

发育期火龙果内参基因的筛选和验证

崇慧影, 文晓鹏*

(贵州大学农业生物工程研究院/生命科学院, 山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: [目的]筛选火龙果果实发育期稳定表达的内参基因。[方法]以火龙果不同发育时期的果实为材料,利用 qRT-PCR 技术检测 17 个看家基因的表达水平,借助 geNorm 和 NormFinder 筛选出果实发育期理想的内参基因。[结果] GeNorm 评估 *YLS8* 和 *ACT* 并列排名第一,表达稳定值均为 0.221,配对差异值 $V_{2/3}$ 为 0.105; NormFinder 排名前两名为 *TBP2* 和 *YLS8*,表达稳定值为 0.160 和 0.191。使用内参基因 *YLS8* 和 *TBP2* 分析火龙果甜菜色素合成途径关键基因 *HpCytP450-like1* 的表达水平,与基因 *HpCytP450-like1* 在火龙果果实发育期表达趋势一致。[结论]从 17 个候选基因中筛选出 2 个理想的内参基因 *YLS8* 和 *TBP2*,可作为火龙果果实发育期相关基因的表达调控研究。

关键词: 火龙果; 内参基因; 实时荧光定量 PCR; geNorm 程序; NormFinder 程序

中图分类号: Q291 文献标识码: A DOI: 10.16519/j.cnki.1004-311x.2019.01.0008

Screening and validation of reference genes during fruit development in pitaya

CHONG Hui-ying, WEN Xiao-peng*

(Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region(Ministry of Education), Institute of Agro-bioengineering/ College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract [Objective] To identify appropriate reference genes during fruit development of pitaya. [Method] Using pulps from four developmental stages as materials, expression of 17 widely used reference genes was detected by qRT-PCR, and reliable reference gene were recommended by geNorm and NormFinder. [Result] *YLS8* and *ACT* were determined as the most stable genes by geNorm and were suitable to be used as internal control for qRT-PCR, the expression stability was 0.221, and the pairwise variation $V_{2/3}$ was 0.105; *TBP2* and *YLS8* were determined as the most stable genes by NormFinder, expression stability values were 0.160 and 0.191 respectively. To validate the stability of screened out reference genes, expression of *HpCytP450-like1*, an important gene in betalain biosynthesis, was calibrated by *YLS8* or *TBP2*. The expression trends were constant which indicated stability of *YLS8* and *TBP2* in pulps during development. [Conclusion] Two ideal reference genes, *YLS8* and *TBP2*, were screened out from 17 candidate genes to calibrate expression of genes during fruit development of pitaya.

Keywords: pitaya; reference genes; qRT-PCR; geNorm software; NormFinder software

实时荧光定量 PCR (Real-time Fluorescence quantitative PCR) 技术通过加入特定荧光基团并实时监测产物变化,实现对目标基因(target gene)定性定量表达分析^[1]。前人研究^[2]通过干旱处理火龙果组培幼苗筛选的内参基因,而本文更加深入系统的对火龙果果实发育期内参基因筛选,内参基因表达并非恒定,同一物种不同实验条件、不同发育期、不同部位等表达量差异较大,未经筛选会导致错误的结论^[3],因此,内参基因的筛选是保证结果可靠性的前提。

火龙果属仙人掌科(Cactaceae)三角柱属(*Hylo-*

cereus)。目前已有许多研究将火龙果作为色素原料^[4]。当前运用分子生物学方法研究火龙果甜菜色素代谢途径及其调控机理已成为热点,目前关于火龙果果实发育期内参基因的稳定性研究尚未分析。

笔者以红肉火龙果(*Hylocereus polyrhizus*)、白肉火龙果(*Hylocereus undatus*)不同发育期的果实为材料,利用 qRT-PCR 技术分析 17 个候选内参基因的表达,通过 geNorm 及 NormFinder 稳定性评估^[5]筛选出适合火龙果果实发育期理想的内参基因,为揭示火龙果色素代谢和调控机理具有重要的理论和实践意义。

收稿日期: 2018-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760566)

作者简介: 崇慧影(1992-),女,安徽省阜阳市人,硕士生,研究方向: 细胞生物学, E-mail: 2269849379@qq.com。

* 通讯作者: 文晓鹏(1965-),男,博士,教授,研究方向: 植物生物技术与遗传育种,近 5 年发表论文 30 余篇, E-mail: xpwenc@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

取红肉火龙果品种 - 紫红龙、白肉火龙果品种 - 晶红龙, 采自贵州省罗甸火龙果种植基地(兴成果

园)。人工授粉后第 25 d、30 d、35 d、40 d 采果肉样品, 依次为红肉果实的着色前期(H1)、破色期(H2)、着色期(H3)、成熟期(H4) 及同时期白肉 B1、B2、B3、B4, 每次取 3 个样本, 每个样本设 3 个生物学重复, 参照前人方法取样^[6], 液氮速冻后存于 - 80 ℃ 超低温冰箱。

