

香蕉根系均一化全长 cDNA 文库的构建和鉴定

王 卓^{1,4}, 殷晓敏¹, 王家保³, 徐碧玉², 金志强^{1,2,*}

(¹中国热带农业科学院海口实验站, 海口 570102; ²中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带生物技术重点开放实验室, 海口 571101; ³中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南儋州 571737; ⁴海南大学, 海口 570228)

摘 要: 以香蕉幼苗根系为材料, 利用 DSN(duplex-specific nuclease)均一化技术与 SMART(switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 技术相结合, 构建香蕉根系均一化全长 cDNA 文库。经检测, 初级文库滴度 1.1×10^6 cfu · mL⁻¹, 库容 5×10^6 个独立克隆, 重组率大于 95%, 插入片段平均长度大于 1 kb, 表明文库质量较好。随机挑取 192 个克隆进行 EST (expressed sequence tags) 测序, 成功获得 179 个高质量 EST, 含 5 个 contig 和 174 个 singlet, 冗余度仅为 2.35%。小规模测序拼接后获得 145 个 unigenes, 对 unigenes 分析结果表明文库的可靠性好。从序列比对结果中挑选 3 个与其它植物同源的抗逆基因, 利用 RT-PCR 方法进行了干旱、低温及盐胁迫条件下基因表达分析, 结果显示这 3 个基因在不同的逆境下差异表达。

关键词: 香蕉; 根系; 均一化; cDNA 文库; 基因; 表达

中图分类号: S 668.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 09-1667-08

Construction and Characterization of Normalized Full-length cDNA Library of Banana Roots

WANG Zhuo^{1,4}, YIN Xiao-min¹, WANG Jia-bao³, XU Bi-yu², and JIN Zhi-qiang^{1,2,*}

(¹Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 570102, China; ²Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; ³Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China; ⁴Department of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: A normalized full-length cDNA library was constructed with the banana roots, by DSN (duplex-specific nuclease) normalization method combined with SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) technique. The titer of unamplified cDNA library was about 1.1×10^6 cfu · mL⁻¹, the capacity was 5×10^6 clones, and the recombination ratio was more than 95%. The average insertion size was above 1 kb which suggested that the quality of the cDNA was better. Random selected 192 clones were sequenced and 179 high quality EST were obtained, which included 5 contigs and 174 singlets. The redundancy was 2.35%. With small scale sequencing, 145 unigenes were obtained. The analysis result indicated the library was efficient and reliable. Selecting 3 genes which is homological with other plants' anti-abiotic stress genes from above sequences, they are expressed under drought, low temperature and salt

收稿日期: 2011-04-13; 修回日期: 2011-09-02

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2009hys1J026); 国家现代农业产业体系项目 (CARS-32)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhiqiangjin2001@yahoo.com.cn; Tel: 0898-66960172)

stress using RT-PCR method. The result suggested that the 3 genes had different expression under different stresses.

Key words: banana; roots; normalized; cDNA library; gene; expression

cDNA 文库以其在发现新基因和研究基因功能方面的优势, 已成为研究生物体功能基因的重要手段之一 (Carninci et al., 2000; Wiemann et al., 2003), 特别是均一化 cDNA 文库具有提高随机测序的有效性和获得低丰度表达基因方面的优势, 越来越受到人们的重视 (Zhang et al., 2010)。目前常用的两种针对全长 cDNA 的均一化技术是 Carninci 方法 (Carninci et al., 2000) 和 duplex-specific nuclease (DSN) 方法 (Zhulidov et al., 2004), 其中 DSN 方法已广泛应用在拟南芥 (Asamizu et al., 2000)、大麦 (Ali et al., 2000)、棉花 (Arpat et al., 2004)、水稻 (Zhang et al., 2005)、木薯 (Lokko et al., 2007) 和大豆 (李晨 等, 2010) 等植物的均一化 cDNA 文库构建中, 为这些植物功能基因的研究奠定了良好基础。

