

## 草原龙胆盐胁迫差减文库的构建及分析

王继刚<sup>1</sup>, 张 坤<sup>2</sup>, 徐启江<sup>1</sup>, 李玉花<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040; <sup>2</sup> 西南林学院学报编辑部, 昆明 650224)

**摘 要:** 为了研究草原龙胆抗盐性机理, 初步获得其抗盐性相关基因, 分别以 400 mmol · L<sup>-1</sup> 的 NaCl 及清水处理的草原龙胆叶片 mRNA 为 tester 和 driver 方, 利用抑制差减杂交技术构建了 cDNA 文库。经过测序和与 Gene Ontology 数据库序列比对, 获得了 658 条单一序列, 其中 61 条序列分子功能未知, 535 条序列无同源性, 62 条序列有显著同源性。此 62 条序列注释按照功能分为 21 类。获得了活性氧清除系统基因 *DHAR*、*GST*、*TRX*、*CAT*, 转录因子 *SMT3*, 调控基因丝氨酸/苏氨酸激酶基因等。结果说明草原龙胆的盐抗性相关基因与数据库中的模式植物基因既有一定的共性, 同时绝大部分的序列又无法用已知的基因进行解释。

**关键词:** 草原龙胆; 抑制差减杂交; 差异基因; 盐胁迫

**中图分类号:** S 682    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0513-353X (2008) 07-1075-06

## Construction and Analysis of *Eustoma grandiflorum* Subtracted cDNA Library

WANG Ji-gang<sup>1</sup>, ZHANG Kun<sup>2</sup>, XU Qi-jiang<sup>1</sup>, and LI Yu-hua<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; <sup>2</sup> Editorial Department of Academic Journal, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

**Abstract:** To research salt tolerance mechanism and get the salt tolerance relative genes of *Eustoma grandiflorum*, a cDNA library was made by suppression subtractive hybridization technique. The leave mRNA of *Eustoma grandiflorum* treated with 400 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl was tester, and that treated with pure water was driver. From the library, we got 658 unique sequences by sequencing and sequence blasting. Sixty-one of the total sequences are functioning unknown, 535 sequences have no homology and 62 sequences have significance homology to the Gene Ontology sequence library. The 62 sequences can be classified into 21 function categories. And we finally got the reactive oxygen species scavenging genes: *DHAR*, *GST*, *TRX*, *CAT*, transcription factor *SMT3*, and serine/threonine protein kinase gene. The results indicate that there are general characters between the salt tolerance genes of *Eustoma grandiflorum* and model plants, and the most of the sequences can not be explained by the known genes.

**Key words:** *Eustoma grandiflorum*; suppression subtractive hybridization; differently expressed gene; salt stress

草原龙胆 (*Eustoma grandiflorum*) 又名洋桔梗, 原产北美, 为多年生草本, 具有一定的抗盐碱能力 (大川清, 1995), 作为重要的观赏植物, 已成为国际流行的鲜切花之一。目前对草原龙胆的研究主要集中在新花色、新花型、长瓶插寿命并可周年生长的优良品种选育上, 有关其抗盐胁迫的分子机制还未见报道。

耐盐性是目前抗性研究中的一个重要方面, 但多集中在耐盐植物和模式植物上 (Qiu et al., 2004; 曾幼玲 等, 2007)。植物通过膜以及细胞内的感受器感应离子以及脱水胁迫, 并且通过次级信

收稿日期: 2008-04-21; 修回日期: 2008-06-11

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2006AA10Z129)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: lyhshen@126.com)

号因子（如  $\text{Ca}^{2+}$ ，ROS）调控转录因子的表达，精调  $\text{Na}^+$  通道及  $\text{Na}^+$  的区隔化，从而调整  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  的平衡；合成 LEA 蛋白和渗透调节物质以维持细胞的渗透平衡；同时，启动 ROS 清除系统以控制细胞内的氧化胁迫。Takahashi 等从耐盐的芦苇中克隆了高亲和  $\text{K}^+$  转运子（*PhaHKT1*），并将其转入参与  $\text{Na}^+$  外排的钾转运子缺失及 P 类 ATP 酶缺失的酵母中，其转化子可以在  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl 条件下生长（Takahashi et al., 2007）。Xiang 等（2007）将水稻钙调 B 类蛋白互作激酶 OsCIPK15 转入水稻中过量表达，提高了水稻的耐盐性。Karaba 等（2007）从拟南芥中克隆了 AP2/ERF 类转录因子的 *HRD* 基因，其过量表达可以使拟南芥耐受  $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl 胁迫，并完成其生长发育周期。