表 1 火龙果候选内参基因筛选的 PCR 引物序列

Tab. 1 Sequences of the primers for reference gene identification in pitaya

基因简称 Gene number	GenBank ID	注释信息 Annotation	引物序列 Primer sequences	扩增长度(bp) Product size (bp)	扩增效率 Amplification efficiency	R ²
<i>TBP2</i>	MF356277	TATA - box - binding protein 2	F - ATAAAGGAAGGGAGGGAGAC R - ATGATTACAGCAGCGAAACG	223	2.002	0.993
<i>ACT</i>	MF356257	Actin - 7	F - GCGGCAGACCACCTACAACCTC R - GCGGATTCATCGTATTACCCC	276	1.973	1.000
<i>DNJH</i>	MF356263	DnaJ protein homolog	F - GCGGCTACTACCACCACCAAA R - CCCGAAGAGCGATAACACCAG	313	1.982	0.997
<i>G3P</i>	MF356269	Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase	F - GCCAAGTCTTAGAGCCAAATGAAC R - CGATGAGCAGAATAAAGCAGGAG	344	1.999	0.998
<i>UBC</i>	MF356282	Ubiquitin - conjugating enzyme E2 - 17 kDa	F - GCGGGTCTCATTTGTTCTCATTC R - CGGCTTTGTCTTTCCGATACITTTT	161	1.982	0.999
<i>GUN25</i>	MF356266	Endoglucanase 25	F - GGCACATATCGTGTTCCGGGTTT R - GCTCGGCAAGAATCCTCGTAA	171	1.990	0.995
<i>CYP I</i>	MF356271	Peptidyl - prolyl cis - trans isomerase 1	F - TCAACAACCTGACCGAACACG R - GCAAGAGGAGGAGCAAAACCAA	498	1.972	0.997
<i>RH II</i>	MF362594	DEAD - box ATP - dependent RNA helicase 2	F - GGTAAAAGCGTGGGTGAGGATA R - GCTTGGGTGATGTAAGAGTGTC	413	1.988	0.999
<i>YLS8</i>	MF356278	Thiore doxin - like protein YLS8	F - GCTCGGTTATGTCCACAAGGTA R - CGGAAGAAGAGCGTCTCGTTA	138	1.986	0.999
<i>PTBP1</i>	MF356284	Polypyrimidine tract - binding protein homolog 1	F - AGCGACTTTGGCAACAGAGGC R - CCGTGTGAACCCGACAGCATT	256	1.981	0.998
<i>2AAG</i>	MF356276	Serine/threonine - protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A gamma isoform	F - GCCTTGCTTCCCTTCCACTC R - GGCTCCTGTCTTGGGCTCTG	307	1.963	0.998
<i>TBB</i>	MF356281	Tubulin beta chain	F - CCCCCGTCTCCACTTCTTCA R - GTCTGCTCGTCCACCTCCTTG	210	1.993	0.998
<i>TBA3</i>	MF356280	Tubulin alpha - 3 chain	F - GCACCGACCTCCTCATAATCC R - CCACCATCAAGACCAAGCGTA	313	2.002	0.998
<i>Q8H3I3</i>	MF356273	Putative 40S ribosomal protein	F - GACACTGATTCTCCTTTGCGTTAT R - CCTTTGGTCTCCTCTGGCTCT	191	1.981	0.996
<i>Q9SKNI</i>	MF356283	Vacuolar fusion protein MON1 homolog	F - ACACCACCGCCACCACTTCT R - GCACCCTAAGCCGTCCGATAA	267	1.997	0.996
<i>FK111</i>	MF356268	F - box/kelch - repeat protein At5g15710	F - GTCCGCAATGTTCCGTCTTTA R - GGCATACTCGGCAATGTCCT	196	1.991	0.999
<i>RDRVI</i>	MF356275	RNA - dependent RNA polymerase 6	F - GCTTTTCGTCGCTCTTTTCCTC R - GCTTCTTTAGTCGGCACCTCC	473	1.986	0.999

1.1.2 试剂

总 RNA 提取试剂盒、DNA Marker 购于 TIAN-GEN 公司(北京); 反转录试剂盒购于 TakaRa 公司(大连); PowerUp™ SYBR Green Master Mix 购于 ABI 公司(美国)等。

1.1.3 仪器

-80℃ 超低温冰箱(海尔/DW-86L626)、电泳仪(JY-CX3B 君意东方)、荧光定量 PCR 仪(CFX-connect)等。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取

按试剂盒说明书提取 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳进行完整性验证, -80℃ 保存。

1.2.2 cDNA 合成及引物设计

按试剂盒说明书操作, RNA 用量为 1 μg, 反转录产物 5 倍稀释后 -20℃ 保存。在贵州大学农业生物工程重点实验室前期基础上筛选了较稳定的 17 条序列(来源于 NCBI), 引物合成于上海生工。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 17 个候选内参基因 PCR 扩增产物。

1.2.3 实时荧光定量 PCR

反应体系 10 μL: 荧光染料 5 μL, 上下游引物(10 μmol/L) 各 0.25 μL, cDNA 模版 1 μL, 超纯水

3.5 μL。扩增条件: 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 15 s, 退火 30 s, 延伸 1 min, 进行 40 个循环, 65~95℃ 每 0.5℃ 进行 1 次荧光监测测定熔解曲线, 每个样品设 3 次重复。