香蕉是一种重要的热带亚热带水果, 但其生产中常常受到病虫、台风、低温、干旱等胁迫的影响, 特别是近年来土传病害香蕉枯萎病已给香蕉生产带来毁灭性的灾难 (Ploetz & Pegg, 2000)。因此挖掘香蕉生长发育和抗胁迫相关基因, 研究香蕉生长发育和抗逆、抗病机理显得十分迫切。目前在香蕉基因组测序还没有完成的情况下, 大规模获得与生长发育和抗胁迫相关的基因存在一定困难, 而构建香蕉根系 cDNA 文库将是解决这一难题的有效途径。本研究中利用 DSN 方法构建香蕉根系均一化全长 cDNA 文库, 通过测序及信息学分析快速获得参与生长发育和抗性相关基因, 为进一步研究香蕉根系生长发育及其抗胁迫相关机理, 利用基因调控手段提高香蕉抗性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

香蕉幼苗为‘巴西蕉’ (*Musa acuminata* L. AAA group, ‘Brazilian’), 2010 年 9 月 5 日取自中国热带农业科学院组培中心。cDNA 文库构建的材料为健康且正常生长, 苗龄为移栽大棚后约 60 d 的组培杯苗, 五叶一心, 去土取根后将整株根系放入液氮中速冻, 于 -70°C 保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 5 g 左右的根系, 液氮研磨成粉, 采用 CTAB 法提取总 RNA (Asif et al., 2000)。通过紫外分析仪检测所提 RNA 的浓度、纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。采用 Oligotex mRNA Mini Kit (QIAGEN Cat. No. 70022) 纯化香蕉根系总 RNA, 具体操作参照试剂盒说明书。使用 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech Cat. No. 634903) 合成 cDNA 一链、二链, 操作参照说明书。

1.2.2 全长 cDNA 的均一化

使用 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Cat. No. 28104) 将扩增得到的双链 cDNA 纯化, 将 cDNA 溶于 15 μL 无菌水中, 取 1 μL 测定浓度, 用无菌水调节浓度至 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 左右。参照 Trimmer-Director Kit (Evrogen Cat. No. NK002) 的方法, 利用 DSN 处理 cDNA, 取稀释的 cDNA 进行不同循环数的 PCR 扩增, 分别取样电泳确定最佳循环数, 再进行第 2 次 PCR 扩增, 条件为 95°C 15 s, 66°C 20 s, 72°C 3 min, 12 个循环, 接着 64°C 15 s, 72°C 3 min, 电泳检测均一化效果, 并将产物回收。

1.2.3 均一化全长 cDNA 文库构建

取均一化 cDNA, 经 *Sfi* 酶切后, 电泳检测, 将酶切产物的 1~3 kb 区域切下, 并将产物回收后与 pDNR-LIB 载体连接, 将连接产物加到 0.25 μ m Millipore 纯化膜上脱盐纯化 1 h, 电击转化到大肠杆菌 DH10B 中, 菌液涂于氯霉素平板上。

1.2.4 菌落鉴定

取 2 μ L 菌液涂于氯霉素平板上, 计算平板上的克隆数, 得出库容为克隆数 \times 稀释倍数 \times 连接产物体积/转化用连接物体积。随机挑取克隆进行菌落 PCR 鉴定, 电泳检测插入片段大小及小片段比率。

1.2.5 EST 测序及分析

随机挑取 192 个 cDNA 克隆, 使用 96 孔板进行碱裂解法提取质粒 DNA, 使用 M13⁺测序引物进行单次库检测, 测序委托北京华大基因技术公司完成。在成功库检测的基础上, 进一步验证均一化全长文库在 cDNA 长度方面的有效性, 继续测通所有克隆, 并用 Phrap 软件进行聚类拼接, 获得 unigenes 序列。测出的 DNA 序列在经过切除载体和接头序列后在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 核酸数据库 BLASTn 和蛋白质数据库 BLASTx 中进行同源核苷酸和蛋白序列检索。

