

最后, 72  $^{\circ}$ C延伸7 min; 于4  $^{\circ}$ C下保存。PCR扩增产物经1%的琼脂糖电泳检测后, 回收纯化连接到pMD18-T载体上, 转化, 挑取阳性克隆子, PCR检测后送至测序。

1.2.4 荧光定量引物PCR检测 以反转录后的美洲南瓜cDNA第1链作为模板, 根据SYBR® Premix Ex Taq™荧光定量PCR试剂盒提供的说明书进行PCR扩增。PCR反应体系为: 总体积为25  $\mu$ L, 12.5  $\mu$ L Power SYBR® Green PCR Master Mix、1  $\mu$ L模板、实时荧光定量PCR引物的正向引物0.5  $\mu$ L(浓度为10  $\mu$ mol/L)和反向引物0.5  $\mu$ L(浓度为10  $\mu$ mol/L), 补蒸馏水至总体积25  $\mu$ L。反应程序为: 95  $^{\circ}$ C预变性10 min; 95  $^{\circ}$ C变性15 s, 60  $^{\circ}$ C退火1 min, 共40个循环; 4  $^{\circ}$ C保存; 每个反应做3个重复。

以美洲南瓜cDNA为模板, 采用10倍稀释法, 共设置5个浓度(分别为稀释1、10、100、1 000、10 000倍), 进行定量PCR反应, 每个反应做3个重复, 制备标准曲线, 计算引物扩增效率。

1.2.5 美洲南瓜 $\alpha$ -tubulin基因表达稳定性分析 RT-PCR分析: 提取美洲南瓜根、茎、花、幼叶、老叶、幼瓜、老瓜、高温处理(38  $^{\circ}$ C)叶片、低温处理(8  $^{\circ}$ C)叶片、干旱处理1天叶片、干旱处理3天叶片的总RNA, 分别反转录形成cDNA第1链, 将获得的cDNA浓度调平至50 ng/ $\mu$ L左右, 进行PCR扩增。PCR扩增体系为: 总体积为25  $\mu$ L, 含25 ng模板、0.4  $\mu$ mol/L正向引物、0.4  $\mu$ mol/L反向引物、0.15 mmol/L dNTP、1 U Taq DNA聚合酶、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>的10 $\times$ PCR缓冲液2.5  $\mu$ L, 其余成分为灭菌的超纯水。PCR反应程序为: 94  $^{\circ}$ C预变性3 min; 94  $^{\circ}$ C变性30 s, 58  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸30 s, 35个循环; 最后, 72  $^{\circ}$ C延伸7 min; 于4  $^{\circ}$ C下保存。PCR产物于1%琼脂糖凝胶电泳, 用基因公司的SynGene BOX EF凝胶成像系统拍照并对PCR条带进行密度扫描分析。

荧光定量引物PCR分析: 以美洲南瓜cDNA第1链作为模板, 以actin基因为内参<sup>[16-17]</sup>, 运用荧光定量PCR检测 $\alpha$ -tubulin基因表达量, 根据SYBR® Premix Ex Taq™荧光定量PCR试剂盒方法进行PCR扩增。反应体系为: 总体积为25  $\mu$ L, 12.5  $\mu$ L Power SYBR® Green PCR Master Mix、1  $\mu$ L模板、实时荧光定量PCR正向引物0.5  $\mu$ L(浓度为10  $\mu$ mol/L)、实时荧光定量PCR反向引物0.5  $\mu$ L(浓度为10  $\mu$ mol/L), 补蒸馏水至总体积25  $\mu$ L。反应程序为: 95  $^{\circ}$ C预变性

10 min; 95 °C变性15 s, 60 °C退火1 min, 共 40个循环; 4 °C保存; 每个反应3个重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达情况。

**1.2.6 美洲南瓜POD基因荧光定量PCR分析** 以低温处理不同天数(0天、1天、3天、5天、7天)的美洲南瓜cDNA第1链作为模板, 分别以美洲南瓜 $\alpha$ -tubulin和actin基因为内参, 分析美洲南瓜POD(peroxidase)基因表达情况。POD基因荧光定量PCR上游正向引物POD-F: 5'-GCT CAA CCC ATC CAG TCC-3', 下游反向引物POD-R: 5'-ACC ACG AAG TCC AAA CCC-3'。根据SYBR® Premix Ex Taq™荧光定量PCR试剂盒方法进行PCR扩增, 反应体系为: 总体积为25  $\mu$ L, 12.5  $\mu$ L Power SYBR® Green PCR Master Mix、1  $\mu$ L 模板、实时荧光定量PCR正向引物0.5  $\mu$ L(浓度为10  $\mu$ mol/L)、实时荧光定量PCR反向引物0.5  $\mu$ L(浓度为10  $\mu$ mol/L), 补蒸馏水至总体积25  $\mu$ L。反应程序为: 95 °C预变性10 min; 95 °C变性15 s, 60 °C退火1 min, 共 40个循环; 4 °C保存; 每个反应做3个重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达情况。

## 2 结果

### 2.1 美洲南瓜 $\alpha$ -tubulin基因扩增

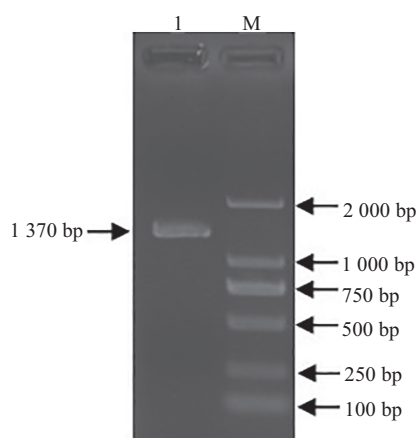
根据本课题组对美洲南瓜转录组Illumina高通量深度测序的结果, 筛选得到1条 $\alpha$ -tubulin基因全长, 在此基础上, 设计 $\alpha$ -tubulin基因ORF引物进行验证(图1)。结果表明, 该基因cDNA全长1 863 bp, ORF