1.2.4 数据处理

使用 linRegPCR 程序从扩增图中分析引物扩增效率^[7]。用 geNorm 及 NormFinder 对 17 个候选内参基因稳定性评估, 将原始 C_q 值根据公式($Q = 2^{C_{q_{max}} - C_{q_{sample}}}$, Q 为相对表达量, C_{q_{max}} 为各样品中最大 C_q 值, C_{q_{sample}} 为各样品 C_q 值)转换成相对表达量 Q 输入软件中计算^[8], 最终通过等权重重新排序。

1.2.5 稳定性验证

HpCytP450-like1 是火龙果甜菜色素合成途径的关键基因, 与甜菜色素积累成正相关, 用筛选的内参基因对其表达水平验证, 荧光定量反应体系同上所述。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取

电泳检测总 RNA 显示 28S、18S 条带清晰明显(图 1), 酶标仪检测浓度为 134.3~401.6 μg/mL, OD_{260/280} 为 1.91~2.27, 说明提取的总 RNA 未降解, 完整性良好, 符合后续荧光定量 PCR 实验要求。

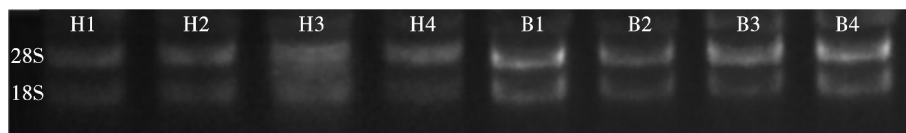


图 1 火龙果 RNA 提取

注: H1、H2、H3、H4 和 B1、B2、B3、B4 分别为红肉和白肉火龙果果实 4 个发育期。

Fig.1 RNA extraction in pitaya

Note: H1, H2, H3, H4 and B1, B2, B3, B4 respectively, were *Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*, which were four stages of fruit development.

2.2 引物扩增

产物条带单一(图 2), 无引物二聚体及非特异性扩增, 扩增产物经测序、比对与预期目的片段一

致, 表明 17 个候选内参基因均能够特异性扩增目的片段, 满足后续 qRT-PCR 分析。

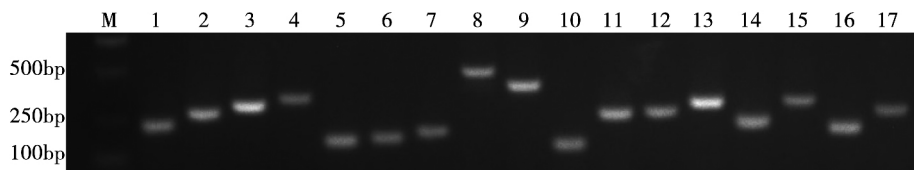


图 2 火龙果 17 种内参基因的 PCR 扩增产物

Fig.2 PCR products of 17 reference genes in pitaya

Note: M: DL2000 Marker; 1: *TBP2*; 2: *ACT*; 3: *DNJH*; 4: *G3P*; 5: *UBC*; 6: *GUN25*; 7: *FK111*; 8: *CYP I*; 9: *RH II*; 10: *YLS8*; 11: *PTBPI*; 12: *RDR VI*; 13: *2AAG*; 14: *TBB*; 15: *TBA3*; 16: *Q8H3B3*; 17: *Q9SKNI*.