耐盐性是一个多基因控制的性状。虽然目前许多研究者通过提高单个基因的表达水平可以提高植物的抗盐能力，但这并不能展示盐抗性涉及的基因的复杂性。本试验中用抑制差减杂交（suppression subtractive hybridization, SSH）技术（许志茹和李玉花，2006；谢吉容 等，2007），研究了在 NaCl 胁迫条件下和正常栽培条件下的草原龙胆耐盐相关差异基因，为寻找草原龙胆抗性基因以及揭示盐抗性机理提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试材及其 RNA 的提取

采用的植物材料为东北林业大学花卉生物工程研究所从日本引进的黄色重瓣草原龙胆栽培品系 50 号，2006 年至 2008 年于东北林业大学花卉生物工程研究所资源圃的日光温室内种植，常规栽培管理 20 周龄。以  $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl 处理 1、3 和 6 h 的叶片为处理，清水处理的叶片为对照。

利用 TRIzol Reagent 试剂盒（购自 Invitrogen Life Technologies 公司）提取总 RNA，利用分光光度计测定其浓度，1、3 和 6 h 盐处理的总 RNA 以 1:1:1 的比例混合。混合的总 RNA 经过 mRNA 纯化（纯化试剂盒购自 Amersham Biosciences 公司），获得 poly (A)<sup>+</sup> mRNA。

### 1.2 文库构建与分析

利用 Clontech PCR-Select<sup>TM</sup> cDNA Subtraction Kit（购自 BD Biosciences Clontech 公司）构建草原龙胆盐胁迫与对照的 cDNA 抑制差减文库，以盐处理为 tester 方，以对照为 driver 方。具体操作方法见操作手册。

将获得的文库 PCR 产物利用 PCR 产物纯化试剂盒 DNA Fragment Purification kit MagExtractor<sup>®</sup> - PCR and Gel Clean up（购自 TOYOBO 公司）对 PCR 产物进行纯化。将获得的纯化产物连接 pGEM-T<sup>+</sup> Vector 载体（购自 Promega 公司），转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞，通过蓝白斑筛选、随机挑选阳性克隆，提取质粒。以文库试剂盒提供的嵌套引物 Nested primer 1 和 Nested primer 2R 进行 PCR 扩增，鉴定文库插入片段，并进行测序。

将获得的序列提交 GO 核酸序列数据库（<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>）进行序列分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 以及 mRNA 的质量

将提取的总 RNA 利用 0.8% 甲醛变性琼脂糖凝胶进行电泳（图 1），可看出 28 S 和 18 S 两条亮带，亮度比约为 2:1，边缘清晰，没有弥散现象，表明提取的 RNA 未发生降解，从而保证了 RNA 具有较好的完整性。将 1、3 和 6 h 的 NaCl 盐处理的总 RNA 以 1:1:1 的比例混合做为 tester 方，清水处理做为 driver 方，纯化出 mRNA（图 2）。tester 和 driver 的总 RNA 经紫外分光光度计测定，两者的  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  分别为 1.92 和 1.89。

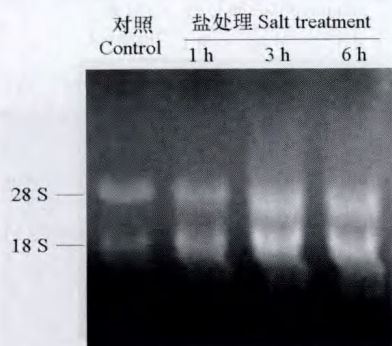


图 1 对照和不同盐处理时间的总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of the control and the salt treated total RNA

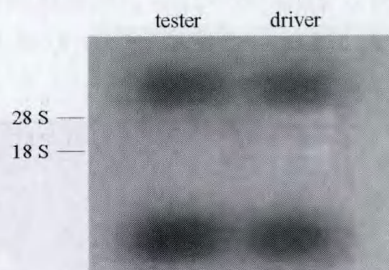


图 2 tester 和 driver 纯化后的 mRNA 电泳图

tester: 混合了 1、3、6 h 的 NaCl 处理的 mRNA;  
driver: 以清水处理的 mRNA。

Fig. 2 Electrophoresis of purified tester and driver mRNA

tester: Purified mRNA treated with NaCl for 1, 3 and 6 hours;  
driver: mRNA treated with pure water.