大小为1 353bp, 命名为CpTUA, GenBank登录号为: MH310440。

### 2.2 CpTUA基因生物信息学分析

**2.2.1 CpTUA基因编码蛋白质的一级结构** 序列分析发现, CpTUA含1个长达1 863 bp的cDNA序列(图2), 其编码区的GC含量为51.15%, 预测编码450个aa, 理论分子量(Mw)为49.57 kDa, 等电点为4.84, pH为7.0时的带电荷数为-21.39。在构成 $\alpha$ -tubulin蛋白的20种氨基酸中, 缬氨酸(Val, E)含量最高(8.9%), 甘氨酸(Gly, G)次之(8.7%), 色氨酸(Trp)含量最低(0.7%)。分析发现, CpTUA蛋白质包含40个疏水氨基酸、63个极性氨基酸、151个碱性氨基酸和118个酸性氨基酸。CpTUA蛋白质的总平均疏水性(GRA-VY)为-0.220, 蛋白质不稳定系数(instability index, II)为35.31, 脂肪族指数(aliphatic index, AI)为81.64, 预测为亲水性蛋白质。

**2.2.2 CpTUA蛋白质翻译后修饰及结构域** Motif Scan在线软件分析显示, 美洲南瓜CpTUA基因编码的蛋白质包含有1个保守的Tubulin结构域(49—246位, E值为 $7.17e-71$ )和Tubulin-C保守结构域(248—393位, E值为 $3.80e-52$ )。分析发现, 161—164为酰胺化位点; 128—131、223—226、380—383为N-糖基化位点; 73—76、94—97、180—183、193—196、287—290、294—297、383—386、389—392位为酪蛋白激酶磷酸化位点; 13—18、34—39、44—49、142—147、365—370、412—417、436—441位为N-豆蔻酰化位点; 82—84、94—96、241—243、334—336、337—339



1:  $\alpha$ -tubulin; M: TaKaRa DL 2000分子标记。

1:  $\alpha$ -tubulin; M: TaKaRa DL 2000 marker.

图1 美洲南瓜 $\alpha$ -tubulin基因PCR扩增产物

Fig.1 PCR amplified product of  $\alpha$ -tubulin gene in zucchini

```

181 cagatctctgtttcttcttcttccatccccgttccctaagccaaaATGAGAGAGTGCATTTCATCCACATTGTCAGGCCGTATCCAGG
1 M R E C I S I H I G Q A G I Q V
271 TCGGAAATGCTGCTGGAGCTTACTGCTCGAACACGGTATTGAGCCCGATGCGCAAATGCCAGGCGACACCACTACTGCTGGAGGCG
17 G N A C W E L Y C L E H G I Q P D G Q M P G D T T T G G G D
361 ATGATGCTTCAACACCTTTTTCAGTGAACCTGCTGCGGAAAGCATGTTCCCTCGTGCCTTTTTCGATCTTGAACCTACAGTATTG
47 D A F N T F F S E T G A G K H V P R A V F V D L E P T V I D
451 ATGAGGTGAGGACTGGAACCTTACCCTCAGCTCTCCACCCGAAACAACCTCATCAGTGGCAAGGAAAGATGCCCAACAACCTTGCCTG
77 E V R T G T Y R Q L F H P E Q L I S G K E D A A N N F A R G
541 GTCACTACACCGTTGGGAAGGAAATGTTGATCTCTGCTGGACCGAATCCGCAAGCTAGCTGATAACTGCACTGCTTCAAGGATTCC
107 H Y T V G K E I V D L C L D R I R K L A D N C T G L Q G F L
631 TTGTTTCAACGCTGTTGGTGGTACTGCTGCTGCTGCTCCCTCCCTTTTGGAGCGTTTATCGTTGACTATGGAAGAAATCCA
137 V F N A V G G G T G S G L G S L L L E R L S V D Y G K K S K
721 AGCTTGGTTCACTGTTTACCCCTCCCACAAGTCTCAACCTCTGTTGTTGAGCCATACAACAGTCTCCTCTCAACCCATTCCCTCTTGG
167 L G F T V Y P S P Q V S T S V V E P Y N S V L S T H S L L E
811 AACACACCGATGCTGCTGCTCCTTGAACAATGAAAGCCATTTACGATATCTGAGGCGCTCCCTTGACATTGAGCGACCAACTACTCCA
197 H T D V A V L L D N E A I Y D I C R R S L D I E R P N Y S N
901 ACCTCAACCGCTGCTGCTCAGGTTATTTTCATCTTAACTGCGAGTTTGAAGTTGATGCTGCGCTGAAATGAGGATGGAACGAATCC
227 L N R L V S Q V I S S L T A S L R F D G A L N V D V N E F Q
991 AGACCAACTGCTCCATACCCAGAATCCACTTCATGCTTTCTCATATGACCAAGTATCTGAGCCGAGAAAGCTTACCATGAGCAGC
257 T N L V P Y P R I H F M L S S Y A P V I S A E K A Y H E Q L
1 081 TCTCAGTGGCTGAGATCACCAACAGTGCCTTCGAGCCATGCTATGATGTTAAGTGTGACCCCGACATGGAAGTACATGCTGCTGCT
287 S V A E I T N S A F E P S S M M V K C D P R H G K Y M A C C
1 171 GTCTGATGTACCCTGCTGATGTTGCTGCAAGGAGCTGAAATGCTGCTGTTGCTACCATCAAGACCAAGCTTACCATCAGGTTGTTGACT
317 L M Y R G D V V P K D V N A A V A T I K T K R T I Q F V D W
1 261 GGTGCCCCACTGCTGCTGATGCTGATCAACTACCAGCCCAACTGTTGCTCCCTGAGGCGATCTTGCCTGCTGAGGCTTCCAGGCTGCT
347 C P T G F K C G I N Y Q P P T V V P G G D L A R V Q R A V C
1 351 GCAAGATCTTAACCAACAGCTGCTGAGGCTTCTCCGAAATGACCAAGTTGATCTCATGTATGCCAAGCGCCTTCTGCTG
377 K I S N S T S V A E V F S R I D H K F D L M Y A K R A F V H
1 441 ATTGATGCTGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT
407 W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G
1 531 GTGCTGAGTCCGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT
437 A E S A E G E D D E G E D Y *
1 621 tatgtctgtcccccttctgtatgttggtgctgtcttctgtgtatgttttttttcttatcatgaaatgttatcctgtgataatgtttc
1 711 caaggcttttgaacaacatctattattctcattttaaattgccattttatattggcttgtattttgtctctattgtttttta
1 801 atctaagaattttatctgagcttccaaaaaacaatgctctcttctttggcaattaat

```

图中方框内是起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)。星号部分表示翻译终止。

The initiation codon (ATG) and termination codon (TAA) were labeled by box. The asterisk indicated the translation was terminated.