2.3 荧光定量 PCR

17 个候选看家基因的熔解曲线均为单一峰(图

3) ,表明 qRT - PCR 反应专一性高 ,引物特异性强 ,结果是准确可信的。

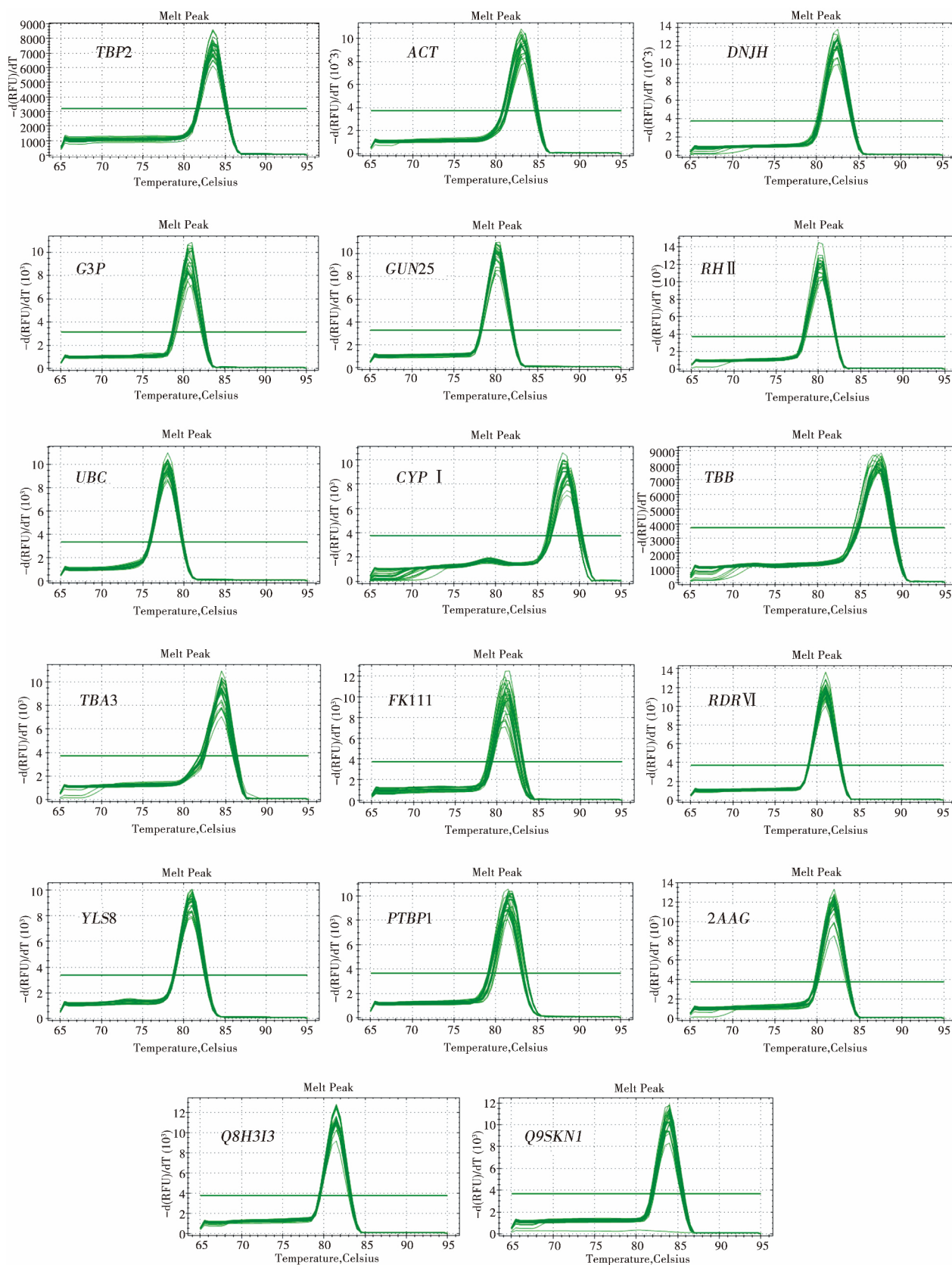


图 3 火龙果 17 种内参基因的 qRT - PCR 溶解曲线

Fig. 3 qRT - PCR melting curves of 17 reference genes in pitaya

2.4 数据处理及分析

GeNorm 程序中 M 值越小, 稳定性越好。17 个候选内参基因最高 M 值为 0.996, 均小于默认值

1.5, 表明 17 个候选基因稳定性较好, 其中 *ACT* 和 *YLS8* 在火龙果果实发育期最稳定, M 值为 0.221 (图 4)。

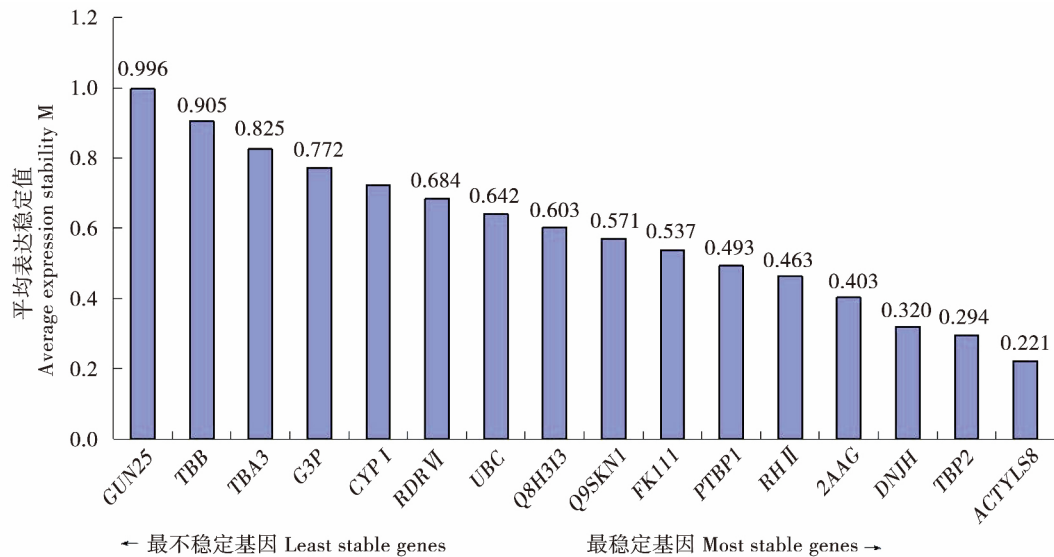


图 4 GeNorm 检测的火龙果各内参基因表达稳定值 (M)