1.2.6 香蕉幼苗逆境处理及抗逆相关基因表达分析

干旱处理: 以 PEG6000 处理模拟干旱胁迫, 胁迫程度参考 Hsiao (1973) 的划分, 即分别以 0 (对照)、5% (轻度胁迫)、10% (中度胁迫) 和 20% (重度胁迫) PEG6000 处理 24 h, 然后取样。低温处理: 分别把香蕉幼苗置于 5、10、15 $^{\circ}$ C 的低温环境中 2 h, 然后取样, 以 25 $^{\circ}$ C 条件下生长的香蕉幼苗为对照。盐处理: 用 1 mol \cdot L⁻¹ 的 NaCl 溶液处理香蕉幼苗, 然后在胁迫 0、2、4、6 h 时取样, 以正常生长的香蕉幼苗为对照。以上样品均去土取根后将整株根系立即放入液氮中速冻, 于 -70 $^{\circ}$ C 保存备用, 每个处理取样 10 株。

从序列比对结果中挑选与其它植物有较高同源性的抗逆相关基因, 包括香蕉乙醇脱氢酶基因 (*MaADH*) (Zhao et al., 2008)、香蕉 BTB/POZ 结构域基因 (*MaBTB*) (Zhao et al., 2009) 和香蕉乙二醛酶基因 (*MaGLO*) (Suchandra et al., 2008)。利用在干旱、盐和低温条件下获取的香蕉幼苗根系提取总 RNA, 经反转录后的 cDNA 第一链为模板, 香蕉看家基因 *MaActin* (基因登录号 EF672732) 为内参进行半定量 RT-PCR 来检测上述 3 个基因在不同逆境下的表达。目的基因的引物分别为: *MaADH* 5': 5'-CATCAGTTATCGTAGGCGTGG-3'; *MaADH* 3': 5'-GCATACGAGGAAACGAGGGGTC-3'; *MaBTB* 5': 5'-AGAGGAGTGATATTGTTGTTGC-3'; *MaBTB* 3': 5'-ATCTTAGTGATCTCATAGCCG A-3'; *MaGLO* 5': 5'-CGAGGCTCAATCAAAGA-3'; *MaGLO* 3': 5'-ACCAGCAAGGTCCAAAC-3'。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 28 个循环, *MaActin* 的引物为: *MaActin* 5': 5'-CAGTGGTCGTACAACTGGTAT-3' 和 *MaActin* 3': 5'-ATCCTCCAATCCAGACACTG T-3'。应用程序和体系与扩增目的基因的程序和体系相同。

2 结果与分析

2.1 提取的总 RNA 和合成全长 cDNA

以香蕉幼苗根系为材料所提取的总 RNA, 经 1% 琼脂糖电泳检测, 含有明显的 28S 和 18S 条带 (图 1, A), 说明总 RNA 提取完整性好, 无明显的蛋白及多糖污染。经紫外分析仪检测总 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值为 1.94, 含量为 588 ng \cdot μ L⁻¹, 表明所提取的 RNA 纯度高, 符合建库要求。

从图 1, B 可以看出, 样品的 cDNA 大小都分布在 500 ~ 5 000 bp, 在 2 kb 左右有高丰度基因带, 说明 cDNA 大小完整, 质量好, 可以用来建库。

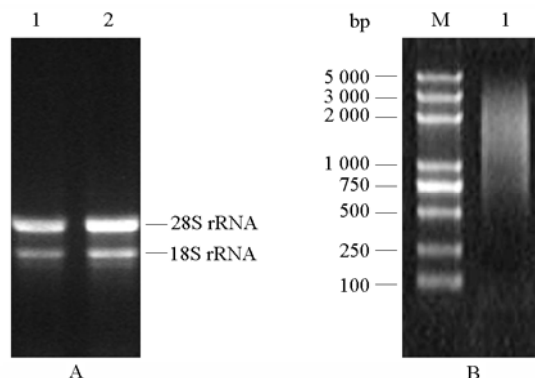


图 1 香蕉根系总 RNA 琼脂糖电泳检测 (A) 和 cDNA 二连合成产物凝胶电泳图 (B)

A. 泳道 1 和 2 为同一样品; B. M: 100 bp DNA ladder.

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RNA isolated from banana roots (A) and gel electrophoresis of cDNA second-strand synthesis product (B)