图2 *CpTUA*基因全长序列及氨基酸序列

Fig.2 Full sequence and corresponding amino acid sequence of *CpTUA* gene

为蛋白激酶C磷酸化位点。

2.2.3 *CpTUA*蛋白质的二级、三级结构分析 美洲南瓜*CpTUA*蛋白质的二级结构分析表明,该蛋白无规则卷曲占46.0%、延伸链占34.67%、 $\alpha$ -螺旋占14.0%、 $\beta$ -转角占5.33%,未发现 $\beta$ 折叠的存在,表明无规则卷曲属于该蛋白质的主要二级结构。利用SWISS-MODEL对*CpTUA*蛋白质的三级结构进行在线预测,结果如图3所示,该蛋白与中国南瓜和

印度南瓜的 $\alpha$ -tubulin同源蛋白的三级空间高度相似。

2.2.4 *CpTUA*蛋白质的同源比对和进化分析 对美洲南瓜*CpTUA*基因编码的蛋白质同源分析表明(图4),美洲南瓜*CpTUA*基因与的中国南瓜(*Cucurbita moschata*, XP\_022922758.1)、印度南瓜(*Cucurbita maxima*, XP\_022984449.1)、黄南瓜(*Cucumis sativus*, XP\_004150268.1)、月季(*Rosa*