Fig. 4 Expression stability values (M) of reference genes calculated by geNorm in pitaya

通过配对差异值 ($V_{n/n+1}$) 确定内参基因数目, 本研究 $V_{2/3}$ 为 0.105 (图 5), 小于 0.15, 所以不必引

入第 3 个基因进行校正, 内参基因最适数目为 2 个, 即 *YLS8* 和 *ACT*。

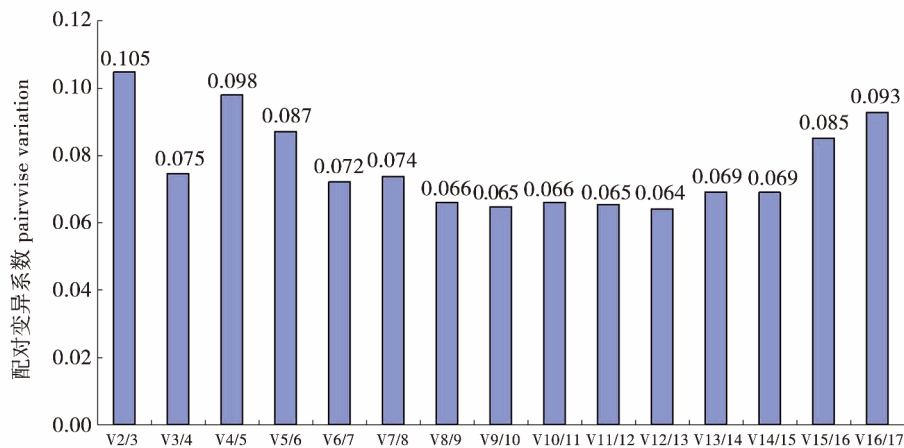


图 5 GeNorm 分析火龙果候选内参基因配对变异系数

Fig. 5 Pairwise variations analyses of candidate reference genes by geNorm in pitaya

NormFinder 程序显示, *TBP2* 表达稳定值为 0.160, 是最优内参基因; 其次是 *YLS8*, 表达稳定值为 0.191 (图 6)。综合排序可知 (表 2): 两软件评估结果有所差异, 但排名趋势基本一致。

结合 PCR 分析内参基因 *YLS8* 和 *TBP2* 的转录水平, 在火龙果果实发育期均稳定表达 (图 7), 综合 *YLS8* 和 *TBP2* 可作为稳定的内参基因用于火龙果色

素合成途径相关基因表达的研究。

2.5 内参基因稳定性验证

分别以 *YLS8* 和 *TBP2* 为内参基因时, *CytP450-like1* 基因在红肉火龙果果实的表达与甜菜素含量成正相关, 均在果实发育后期明显上升; 以 *YLS8* 和 *TBP2* 共同为内参时, 其表达趋势一致 (图 8)。说明采用 *YLS8* 和 *TBP2* 为内参基因进行校正分析火龙

果着色相关基因表达水平时 相对定量结果较可靠， 果色素代谢相关基因的表达研究。
再次验证 *YLS8* 和 *TBP2* 可作为内参基因进行火龙

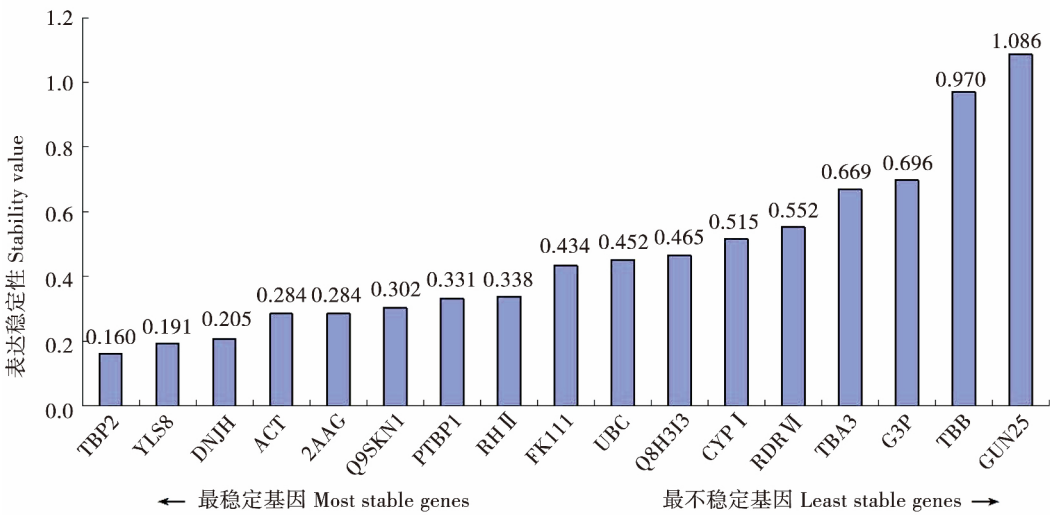


图 6 NormFinder 分析火龙果 17 个内参基因的表达稳定值
Fig.6 Gene expression stability of the 17 candidate genes as predicted by NormFinder in pitaya