## 2.2 消减杂交结果以及插入片段鉴定

将纯化后的 tester 和 driver 的 mRNA, 经过反转录, 合成了双链 cDNA, 长度为 0.5 ~ 10 kb, 不适用于分子杂交。用 *Rsa* I 酶切为较短的片段, 可防止长链片段形成复杂结构对消减杂交造成干扰, 既减少了表达谱 cDNA 的复杂性, 又提高了每个基因的代表性, 有利于差别表达基因的检出。

未经过消化的 tester cDNA 和 driver cDNA, 大多呈弥散状分布在 100 ~ 2 000 bp 之间, 经过 *Rsa* I 酶切后, 产生 cDNA 片段多在 500 bp 以下 (图 3)。

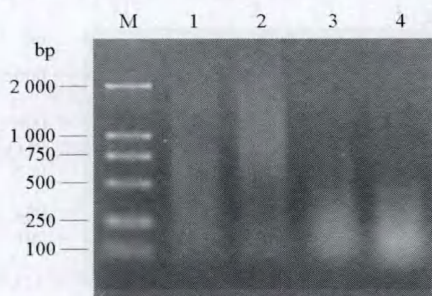


图 3 cDNA 经 *Rsa* I 消化前后对比

M: 分子量标准; 1: 消化前试验方; 2: 消化前消减方;  
3: 消化后试验方; 4: 消化后消减方。

Fig. 3 Comparison of cDNA before and after *Rsa* I digested

M: Marker; 1: Tester cDNA before *Rsa* I digested;  
2: Driver cDNA before *Rsa* I digested;  
3: Tester cDNA after *Rsa* I digested;  
4: Driver cDNA after *Rsa* I digested.



图 4 文库 PCR 产物电泳图

M: 分子量标准; 1: 文库第 2 次 PCR 产物。

Fig. 4 Electrophoresis of the library PCR product

M: Marker; 1: The PCR product of the library.

将经 *Rsa* I 酶切产生的带有粘性末端 cDNA 片段, 分别与 adaptor 1 和 adaptor 2R 接头连接, 将过量的 driver cDNA 分别加入到连有接头的两份 tester cDNA 中, 在第 1 步差减杂交反应中, 实现有丰度差别的 tester cDNA 达到均一化, 使得检测群体中差异表达的基因得到第 1 次富集。

用新的变性单链 driver cDNA 同时与两份杂交产物混合退火进行第 2 轮消减杂交, 进一步富集了差异表达的 cDNA, 完成了文库的构建。

将文库 PCR 产物 (图 4) 纯化, 连接到 pGEM-T 载体上, 转化感受态大肠杆菌 JM109, 通过氨苄抗性和蓝白斑筛选, 随机挑取了 2 013 个阳性克隆。利用 PCR 检测出 1 153 个含有插入片段的克隆



(图5), 测序, 利用 VecScreen 去除载体序列, SeqClust2.1 去除冗余序列, 获得 658 条单一序列, 平均序列长度为 375 bp, 文库的冗余度为 42.9%。