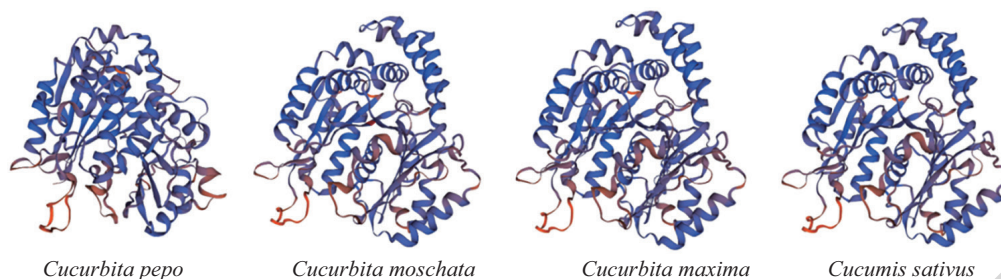


图3 CpTUA及其同源蛋白三级结构预测图

Fig.3 Prediction of tertiary structure of CpTUA and its homologous protein

XP_022922758.1	MRECSIHIGQAGIQVGNACWELCYLEHGIQPDGOMP	DTTGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFV	LDLEPTVIDEVRT	80
XP_022984449.1	MRECSIHIGQAGIQVGNACWELCYLEHGIQPDGOMP	DTTGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFV	LDLEPTVIDEVRT	80
XP_004150268.1	MRECSIHIGQAGIQVGNACWELCYLEHGIQPDGOMP	DTTGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFV	LDLEPTVIDEVRT	80
CpTUA	MRECSIHIGQAGIQVGNACWELCYLEHGIQPDGOMP	DTTGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFV	LDLEPTVIDEVRT	80
XP_024162918.1	MRECSIHIGQAGIQVGNACWELCYLEHGIQPDGOMP	SDRTTGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFV	LDLEPTVIDEVRT	80
XP_002275973.1	MRECSIHIGQAGIQVGNACWELCYLEHGIQPDGOMP	SDRTTGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFV	LDLEPTVIDEVRT	80
XP_022922758.1	GYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIV	LDLCLDRIRKLDNCTGLQGLVFN	AVGGGTGSGLGSLLERL	160
XP_022984449.1	GYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIV	LDLCLDRIRKLDNCTGLQGLVFN	AVGGGTGSGLGSLLERL	160
XP_004150268.1	GYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIV	LDLCLDRIRKLDNCTGLQGLVFN	AVGGGTGSGLGSLLERL	160
CpTUA	GYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIV	LDLCLDRIRKLDNCTGLQGLVFN	AVGGGTGSGLGSLLERL	160
XP_024162918.1	GYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIV	LDLCLDRIRKLDNCTGLQGLVFN	AVGGGTGSGLGSLLERL	160
XP_002275973.1	GYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIV	LDLCLDRIRKLDNCTGLQGLVFN	AVGGGTGSGLGSLLERL	160
XP_022922758.1	YGKSKLGFVVYSPQVSTSVVEPYNVSLSTHSL	LEHTDVAVLLDNEAIYDICRRSLDIERPNYS	NLNRLVSOVISSLTA	240
XP_022984449.1	YGKSKLGFVVYSPQVSTSVVEPYNVSLSTHSL	LEHTDVAVLLDNEAIYDICRRSLDIERPNYS	NLNRLVSOVISSLTA	240
XP_004150268.1	YGKSKLGFVVYSPQVSTSVVEPYNVSLSTHSL	LEHTDVAVLLDNEAIYDICRRSLDIERPNYS	NLNRLVSOVISSLTA	240
CpTUA	YGKSKLGFVVYSPQVSTSVVEPYNVSLSTHSL	LEHTDVAVLLDNEAIYDICRRSLDIERPNYS	NLNRLVSOVISSLTA	240
XP_024162918.1	YGKSKLGFVVYSPQVSTSVVEPYNVSLSTHSL	LEHTDVAVLLDNEAIYDICRRSLDIERPT	TNLNRLVSOVISSLTA	240
XP_002275973.1	YGKSKLGFVVYSPQVSTSVVEPYNVSLSTHSL	LEHTDVAVLLDNEAIYDICRRSLDIERPT	TNLNRLVSOVISSLTA	240
XP_022922758.1	SLRFDGALNVDVNEFQTNLVYPRIHFMLSSYAP	VISAERKAYHEQLSVAEITNSAFEPSSMMV	KCDPRHGKYMCCCLMYR	320
XP_022984449.1	SLRFDGALNVDVNEFQTNLVYPRIHFMLSSYAP	VISAERKAYHEQLSVAEITNSAFEPSSMMV	KCDPRHGKYMCCCLMYR	320
XP_004150268.1	SLRFDGALNVDVNEFQTNLVYPRIHFMLSSYAP	VISAERKAYHEQLSVAEITNSAFEPSSMMV	KCDPRHGKYMCCCLMYR	320
CpTUA	SLRFDGALNVDVNEFQTNLVYPRIHFMLSSYAP	VISAERKAYHEQLSVAEITNSAFEPSSMMV	KCDPRHGKYMCCCLMYR	320
XP_024162918.1	SLRFDGALNVDVNEFQTNLVYPRIHFMLSSYAP	VISAERKAYHEQLSVAEITNSAFEPSSMMA	KCDPRHGKYMCCCLMYR	320
XP_002275973.1	SLRFDGALNVDVNEFQTNLVYPRIHFMLSSYAP	VISAERKAYHEQLSVAEITNSAFEPSSMMA	KCDPRHGKYMCCCLMYR	320
XP_022922758.1	GDVVPKDVNAAVATIKTKRTIQFVDCPTGFKCG	INYPPTVPPGGDLARVQAVGKISNSTSVAE	VFSRIDHKFDLMYA	400
XP_022984449.1	GDVVPKDVNAAVATIKTKRTIQFVDCPTGFKCG	INYPPTVPPGGDLARVQAVGKISNSTSVAE	VFSRIDHKFDLMYA	400
XP_004150268.1	GDVVPKDVNAAVATIKTKRTIQFVDCPTGFKCG	INYPPTVPPGGDLARVQAVGKISNSTSVAE	VFSRIDHKFDLMYA	400
CpTUA	GDVVPKDVNAAVATIKTKRTIQFVDCPTGFKCG	INYPPTVPPGGDLARVQAVGKISNSTSVAE	VFSRIDHKFDLMYA	400
XP_024162918.1	GDVVPKDVNAAVATIKTKRTIQFVDCPTGFKCG	INYPPTVPPGGDLARVQAVGKISNSTSVAE	VFSRIDHKFDLMYA	400
XP_002275973.1	GDVVPKDVNAAVATIKTKRTIQFVDCPTGFKCG	INYPPTVPPGGDLARVQAVGKISNSTSVAE	VFSRIDHKFDLMYA	400
XP_022922758.1	KRAFVHWYVGEEMEEGFSEAREDLAALKDYEE	VGAEVSAEGDDEGEDY	450	
XP_022984449.1	KRAFVHWYVGEEMEEGFSEAREDLAALKDYEE	VGAEVSAEGDDEGEDY	450	
XP_004150268.1	KRAFVHWYVGEEMEEGFSEAREDLAALKDYEE	VGAEVSAEGDDEGEDY	450	
CpTUA	KRAFVHWYVGEEMEEGFSEAREDLAALKDYEE	VGAEVSAEGDDEGEDY	450	
XP_024162918.1	KRAFVHWYVGEEMEEGFSEAREDLAALKDYEE	VGAEVSAEGDDEGEDY	450	
XP_002275973.1	KRAFVHWYVGEEMEEGFSEAREDLAALKDYEE	VGAEVSAEGDDEGEDY	450	

图4 CpTUA与其他物种中的同源蛋白质的多重序列比对

Fig.4 Multiple sequence alignment of CpTUA with other homologous sequences

*chinensis*, XP\_024162918.1)和葡萄(*Vitis vinifera*, XP\_002275973.1)氨基酸序列编码的同源蛋白质相似性分别为99%、99%、99%、97%和97%。

为了进一步明确美洲南瓜CpTUA基因的功能与进化关系,研究将CpTUA的蛋白序列同NCBI中的蛋白数据库进行比较(BLASTp),并从中下载了其他物种的15个 $\alpha$ -tubulin同源蛋白。分析发现,美洲南瓜 $\alpha$ -tubulin与葫芦科的黄瓜、中国南瓜和印度南瓜 $\alpha$ -tubulin的亲缘关系最为接近,暗示它们具有相似或者相近的功能,与酸枣、蓖麻和安徒松 $\alpha$ -tubulin的亲缘关系较远,具体结果如图5所示。

### 2.3 CpTUA基因引物设计及常规PCR检测

以美洲南瓜叶片cDNA第1链作为模板,利用荧光定量PCR特异引物D1/D2进行PCR扩增,经1%凝胶电泳检测(图6),得到1条明亮的单一条带,未出现非特异性扩增条带,经测序大小为180 bp,与RNA-Seq数据库中筛选得到的美洲南瓜内参基因CpTUA(GenBank登录号为MH310440)的同源性为100%。

### 2.4 CpTUA基因荧光定量PCR引物检测

以美洲南瓜cDNA第1链为模板,利用引物D1/D2进行实时定量PCR反应。结果显示,3次重复的荧光定量PCR扩增曲线均很好(图7)。为检验反应的特异性,在PCR后进行熔解曲线分析(图8),3次重复的平均