表 2 火龙果候选内参基因评估
Tab.2 Evaluation of candidate reference genes in pitaya

内参基因 Reference genes	GeNorm		Normfinder		综合排名 Ranking
	M 值	排名	稳定值	排名	
	M value	Ranking	Stability value	Ranking	
<i>ACT</i>	0.221	1	0.284	4	2
<i>YLS8</i>	0.221	1	0.191	2	1
<i>TBP2</i>	0.294	2	0.160	1	1
<i>DNJH</i>	0.320	3	0.205	3	3
<i>2AAG</i>	0.403	4	0.284	4	4
<i>RH II</i>	0.463	5	0.338	7	5
<i>PTBP1</i>	0.493	6	0.331	6	5
<i>FK111</i>	0.537	7	0.434	8	7
<i>Q9SKN1</i>	0.571	8	0.302	5	6
<i>Q8H3I3</i>	0.603	9	0.465	10	8
<i>UBC</i>	0.642	10	0.452	9	8
<i>RDRVI</i>	0.684	11	0.552	12	9
<i>CYP I</i>	0.723	12	0.515	11	9
<i>G3P</i>	0.772	13	0.696	14	10
<i>TBA3</i>	0.825	14	0.669	13	10
<i>TBB</i>	0.905	15	0.970	15	11
<i>GUN25</i>	0.996	16	1.086	16	12

3 讨论

荧光定量 PCR 是对常规 PCR 技术的进一步补充和发展 在基因表达分析方面被广泛应用;但分析

过程中易受到 RNA 完整性、反转录 cDNA 质量、引物特异性和 PCR 扩增效率等因素影响^[9],PCR 扩增过程中通常使用内参基因对目标基因表达量进行校正,使表达数据更标准化^[10]。近年来大量研究表

明, 针对于特定实验条件下任一内参基因也只是相对稳定表达, 未经筛选盲目以一种看家基因作为内

参基因, 会得到精准度低甚至错误的实验结论^[11]。因此, 筛选可靠、稳定表达的内参基因至关重要^[12]。

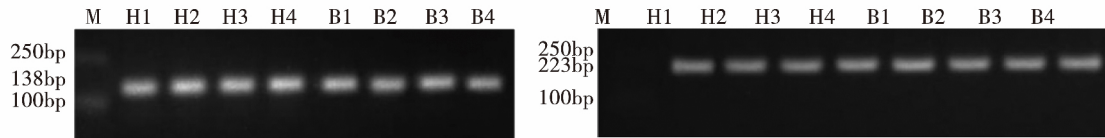


图7 火龙果 *YLS8* (左) 和 *TBP2* (右) 内参基因普通 PCR 扩增产物

注: M: DL2000 Marker; H1、H2、H3、H4 和 B1、B2、B3、B4 分别为红肉和白肉火龙果果实 4 个发育期。

Fig. 7 PCR products of *YLS8* (left) and *TBP2* (right) in pitaya

Note: M: DL2000 Marker; H1、H2、H3、H4 and B1、B2、B3、B4, respectively, were *Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*, which were four stages of fruit development.

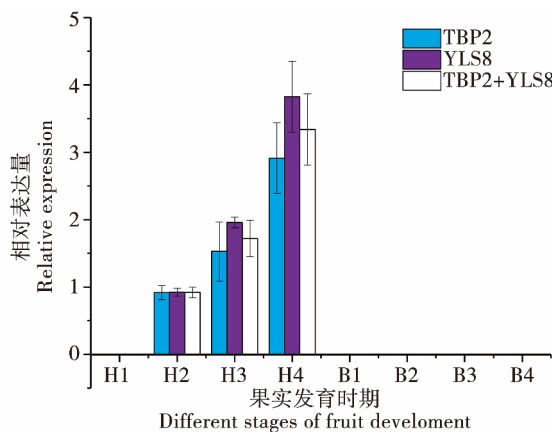


图8 发育期火龙果 *HpCytP450-like1* 的表达水平

注: H1、H2、H3、H4 和 B1、B2、B3、B4 分别为红肉和白肉火龙果果实 4 个发育期。

Fig. 8 Expression level of *HpCytP450-like1* in different developmental stages of pitaya

Note: H1、H2、H3、H4 and B1、B2、B3、B4, respectively, were *Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*, which were four stages of fruit development.

GeNorm 在评价和筛选稳定的内参基因方面更加完善, 该程序不考虑其他内参基因来选择合适的内参基因, 而 NormFinder 则考虑其他的内参基因再选择合适的持家基因。本实验 17 个候选内参基因 M 值介于 0.221 ~ 0.996 之间, 均小于临界值 1.5, 配对差异值 $V_{2/3}$ 为 $0.105 < 0.15$, 表明只需要 2 个内参基因作为标准化指标。通过 2 种程序稳定性分析可知: 本实验中各候选内参基因在综合排序中虽然存在微小的名次变动, 但在两程序中稳定性排名趋势基本一致, 这与前人研究较一致^[13]。出现名次变动的原因可能是本研究选取的候选基因数目较多, 稳定性较接近, 同时 geNorm、NormFinder 由于计算方法和原理有所不同, 评估结果会呈现一些差异, 在苹果和玉米等植物的内参基因研究中也出现类似