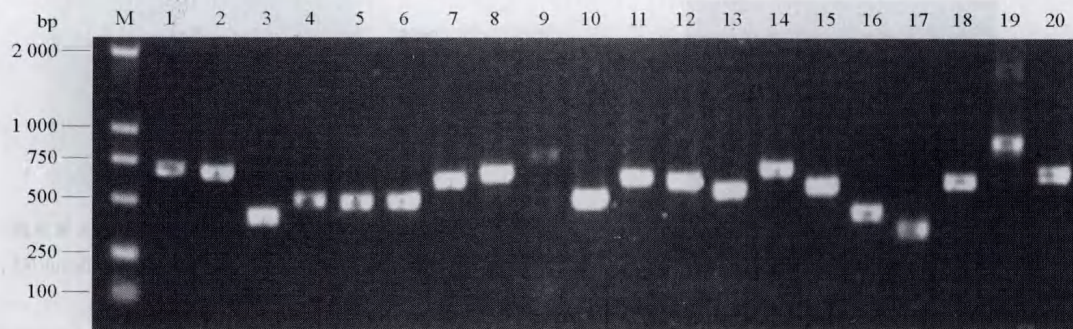


图5 PCR 检测 cDNA 抑制差减文库克隆插入片段

M: 分子量标准; 1~20: 消减文库的 PCR 产物。

Fig. 5 Identification of the inserted cDNA fragments in the subtractive cDNA library by PCR

M: Marker; 1-20: PCR product of the SSH library.

### 2.3 序列注释

对所有获得的基因进行了 Gene Ontology 分析, 除去分子功能未知的 61 条序列以及无同源性的 535 条序列, 其余按照获得序列的分子功能分类, 共获得了 21 类 (表 1)。其中 DNA 结合蛋白基因

表 1 部分胁迫相关基因

Table 1 Part of the stress relative genes

编号 NO.	功能注释 Function annotation	来源 Organism	P 值 P value	变化 Change	文献 Reference
B055B	推测的环氧化物水解酶 Putative epoxide hydrolase (EH)	水稻 <i>Oryza sativa</i>	$3.2E-14$	上调	Bray, 2002
D0437B	过氧化氢同功酶 A Catalase isozyme A (CAT)	水稻 <i>Oryza sativa</i>	$1.5E-03$	上调	Yu et al., 2007
A047B	细胞色素 P450 单加氧酶 Cytochrome P450 monooxygenase (P450)	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	$1.9E-18$	上调	Walia et al., 2005
F035B	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Serine/threonine protein kinase	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	$9.3E-09$	-	-
F0236A	泛醌连接酶 Ubiquitin-conjugating enzyme (SUMO)	水稻 <i>Oryza sativa</i>	$9.5E-08$	-	-
G312B	脱氢抗坏血酸还原酶 Dehydroascorbate reductase (DHAR)	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	$2.0E-39$	上调	Conklin, 1996
F0201A	丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serine protease inhibitor	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	$4.6E-08$	上调	Ma et al., 2006
H064A	硝酸根转运子 Nitrate transporter	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	$9.8E-08$	上调	Kreps et al., 2002
A0613B	类泛醌蛋白 SMT3, 焦磷酸酶活性 Ubiquitin-like protein SMT3, pyrophosphatase activity (SMT3)	水稻 <i>Oryza sativa</i>	$2.1E-06$	上调	Thibaud-Nissen et al., 2003
F0217A	叶绿体硫氧还蛋白 Chloroplast thioredoxin (TRX)	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	$9.4E-04$	上调	Dietz et al., 2006
G0620B	类似推测的羟基邻氨基苯甲酸羟基肉硅酸转移酶 Similar to putative hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyl transferase	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	$6.9E-02$	-	-
B059A	谷胱甘肽 S 转移酶 Glutathione S-transferase (GST)	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	$1.5E-10$	上调	Taji et al., 2004

24.20%, 核糖体结构组成基因 1.61%, 催化活性基因 1.61%, 过氧化氢酶活性基因 1.61%, 环氧化物酶活性基因 4.84%, 单氧化酶活性基因 1.61%, 激酶活性基因 3.23%, 泛素蛋白连接酶活性基因 1.61%, 丝氨酸肽链内切酶抑制活性基因 1.61%, 转运活性基因 3.23%, 氨基酸聚胺转运活性基因 1.61%, 结合活性基因 9.68%, 铜离子结合活性基因 3.23%, 蛋白结合基因 3.23%, 电子载体活性基因 6.45%, 焦磷酸酶活性基因 6.45%, 转移酶活性基因 1.61%, 氧结合活性基因 9.68%, 硫醇—二硫键交换活性基因 6.45%, 谷胱甘肽脱氢酶活性基因 4.84%, 低浓度脂蛋白受体结合活性基因 1.61%。