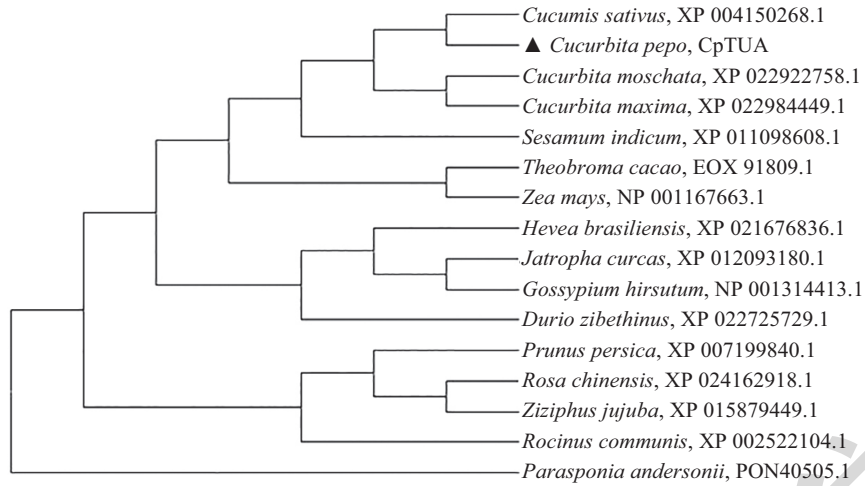
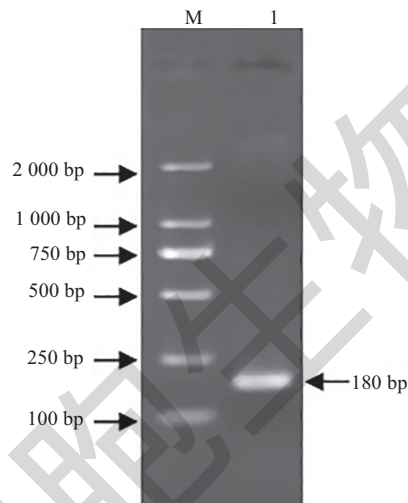


图5 CpTUA与其他15种植物同源蛋白的分子进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of zucchini CpTUA and it's 15 homologous proteins from other plants



M: DL 2000分子标记; 1: 引物D1/D2扩增片段。

M: DL 2000 marker; 1: fragment of primer D1/D2 amplification.

图6 引物D1/D2 PCR扩增产物

Fig.6 PCR amplified product of primer D1/D2

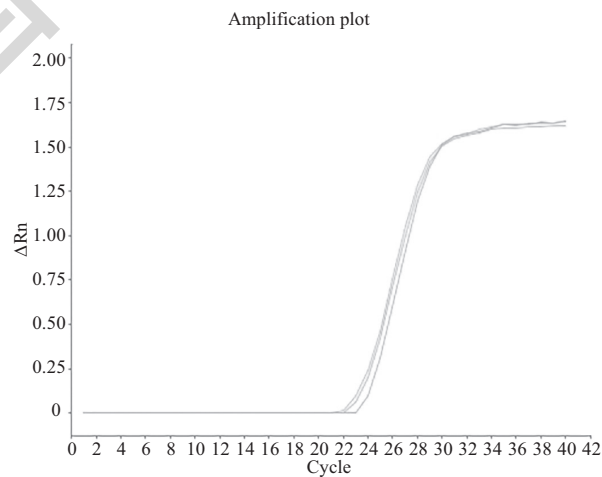


图7 引物D1/D2扩增曲线

Fig.7 The amplification curves of primer D1/D2

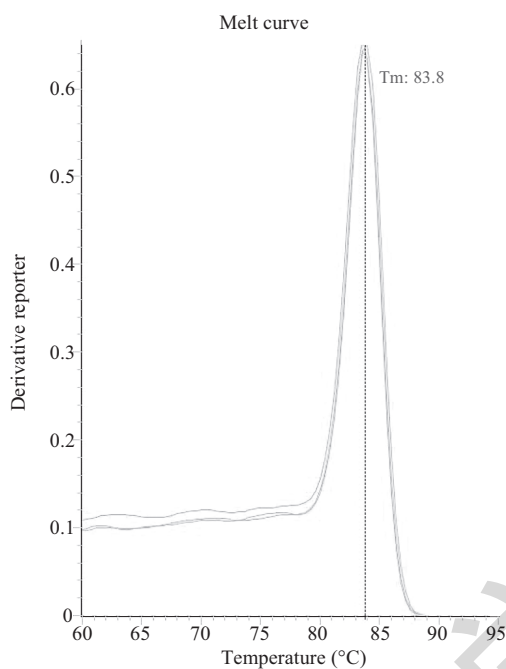


图8 引物D1/D2溶解曲线

Fig.8 The melting curves of primer D1/D2

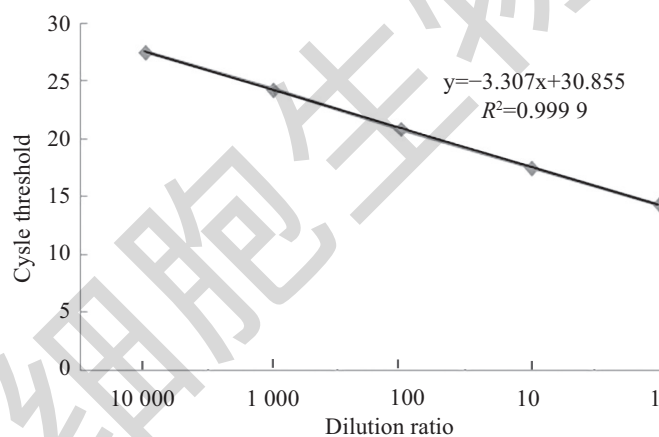


图9 引物D1/D2标准曲线

Fig.9 The standard curves of primer D1/D2

$T_m$ (溶解温度)为83.8 °C, 均只有一个特异峰, 表明无引物二聚体, 扩增条带单一, 特异性强, 没有非特异性扩增出现。对10倍稀释的系列美洲南瓜cDNA为模板进行定量PCR反应, 得出了美洲南瓜*CpTUA*基因的相对定量标准曲线(图9)。标准曲线回归方程为 $y = -3.307x + 30.855$ , 相关系数为0.999 9, 说明直线线性好, 定量准确; 扩增效率为100.6%。这表明, 所设计的1对引物特异性强、重复性高, 能够用于美洲南瓜荧光定量PCR的内参引物实验。