报道^[14-15]。

使用 1 个内参基因校正造成的实验误差要比使用 2 个以上内参基因高得多, 而前人研究火龙果色素相关基因时仅用 *Actin* 基因作为内参基因^[16-17], 为提高实验的精准度, 本研究更加全面系统地筛选火龙果果实发育期的内参基因。用筛选的内参基因 *YLS8* 和 *TBP2* 分析 *HpCytP450-like1* 基因的表达水平: *HpCytP450-like1* 在白肉果实中几乎不表达, 红肉果实在着色前期相对表达量较低, 随后呈逐渐上升趋势, 此结果与基因 *HpCytP450-like1* 与火龙果色素积累成正相关这一结果相符合。进一步证实 *YLS8* 和 *TBP2* 作为理想的内参基因可用于火龙果果实发育期色素相关基因表达。

4 结论

通过 geNorm 和 NormFinder 两软件综合评估以及对所筛选的内参基因进行稳定性验证, 最终筛选出 2 个理想的内参基因 *YLS8* 和 *TBP2*。2 个内参基因的校正使实验结果更精确, 这一研究为火龙果中甜菜色素合成与代谢以及果实发育期功能基因表达提供了理论依据。

参考文献

- [1] Annapaula Giulietti, Lut Overbergh, Dirk Valckx, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression [J]. *Methods* 2001, 25(4): 386-401.
- [2] 罗霞, 文晓鹏. 火龙果 UQT 和 18S rRNA 内参基因片段的克隆及表达分析 [J]. *山地农业生物学报* 2015, 32(2): 023-026.
- [3] Rui Ma, Sheng Xu, Yucheng Zhao, et al. Selection and validation of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *lycoris aurea* [J]. *Frontiers In Plant Science* 2016, 7: 536. DOI: 10.3389/fpls.2016.00536.

(下转第 56 页)

参考文献

- [1] Michon C ,Langella P ,Eijsink Vincent ,et al. Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications[J]. Microbial Cell Factories 2016 ,15(1) : 70.
- [2] 曲冬梅 ,刘小杰. 植物乳杆菌及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂 2008 ,1: 219 - 222.
- [3] 苏森森 ,潘渠. 益生菌对宿主心理健康及脑功能的积极影响及其机制[J]. 中国微生态学杂志 2017 29(4) : 476 - 480.
- [4] Xi XD ,Fan J ,Hou Y ,et al. Characterization of three cryptic plasmids from *Lactobacillus plantarum* G63 that was isolated from Chinese pickle[J]. Plasmid 2013 ,70(3) : 321 - 328.
- [5] 孙大庆 ,李洪飞 ,杨健 ,等. 植物乳杆菌编码复制起始蛋白天然质粒的系统进化分析[J]. 微生物学通报 2017 ,44(5) : 1047 - 1055.
- [6] 孙大庆 ,李洪飞 ,杨健 ,等. 植物乳杆菌天然质粒系统进化和起源[J]. 微生物学报 2017 57(12) : 1908 - 1923.
- [7] 孙大庆 ,李洪飞 ,宋大巍 ,等. 乳杆菌属天然质粒研究进[J]. 食品科学 2015 3(11) : 251 - 255.
- [8] 王海娟 ,戴雨珂 ,苏森森 ,等. 一个植物乳杆菌隐蔽质粒的序列分析[J]. 生物技术 2016 26(2) : 158 - 162.
- [9] Del Solar G ,Moscoso M ,Espinosa M. Rolling circle - replicating plasmids from gram - positive and gram - negative bacteria: a wall falls[J]. Mol Microbiol 1993 ,8(5) : 789 - 796.
- [10] Jossion K ,Soetaert P ,Michiels F ,et al. *Lactobacillus hilgardii* plasmid pLAB1000 consists functional cassettes commonly found in other gram - positive organisms [J]. Journal of Bacteriology , 1990 ,172(6) : 3089 - 3099.
- [11] Pan Q ,Cong YG ,Hou R ,et al. Purification and characterization of glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase from *Lactobacillus acidophilus* [J]. J Immun 2009 25 (4) : 461 - 464.
- [12] Yao F ,Xu XY ,Pan Q . A modified method for plasmid extraction from *Lactobacillus plantarum* contained lysozyme removal step [J]. Analytical Biochemistry 2019 ,566: 37 - 39.
- [13] Furmanek Blaszk B. Phenotypic and molecular characteristics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from the River Nile [J]. Microbiological Research 2014 ,169(7 - 8) : 547 - 552.
- [14] Guglielmetti S ,Mora D ,Parini C. Small rolling circle plasmids in *Bacillus subtilis* and related species: Organization ,distribution , and their possible role in host physiology [J]. Plasmid 2007 ,57(3) : 245 - 264.
- [15] Lovett PS ,Bramucci MG. Plasmid deoxyribonucleic acid in *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* [J]. Journal of Bacteriology , 1975 ,124(1) : 484 - 490.
- [16] Guglielmetti S ,Mora D ,Manachini PL ,et al. Genetic relationship among *Bacillus licheniformis* rolling - circle - replicating plasmids and complete nucleotide sequence of pBL63. 1 ,an atypical replicon [J]. Plasmid 2005 54(2) : 93 - 103.
- [17] Wilfried J. J Meijer G. Bea A Wisman ,Peter Terpstra ,et al. Rolling - circle plasmids from *Bacillus subtilis*: complete nucleotide sequences and analyses of genes of pTA1015 ,pTA1040 ,pTA1050 and pTA1060 and comparisons with related plasmids from Gram - positive bacteria [J]. Fems Microbiology Reviews ,1998 ,21(4) : 337 - 368.
- [18] XQ Zhao ,KH Park ,YY Jin ,et al. Isolation and characterization of a new γ - polyglutamic acid producer ,*Bacillus mesentericus* MJM1 from Korean domestic Chungkukjang bean paste [J]. Microbiol Biotechnol 2005 ,15(1) : 59 - 65.
- [19] Hara T ,Nagatomo S ,Ogata S ,et al. Molecular structure of the replication origin of a *Bacillus subtilis* (natto) plasmid ,pUH1 [J]. Appl Environ Microbiol 1991 57(6) : 1838 - 1841.
- [20] Horinouchi S ,Weisblum B. Nucleotide sequence and functional map of pC194 ,a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance [J]. Bacteriol 1982 ,150 (2) : 815 - 825.
- [21] 高淑娟. 细菌中获得并转移耐药基因 - 质粒概述 [J]. 山东畜牧兽医 2017 38(9) : 81.