A. Lanes 1 and 2 are the same sample; B. M: 100 bp DNA ladder.

2.2 均一化效果

经过 1 倍和 1/2 倍 DSN 处理和不同循环数 PCR 扩增后, 发现经 1 倍 DSN 处理和 11 个循环扩增后其中间较亮的条带消失, 呈现一条均匀的弥散条带, 表明高丰度的基因丰度明显下降 (图 2, A), 反映均一化效果良好。均一化之后 cDNA 片段大小范围没有变化, 500 ~ 5 000 bp 范围内呈均匀分布, 但是平均长度较均一化前变小。为了调整 cDNA 片段平均长度, 进行第 2 次 PCR 扩增。第 2 次 PCR 扩增后片段平均长度和浓度较第一次提高, 片段大小范围: 500 ~ 4 500 bp, 满足建全长 cDNA 文库的需要 (图 2, B)。

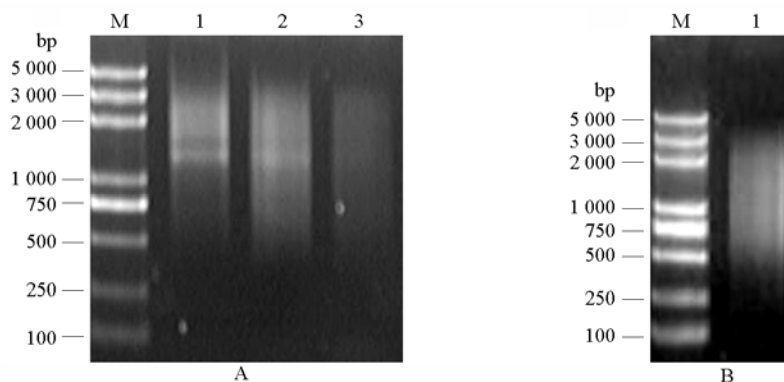


图 2 第 1 次 PCR 扩增 (A) 和第 2 次 PCR 扩增 (B)

A. 1 ~ 3 分别为 0、1、1/2 倍浓度的 DSN 酶。

Fig. 2 First PCR amplification (A) and second PCR amplification (B)

A. 1 - 3: 0, 1 ×, 1/2 × concentration of DSN.

2.3 文库库容及插入片段大小的分析

取 1 μ L 菌液涂平板 (直径 15 cm), 计算平板上的库容数, 约为 1 100 个, 通过计算可以得出菌液滴度是为 1.1×10^6 cfu \cdot mL⁻¹, 重组率大于 95%, 插入片段平均大于 1 kb 且分布在 1 ~ 2 kb 之间 (图 3)。

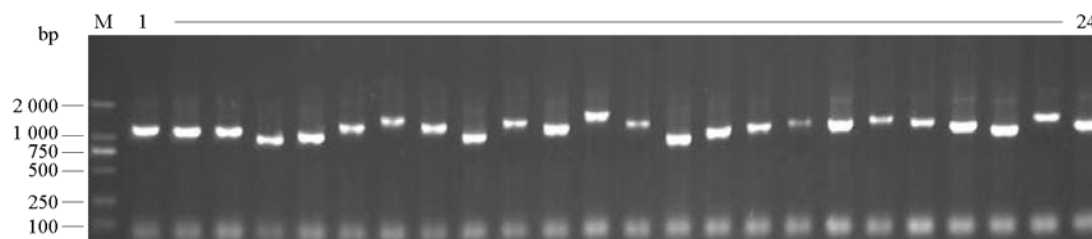


图3 cDNA 文库插入片段大小检测

1 ~ 24: 插入片段 PCR 扩增产物; M: DL 2000。

Fig. 3 Size of inserts of full-length cDNA library

1 - 24: The PCR production of cDNA clones randomly picked from library; M: DL 2000.