此文库中获得了与细胞解毒有关的基因 (表 1), 如推测的环氧化物水解酶 (Epoxide hydrolase, EH) 基因 (Kiyosue et al., 1994)、硫氧还蛋白 (Thioredoxin, TRX) 基因 (Meyer et al., 2005)、脱氢抗坏血酸还原酶 (dehydroascorbate reductase, DHAR) 基因 (Conklin, 1996)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 基因 (Willekens et al., 1997)、谷胱甘肽 S 转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 基因, 转录因子 SMT3 (Kurepa et al., 2003), 细胞色素 P450 基因 (Narusaka et al., 2004), 泛醌连接酶 (SU-MO) 基因 (Kurepa et al., 2003), 泛肽交联酶基因 (Feussner et al., 1997) 等。

### 3 讨论

从获得的基因序列与已知基因的相关性上看, 90.6% (596/658) 序列无功能注释或无同源性序列, 说明获得的草原龙胆盐胁迫抑制差减文库序列与模式植物已知的基因库相似程度不高。但在获得的 62 条序列中, 又包含了过氧化氢酶活性基因、环氧化物酶活性基因、泛素蛋白连接酶活性基因、谷胱甘肽脱氢酶活性基因等, 涉及到了在模式植物中同样存在的活性氧清除、逆境胁迫保护等盐胁迫响应基因, 说明草原龙胆在盐胁迫条件下的基因表达和模式植物之间还有一定的共性。

从获得的基因功能分类上看, DNA 结合蛋白基因占了注释序列的 24%, 说明获得了一定数量的调控功能序列, 但是大部分序列的具体功能未知, 因而是否草原龙胆的调控机制不同于模式植物还有待于进一步通过试验验证。本试验只进行了盐处理叶片对清水处理的叶片的差减杂交, 目的是获得盐胁迫下的大量表达基因。而没有进行反向杂交, 即清水处理的叶片对盐处理的叶片的杂交, 从而获得在盐处理条件下减少表达的基因, 可能导致了表 1 中获得的基因大多为上调表达类型。

从此文库中并未发现类似 *SOS1* (Shi et al., 2000) 和 *DREB* (Maruyama et al., 2004) 等在拟南芥、水稻中普遍存在的盐胁迫离子转运和调控基因。鉴于草原龙胆具有一定的耐盐性, 是否  $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl 盐处理对于草原龙胆离子泵的调控作用不明显, 是否存在 *DREB* 调控因子或者对其表达影响不显著, 同样需要进一步的试验进行验证。但获得的 24% DNA 结合蛋白基因中应该存在类似 *DREB* 的调控基因。下一步的工作可以通过克隆此类基因全长, 序列比对, 转基因研究等步骤获得更多的关于草原龙胆的调控基因的信息。

### References

- Bray A E. 2002. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: An analysis using microarray and differential expression data. *Annals of Botany*, 89 (7): 803–811.
- Conklin P L. 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc Natl Acad Sci*, 93: 9970–9974.
- Dietz K J, Jacob S, Oelze M L, Laxa M, Tognetti V, Miranda de S M N, Baier M, Finkemeier I. 2006. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 57 (8): 1697–1709.
- Feussner K, Feussner I, Leopold I, Wasternack C. 1997. Isolation of a cDNA coding for an ubiquitin-conjugating enzyme UBC1 of tomato – the first stress-induced UBC of higher plants. *FEBS Lett*, 409 (2): 211–215.
- Karaba A, Dixit S, Greco R, Aharoni A, Trijatmiko K R, Marsch-Martinez N, Krishnan A, Nataraja K N, Udayakumar M, Pereira A. 2007. Improvement of water use efficiency in rice by expression of *HARDY*, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. *PNAS*, 104: 15270–15275.