(上接第 45 页)

- [4] 蒋边. 火龙果色素研究进展[J]. 食品工程 2015 4(4) : 6 - 10.
- [5] 吴建阳 ,何冰 ,杜玉洁 ,等. 利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行内参基因稳定性分析的方法 [J]. 现代农业科技 , 2017 4(5) : 278 - 281.
- [6] Menv Cheng ,Zijuan Huang ,Qingzhu Hua ,et al. The WRKY transcription factor hprwky44 regulates *cytP450-like1* expression in red pitaya fruit (*Hylocereus polyrhizus*) [J]. Horticulture Research , 2017 4: 17039. DOI: 10. 1038/hortres. 2017. 39.
- [7] Christian Ramakers ,Jan M Ruijter ,Ronald H. Lekanne Deprez ,et al. Assumption - free analysis of quantitative real - time polymerase chain reaction (PCR) data [J]. Neuroscience Letters ,2003 ,339(1) : 62 - 66.
- [8] 刘晓婷 ,王顺利 ,薛璟祺 ,等. 朱顶红实时荧光定量 PCR 中不同组织器官内参基因的筛选 [J]. 园艺学报 ,2018 ,45(5) : 919 - 930.
- [9] Stephen A Bustin ,Vladimir Benes ,Jeremy A Garson ,et al. The miq guidelines: minimum information for publication of quantitative real - time PCR experiments [J]. Clinical Chemistry 2009 55(4) : 611 - 622.
- [10] Mengyao Li ,Feng Wang ,Qian Jiang ,et al. Validation and comparison of reference genes for qPCR normalization of celery (*Apium graveolens*) at different development stages [J]. Frontiers In Plant Science 2016 7(313) . DOI: 10. 3389/fpls. 2016. 00313.
- [11] Florence Postollec ,Hélène Falentin ,Sonia Pavan ,et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology [J]. Food Microbiology 2011 28(5) : 848 - 861.
- [12] Jian Sang ,Zhennan Wang ,Man Li ,et al. ICG: a wiki - driven knowledgebase of internal control genes for RT - qPCR normalization [J]. Nucleic Acids Research 2017 46(D1) : D121 - D126.
- [13] Asad Maroufi ,Erik Van Bockstaele ,Marc De Loose. Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real - time PCR [J]. BMC Molecular Biology 2010 ,11(1) : 15. DOI: 10. 1186/1471 - 2199 - 11 - 15.
- [14] 樊连梅 ,王超 ,刘更森 ,等. 苹果着色期实时定量 PCR 内参基因的筛选和验证 [J]. 植物生理学报 2014 4(12) : 1903 - 1911.
- [15] 姜婷 ,苏乔 ,安利佳. 多重胁迫下玉米实时定量 PCR 内参基因的筛选与验证 [J]. 植物生理学报 2015 4(9) : 1457 - 1464.
- [16] Qingzhu Hua ,Chengjie Chen ,Zhe Chen ,et al. Transcriptomic analysis reveals key genes related to betalain biosynthesis in pulp coloration of *Hylocereus polyrhizus* [J]. Front Plant Sci 2016 6(499) : 1179. DOI: 10. 3389/fpls. 2015. 01179.
- [17] 曾灿彬 ,徐敏 ,齐钊 ,等. 火龙果果肉颜色相关 MYB 转录因子的表达分析 [J]. 热带生物学报 2017 8(2) : 153 - 158.