2.4 EST 分析

首先对随机挑取的 192 个 cDNA 克隆进行测序, 获得 179 个高质量 EST 序列, 其中有 5 个重叠群 (conting), 174 个独立克隆 (singlet)。对这些序列经过 BLASTx (以 E 值 $\leq 1E-10$) 分析, 有 121 个 EST 与非冗余的蛋白质库中报道的功能已知或未知蛋白具有相似性序列, 占 76.41%。为了进一步验证文库的 cDNA 在长度方面的有效性和可靠性, 对成功测序的克隆进行完整测序, 用 Phrap 软件对数据进行 unigene 拼接, 获得 145 个 unigenes, 其中最长的 unigenes 可达 2 095 bp, 平均长度大于 1 200 bp。通过 BLASTx 和 BLASTn 搜索, 将得到的 145 个 unigenes 划分为 4 大类: 已知功能的基因共 70 个 (48.3%), 推测功能的基因共 37 个 (25.5%), 相似性较低的未鉴定基因共 18 个 (12.4%), 另有 20 条 (13.8%) 未获得同源匹配 (表 1)。

表 1 香蕉根系的 unigenes NCBI 数据库查询结果

Table 1 The Blast results of banana roots unigenes in NCBI database

基因的类型 Gene catalogs	unigenes 数 Number of unigenes	比例/% Percent
已知功能的基因 Known functional	70	48.3
推测功能的基因 Hypothetical functional genes	37	25.5
未鉴定基因 Unidentified genes	18	12.4
新基因 Novel genes	20	13.8
合计 Total	145	100

已知功能的 70 个 unigenes 中, 获得 ASR (1 个)、ARF (1 个)、WRKY (1 个)、MADS-BOX (2 个)、bZIP (3) 及 bHLH 家族 (1 个) 等转录因子的全长基因序列, 包括完整读码框 (open reading frame, ORF) (表 2), 证明了构建的 cDNA 文库质量较高, 可从文库有效分离全长基因, 达到预期结果。

表 2 cDNA 文库克隆的序列分析

Table 2 Sequence analysis of cDNA library clones

克隆号 Clone	长度/ pb Length	ORF 长度/ pb ORF length	登录号 Accession number	同源性/% Identity	E 值 E-value	同源序列 DNA homology
G1-4	800	366	ABY84854.1	90	2.00E-09	ASR2 <i>Solanum lycopersicum</i>
A2-5	899	540	EEE66819.1	96	1.00E-96	ARF1 <i>Arabidopsis thaliana</i>
F1-10	1318	558	ADG57935.1	41	6.00E-30	WRKY 40 <i>Arabidopsis thaliana</i>
G2-5	837	525	XP_002303852.1	64	9.00E-57	MADS-box 27 <i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>
D3-2	1876	1023	XP_002307325.1	60	1.00E-72	Agamous-like MADS-box protein <i>Arabidopsis thaliana</i>
C3-7	1278	432	XP_002266061.1	52	2.00E-55	bZIP Transcription factor34 <i>Arabidopsis thaliana</i>
E2-9	1681	642	AAT85257.1	44	1.00E-93	bZIP Transcription factor 28 <i>Arabidopsis thaliana</i>
B2-3	1250	378	ADK74339.1	80	1.00E-133	TGA-1B <i>Nicotiana tabacum</i>
D2-12	1257	534	NP_001045680.1	54	2.00E-61	bHLH Transcription factor ILR3 <i>Arabidopsis thaliana</i>

2.5 抗逆相关基因表达分析

香蕉幼苗在遭受干旱胁迫时, *MaBTB* 基因表达量逐渐上升, 重度干旱时达到最大; *MaADH* 基因表达量在轻度干旱时最高, 中度干旱次之, 重度干旱时表达量与正常生长条件下持平; *MaGLO* 基因在干旱时表达量变化不大 (图 4)。盐胁迫处理, *MaBTB* 基因表达量均有所提高; *MaADH* 基因的表达量逐渐上升, 4 d 达到最大值; *MaGLO* 基因则在 4 d 和 6 d 时响应盐胁迫 (图 5)。低温胁迫下 *MaBTB* 基因表达量在 15 °C 时表达量明显降低; 随温度的下降, 在 10 °C 时表达量略有回升, 在 5 °C 时表达量回复到正常水平; *MaADH* 基因低温中表达量低且变化不大 (图 6)。