## 2.5 *CpTUA*基因表达稳定性分析

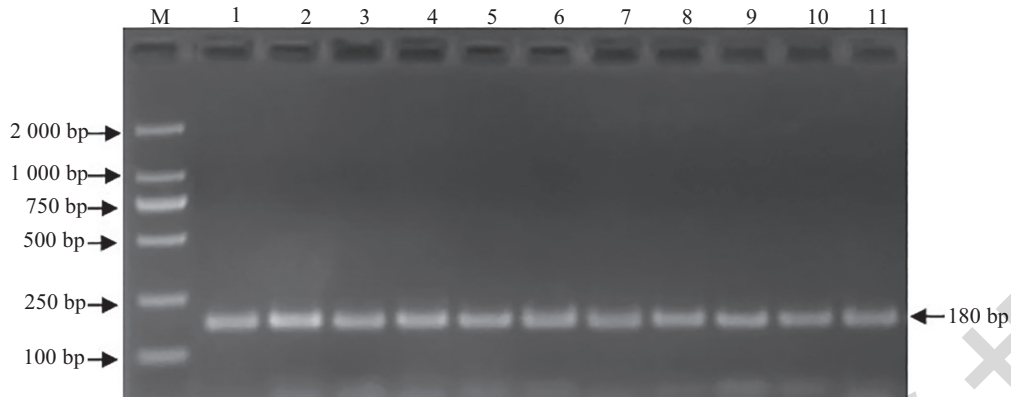
分别利用RT-PCR技术和荧光定量PCR技术分

析美洲南瓜*CpTUA*基因的表达情况。RT-PCR检测结果如图10所示, 荧光定量PCR检测结果如图11所示。11种情况下, *CpTUA*基因表达量没有差异, 表明*CpTUA*基因在美洲南瓜不同组织以及各种胁迫处理的叶片中均能稳定表达, 因此, *CpTUA*适合在美洲南瓜基因表达分析研究中作为内参基因使用。

## 2.6 美洲南瓜*POD*基因荧光定量PCR分析

以低温处理不同天数(0天、1天、3天、5天、7天)的美洲南瓜cDNA第1链作为模板, 分别以美洲南瓜 $\alpha$ -*tubulin*和*actin*基因为内参, 分析美洲南瓜*POD*基因在低温处理下的表达情况。结果如图12所示,



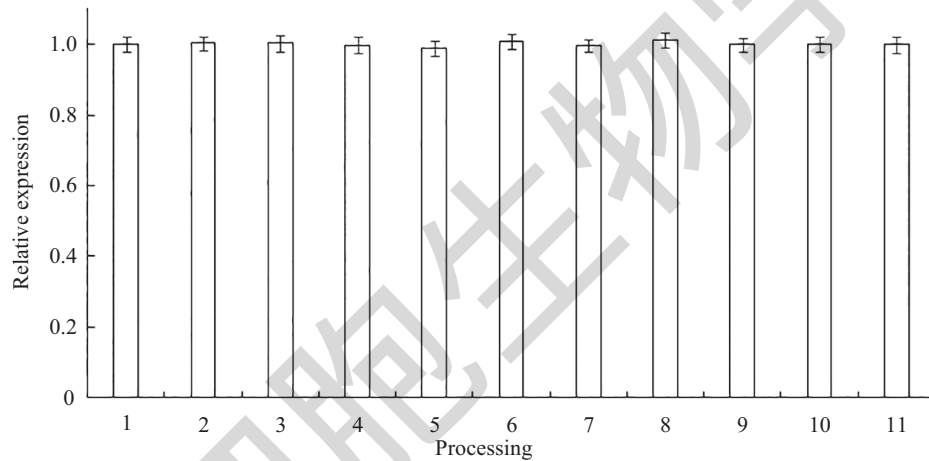


M: DL 2000 marker; 1: 根; 2: 茎; 3: 花; 4: 幼叶; 5: 老叶; 6: 幼瓜; 7: 老瓜; 8: 高温处理(38 °C)叶片; 9: 低温处理(8 °C)叶片; 10: 干旱处理1天叶片; 11: 干旱处理3天叶片。

M: DL 2000 marker; 1: root; 2: stem; 3: flower; 4: young leaf; 5: old leaf; 6: young melon; 7: old g melon; 8: high temperature treatment (38 °C) leaf; 9: low temperature (8 °C) leaf; 10: drought treatment (1 day) leaf; 11: drought treatment (3 day) leaf.

图10 美洲南瓜*CpTUA*基因表达稳定性分析

Fig.10 The expression stability of *CpTUA* gene in different situation of zucchini



1: 根; 2: 茎; 3: 花; 4: 幼叶; 5: 老叶; 6: 幼瓜; 7: 老瓜; 8: 高温处理(38 °C)叶片; 9: 低温处理(8 °C)叶片; 10: 干旱处理1天叶片; 11: 干旱处理3天叶片。

1: root; 2: stem; 3: flower; 4: young leaf; 5: old leaf; 6: young melon; 7: old melon; 8: high temperature treatment (38 °C) leaf; 9: low temperature (8 °C) leaf; 10: drought treatment (1 day) leaf; 11: drought treatment (3 day) leaf.