- Kiyosue T, Beetham J K, Pinot F, Hammock B D, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1994. Characterization of an *Arabidopsis* cDNA for a soluble epoxide hydrolase gene that is inducible by auxin and water stress. *Plant J*, 6 (2): 259 – 269.
- Kreps J A, Wu Y J, Chang H S, Zhu T, Wang X, Harper J F. 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology*, 130: 2129 – 2141.
- Kurepa J, Joseph M W, Smalle J, Gosink M M, Davis S J, Durham T L, Sung D Y, Vierstra D R. 2002. The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *Biol Chem*, 278 (9): 6862 – 6872.
- Ma S, Gong Q, Hanst J B. 2006. Dissecting salt stress pathways. *Journal of Experimental Botany*, 57 (5): 1097 – 1107.
- Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal*, 38 (6): 982 – 993.
- Meyer Y, Reicheld J P, Vignols F. 2005. Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. *Photosynth Res*, 86 (3): 419 – 433.
- Narusaka Y, Narusaka M, Seki M, Umezawa T, Ishida J, Nakajima M, Enju A, Shinozaki K. 2004. Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: Analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Mol Biol*, 55 (3): 327 – 342.
- Ougawakio. 1995. Breeding and planting in *Eustoma*. Tokyo: Seibuntokoku. (in Japanese)
- 大川 清. 1995. 花専科育種と栽培, *Eustoma*. 東京: 誠文堂新光社.
- Qiu Q S, Guo Y, Francisco J Q, Pardo J M, Schumaker K S, Zhu J K. 2004. Regulation of vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *Biol Chem*, 279 (1): 207 – 215.
- Shi H Z, Ishitani M, Kim C, Zhu J K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter. *Proc Natl Acad Sci*, 97 (12): 6896 – 6901.
- Taji T, Seki M, Satou M, Sakurai T, Kobayashi M, Ishiyama K, Narusaka Y, Narusaka M, Zhu J K, Shinozaki K. 2004. Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiology*, 135 (3): 1697 – 1709.
- Takahashi R, Liu S, Takano T. 2007. Cloning and functional comparison of a high-affinity  $\text{K}^+$  transporter gene *PhaHKT1* of salt-tolerant and salt-sensitive reed plants. *Journal of Experimental Botany*, 58 (15 – 16): 4387 – 4395.
- Thibaud-Nissen F, Shealy T R, Khanna A, Vodkin O L. 2003. Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiology*, 132: 118 – 136.
- Walia H, Wilson C, Condamine P, Liu X, Ismail M A, Zeng L H, Wanamaker I S, Mandal J, Xu J, Cui X P, Close J T. 2005. Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiology*, 139: 822 – 835.
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, van Montagu M, Inzé O, van Camp W. 1997. Catalase is a sink for and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J*, 16: 4806 – 4816.
- Xiang Y, Huang Y, Xiong L. 2007. Characterization of stress-responsive *CIPK* genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiology*, 144: 1416 – 1428.
- Xie Ji-rong, Liang Guo-lu, Tang Kai-xue, Zhang Hao, Cheng Zai-quan, Huang Xing-qi. 2007. Construction and analyses of SSH cDNA libraries of rose floral color and scent mutant. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (3): 688 – 694. (in Chinese)
- 谢吉容, 梁国鲁, 唐开学, 张 灏, 程在全, 黄兴奇. 2007. 月季突变体抑制差减杂交 cDNA 文库构建及分析. *园艺学报*, 34 (3): 688 – 694.
- Xing Y, Jia W S, Zhang J H. 2007. AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 58 (11): 2969 – 2981.
- Xu Zhi-ru, Li Yu-hua. 2006. Construction and analysis of 'Tsuda' turnip subtracted cDNA library. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (4): 866 – 868. (in Chinese)
- 许志茹, 李玉花. 2006. '津田' 芜菁消减 cDNA 文库的构建及分析. *园艺学报*, 33 (4): 866 – 868.
- Zeng You-ling, Xing Ting, Cai Zhong-zhen, Zhang Fu-chun. 2007. Molecular cloning and expression analysis of betaine aldehyde dehydrogenase gene from the halophyte *Kalidium foliatum* (Chenopodiaceae) in Xinjiang on salinity. *Acta Botanica Yunnanica*, 29 (1): 79 – 84. (in Chinese)
- 曾幼玲, 幸 婷, 蔡忠贞, 张富春. 2007. 盐生植物盐爪爪甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆及在盐胁迫下的 *BADH* 基因的表达. *云南植物研究*, 29 (1): 79 – 84.