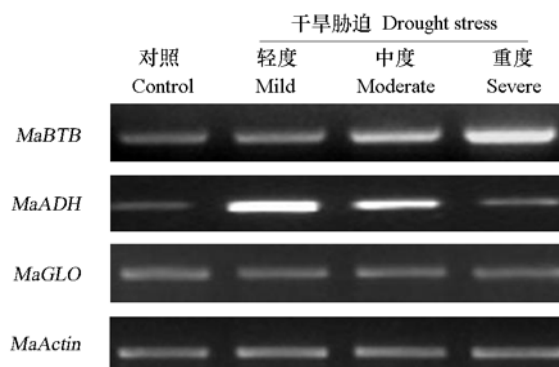


图 4 RT-PCR 分析在不同程度干旱条件下 *MaBTB*、*MaADH* 和 *MaGLO* 基因的表达

Fig. 4 RT-PCR analysis the expression of *MaBTB*, *MaADH* and *MaGLO* genes under the different degrees of drought stress

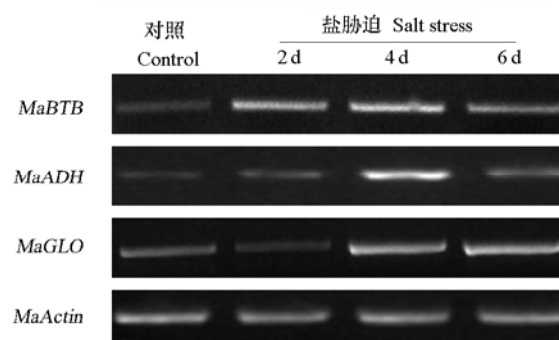


图 5 RT-PCR 分析在盐胁迫下 *MaBTB*、*MaADH* 和 *MaGLO* 基因的表达

Fig. 5 RT-PCR analysis the expression of *MaBTB*, *MaADH* and *MaGLO* genes under salt stress

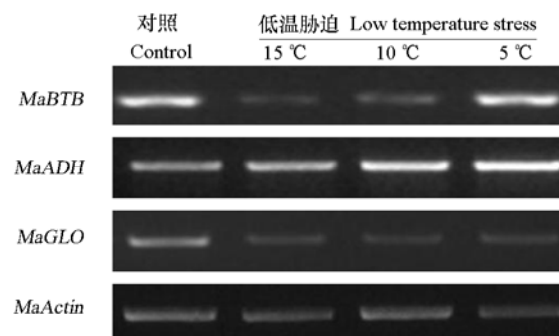


图 6 RT-PCR 分析在低温胁迫下 *MaBTB*、*MaADH* 和 *MaGLO* 基因的表达

Fig. 6 RT-PCR analysis the expression of *MaBTB*, *MaADH* and *MaGLO* genes under low temperature stress

3 讨论

本研究中利用 SMART 法构建香蕉幼苗根系全长均一化 cDNA 文库, 第 2 链 cDNA 合成大小完整, 质量好 (图 1, B), 同时建库所需时间短, 减少了 mRNA 和 cDNA 的降解概率 (Zhu et al., 2001); 基于 cDNA 复性动力学原理, 采用双链特异核酸酶 (duplex-specific nuclease, DSN) 酶切技术, 特异降解在复性过程中的双链 cDNA, 达到均一化目的; 经 DSN 酶处理后, 双链 cDNA 中代表高丰度基因的亮带消失, 呈现出一条均匀的弥散条带 (图 2, A)。另外从 EST 测序分析可以看出序列的冗余度比较低 (2.35%), 与王玉荣等 (2009) 的结果相似, 说明本文库均一化的效果比较理想。

全长 cDNA 文库中全长基因的比例是影响文库质量的一个重要指标。将库检测定的有效克隆继续测通, 拼接后获得 145 个 unigenes, 其中最长的 unigene 可达 2 095 bp, 平均长度大于 1 300 bp, 进一步说明单个克隆插入片段有效长度长以及文库结果可靠。转录因子是植物中一类重要的调控基因, 因其拷贝数低, 表达量小, 在一般的文库中得到的概率较低 (陈儒钢 等, 2010), 而本研究中通过小规模测序即获得了 6 类共 9 条可能的转录因子, 且均具有完整的 ORF (表 2), 说明构建的均一化 cDNA 文库增加了克隆低丰度 mRNA 的机会, 具有较强的获得低丰度基因的能力。