图11 荧光定量PCR分析美洲南瓜*CpTUA*基因表达稳定性

Fig.11 Real-time quantitative PCR analysis of *CpTUA* gene expression in different situation of zucchini

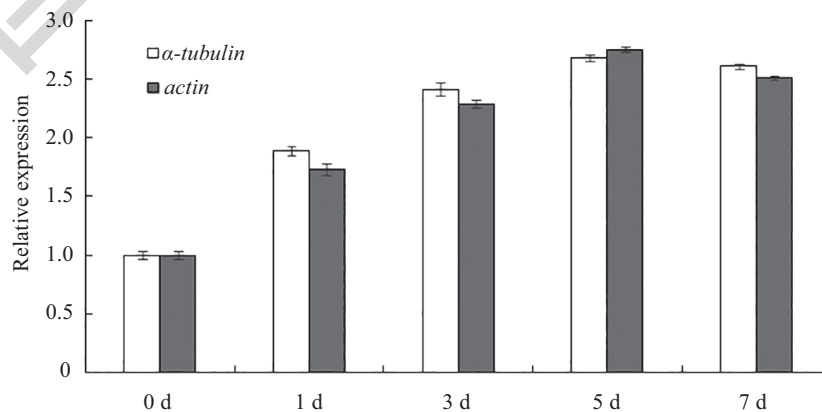


图12 荧光定量PCR分析*POD*基因量

Fig.12 Real-time quantitative PCR analysis of *POD* gene expression

POD基因在随着处理天数增加, 表达量上调, 但7天时变化减缓, 较5天有小幅度的下降,  $\alpha$ -tubulin和actin两个基因作为内参的结果一致。进一步表明, 在美洲南瓜基因表达分析研究中, CpTUA适合作为内参基因。

### 3 讨论

利用实时荧光定量PCR进行基因表达分析是阐明植物基因功能和调控机制的重要手段<sup>[18]</sup>。选择合适的内参基因是提高实时荧光定量PCR准确性的重要条件。关于美洲南瓜CpTUA基因的分离及其作为内参基因应用的研究尚未见报道。本研究获得了1条美洲南瓜CpTUA基因, 该cDNA序列全长为1 863 bp包含1个1 353 bp的ORF, 其编码 $\alpha$ -tubulin蛋白与中国南瓜(*Cucurbita moschata*, XP\_022922758.1)、印度南瓜(*Cucurbita maxima*, XP\_022984449.1)和黄瓜(*Cucumis sativus*, XP\_004150268.1)的同源蛋白相似性极高, 均达到99%。对美洲南瓜CpTUA蛋白保守结构域的同源性分析发现, 49—246位为1个保守的Tubulin结构域, 248—393位为Tubulin-C保守结构域, 显示出 $\alpha$ -tubulin家族蛋白进化的高度保守性。此外, 通过对15种植物同源 $\alpha$ -tubulin蛋白的系统进化分析也表明, 美洲南瓜CpTUA与同为葫芦科的中国南瓜、印度南瓜和黄瓜3种同源蛋白亲缘关系最为接近, 推测这些蛋白具有相近或者相似的生物学功能。美洲南瓜CpTUA基因的获得丰富了美洲南瓜内参基因的选择, 为研究美洲南瓜基因表达提供了更多参考序列和参考依据。

内参基因稳定性至关重要<sup>[19]</sup>。理想的内参基因应在所有的细胞中或各种生理状态下均能稳定低表达, 但实际上, 基因的表达在植物不同组织、生长发育过程、不同胁迫条件下都会发生改变<sup>[20-22]</sup>。内参基因的稳定性是相对的。根据不同实验材料及条件, 筛选合适的内参基因才能保障目标基因表达定量的准确性及可靠性<sup>[23]</sup>。 $\alpha$ -tubulin蛋白是生物体细胞骨架的基础成分, 在进化过程中具保守性<sup>[24]</sup>。 $\alpha$ -tubulin基因在大白菜花芽发育<sup>[22]</sup>、芝麻营养组织发育<sup>[25]</sup>和羽衣甘蓝不同组织中<sup>[26]</sup>均能稳定表达。本研究基于获得的美洲南瓜CpTUA基因全长cDNA序列, 设计了1对美洲南瓜CpTUA基因荧光定量PCR引物, PCR扩增得到180 bp大小DNA片段。通过荧光定量PCR检测发现, 该对引物的扩增曲线重复性

高且熔解曲线只有单一峰, 说明具有较高的特异性和重复性, 符合作为荧光定量PCR引物的基本条件。研究结果表明, CpTUA基因在美洲南瓜不同组织和不同胁迫处理下都能稳定表达, 适合在美洲南瓜基因表达研究中作为内参基因。在基因表达分析中, 同时使用2个或多个内参基因可以大幅度地降低系统偏差, 从而有助于获得更准确的基因定量表达数据。针对目前美洲南瓜中内参基因研究较为薄弱的现状, 今后将基于美洲南瓜转录组数据库, 继续挖掘美洲南瓜其他内参基因(如GAPDH、EF1 $\alpha$ 、18S rRNA、UBQ等), 从而进一步提高美洲南瓜基因表达分析研究的稳定性、重复性和准确性。

### 参考文献 (References)

- 1 吴会昌. 我国西葫芦育种现状、问题及对策. 北方园艺(Wu Huichang. The current situation, problems and solution of summer squashes breeding in China. Northern Horticulture) 2006; 2: 48-9.
- 2 王朝阳, 程永安, 张恩慧, 李伟, 马英夏, 高海娜. 西葫芦花蕾纵横径长度与小孢子发育关系研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版)(Wang Zhaoyang, Chen Yongan, Zhang Enhui, Li Wei, Ma Yingxia, Gao Haina. Studies on the relationship between bud size and microspore periods in squash. Journal of Northwest A&F University, Natural Science Edition) 2012; 40(5): 92-8.
- 3 周晓慧, 刘军, 庄勇. 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(Zhou Xiaohui, Liu Jun, Zhuang Yong. Selection of appropriate reference genes in *Solanum aculeatissimum* for quantitative gene expression studies under different experimental conditions. Acta Horticulturae Sinica) 2014; 41(86): 1731-8.
- 4 蒋晓梅, 张新全, 严海东, 张瑜, 杨盛婷, 黄琳凯. 柳枝稷根组织实时定量PCR分析中内参基因的选择. 农业生物技术学报[Jiang Xiaomei, Zhang Xinquan, Yan Haidong, Zhang Yu, Yang Shengting, Huang Linkai. Reference gene selection for Real-time quantitative PCR normalization in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) root tissue. Journal of Agricultural Biotechnology] 2014; 22(1): 55-63.
- 5 Wan HJ, Zhao ZG, Qian CT, Sui YH, Malik AA, Chen JF. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative Real-time polymerase chain reaction in cucumber. Anal Biochem 2010; 399: 257-61.
- 6 Cruz F, Kalaoun S, Nobile P, Colombo C, Almeida J, Barros LG, et al. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative Real-time RT-PCR. Mol Breeding 2009; 23(4): 607-16.
- 7 Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 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. Cancer Res 2004; 64(15): 5245-50.
- 8 朱海生, 陈敏敏, 温庆放, 蓝新隆, 李永平, 王彬, 等. 丝瓜18S rRNA基因克隆及其作为内参基因的应用. 核农学报(Zhu

- Haisheng, Chen Mindong, Wen Qingfang, Lan Xinlong, Li Yongping, Wang Bin, *et al.* Cloning of 18S rRNA gene from *Luffa cylindrical* and its application as an internal standard. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences* 2016; 30(1): 35-41.
- 9 Chen JH, Sun Y, Sun F, Xia XL, Yin WL. Tobacco plants ectopically expressing the *Ammopiptanthus mongolicus AmCBL1* gene display enhanced tolerance to multiple abiotic stresses. *Plant Growth Regul* 2011; 63(3): 259-69.
- 10 Zhou L, Wang Y, Peng ZH. Molecular characterization and expression analysis of chalcone synthase gene during flower development in tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Afr J Biotechnol* 2011; 10(8): 1275-84.
- 11 王彦杰, 董丽, 张超, 王晓庆. 牡丹实时定量PCR分析中内参基因的选择. 农业生物技术学报[Wang YanJie, Dong Li, Zhang Chao, Wang Xiaoqing. Reference gene selection for Real-time quantitative PCR normalization in Ttree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr. ) *Journal of Agricultural Biotechnology*] 2012; 20(5): 521-8.
- 12 Wade RH. On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol* 2009; 43(2): 177-91.
- 13 董吉元, 杨双熙, 陈叶叶, 刘娟, 马爱民. 银耳 $\alpha$ -微管蛋白基因的克隆及序列分析. 园艺学报(Dong Jiyuan, Yang Shuangxi, Chen Yeye, Liu Juan, Ma Aimin. Cloning and sequence analysis of  $\alpha$ -tubulin gene from tremella fuciformis. *Acta Horticulturae Sinica*) 2011; 38(5): 921-9.
- 14 黄河, 牛雅静, 杨可, 戴思兰. 甘菊内参基因CITUA的克隆与表达分析. 北京林业大学学报(Huang He, Niu Yajing, Yang Ke, Dai Silan. Isolation and expression analysis of a reference gene: CITUA of *Chrysanthemum lavandulifolium*. *Journal of Beijing Forestry University*) 2012; 34(2): 112-7.
- 15 Zhu HS, Liu JT, Wen QF, Chen MD, Wang B, Zhang QR, *et al.* *De novo* sequencing and analysis of the transcriptome during the browning of fresh-cut *Luffa cylindrical* 'Fusi-3' fruits. *PLoS One* 2017; 12(11): e0187117.
- 16 Bezold TN, Mathews D, Loy JB, Minocha C. Molecular analysis of the hull-less seed trait in pumpkin: expression profiles of genes related to seed coat development. *Seed Sci Res* 2005; 15(3): 205-17.
- 17 刘佳, 徐秉良, 薛应钰, 张树武, 陈荣贤. 美洲南瓜(*Cucurbita pepo*)种皮苯丙氨酸解氨酶基因克隆与表达分析. 中国农业科学(Liu Jia, Xu Bingliang, Xue Yingyu, Zhang Shuwu, Chen Rongxian. Cloning and expression analysis of PAL gene in seed coat of *Cucurbita pepo*. *Scientia Agricultura Sinica*) 2014; 47(6): 1216-26.
- 18 Mascia T, Santovito E, Gallitellid D, Cillo F. Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. *Mol Plant Pathol* 2010; 11(6): 805-16.
- 19 Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 2008; 20(7): 1736-7.
- 20 Chen L, Zhong HY, Kuang JF, Li JG, Lu WJ, Chen JY. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta* 2011; 234(2): 377-90.
- 21 Wei LB, Miao HG, Zhao RH, Han XH, Zhang TD, Zhang HY. Identification and testing of reference genes for Sesame gene expression analysis by quantitative Real-time PCR. *Planta* 2013; 237: 873-89.
- 22 Xu XY, Yang ZP, Sun XL, Zhang LG, Fang ZY. Selection of reference genes for quantitative Real-time PCR during flower bud development in CMS7311 of heading Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Acta Physiol Plant* 2014; 36: 809-14.
- 23 Chen Y, Tan Z, Hu B, Yang Z, Xu B, Zhang L, *et al.* Selection and validation of reference genes for target gene analysis with quantitative RT-PCR in leaves and roots of bermudagrass under four different abiotic stresses. *Physiol Plantarum* 2015; 155(2): 138-48.
- 24 Deng LT, Wu YL, Li JC, Ouyang KX, Ding MM, Zhang JJ, *et al.* Screening reliable reference genes for RT-qPCR analysis of gene expression in *Moringa oleifera*. *PLoS One* 2016; 11(8): e0159458.
- 25 Wei LB, Miao HM, Zhao RH, Han XH, Zhang TD, Zhang HY. Identification and testing of reference genes for Sesame gene expression analysis by quantitative Real-time PCR. *Planta* 2013; 237: 873-89.
- 26 李晗, 李治龙, 李晓屿, 李玉花, 蓝兴国. 羽衣甘蓝不同组织及柱头发育实时荧光定量PCR内参基因的筛选. 植物研究(Li Han, Li Zhilong, Li Xiaoyu, Li Yuhua, Lan Xingguo. Selection of reference genes for Real-time fluorescence quantitative PCR in different tissues and stigma development from Ornamental Kale. *Bulletin of Botanical Research*) 2016; 36(4): 565-72.