利用 RT-PCR 方法研究 3 个与其他植物同源性较高的抗性基因在不同逆境下的表达, 在干旱和盐处理条件下 *MaBTB* 的表达量增加; 而低温胁迫抑制该基因的表达 (图 4), 说明该基因积极响应非生物胁迫。ADH 基因的表达在植物应对干旱 (de Bruxelles et al., 1996) 和脱水 (Senthil-Kumar et al., 2010) 等胁迫时密切相关。本研究中 *MaADH* 基因在干旱、低温和盐等逆境中的表达量均有所上升 (图 5), 表明 *MaADH* 可能在参与香蕉幼苗应答这些逆境时起到重要的作用。在芥菜 *GLO I* 基因在烟草中过量表达能显著提高对高盐的耐性, 其耐性高低与 *GLO I* 基因表达水平成正相关 (Veena & Sopory, 1999)。本研究中 *MaGLO* 基因的表达量在干旱胁迫下变化不大, 在低温中表达量下降, 但在盐胁迫时 *MaGLO* 的表达量逐渐上升 (图 6), 因此 *MaGLO* 可能在香蕉幼苗抵抗盐胁迫时起到重要作用。以上这些结果均显示成功构建香蕉根系均一化全长 cDNA 文库且文库的结果可靠有效, 为今后香蕉根系功能研究提供了良好的平台。

References

- Ali S, Holloway B, Taylor W C. 2000. Normalization of cereal endosperm EST libraries for structural and functional genomic analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18: 123 - 132.
- Arpat A B, Waugh M, Sullivan J P, Gonzales M, Frisch D, Main D, Wood T, Leslie A, Wing R A, Wilkins T A. 2004. Functional genomics of cell elongation in developing cotton fibers. *Plant Molecular Biology*, 54 (6): 911 - 929.
- Asif M H, Dhawan P, Nath P. 2000. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18: 109 - 115.
- Asamizu E, Nakamura Y, Sato S, Tabata S. 2000. A large-scale analysis of cDNA in *Arabidopsis thaliana*: Generation of 12,028 non-redundant expressed sequence tags from normalized and size-selected cDNA libraries. *DNA Research*, 7 (3): 175 - 180.
- Carninci P, Shibata Y, Hayatsu N, Sugahara, Y, Shibata K, Itoh M, Konno H, Okazaki Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y. 2000. Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes. *Genome Res*, 10: 1617 - 1630.
- Chen Ru-gang, Gong Zhen-hui, Lu Ming-hui, Li Da-wei, Huang Wei. 2010. Research advance of the transcription factors networks related to plant adverse environmental stress. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 18 (1): 126 - 134. (in Chinese)
- 陈儒钢, 巩振辉, 逯明辉, 李大伟, 黄 炜. 2010. 植物抗逆反应中的转录因子网络研究进展. *农业生物技术学报*, 18 (1): 126 - 134.
- de Bruxelles G L, Peacock W J, Dennis E S, Dolferus R. 1996. Absciscic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 111 (2): 381 - 391.

- Hsiao T C. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24: 519 – 570.
- Li Chen, Yan Xiao-hong, Zhou Xin-an, Sha Ai-hua, Shan Zhi-hui, Zhou Rong, Wei Wen-hui. 2010. Construction of a normalized full-length cDNA library of soybean seed at different developmental stages. *Scientia Agricultura Sinica*, 43 (3): 462 – 467. (in Chinese)
- 李 晨, 闫晓红, 周新安, 沙爱华, 单志慧, 周 蓉, 魏文辉. 2010. 大豆种子不同发育时期全长均一化 cDNA 文库的构建. *中国农业科学*, 43 (3): 462 – 467.
- Lokko Y, Anderson J V, Rudd S, Raji A, Horvath D, Mikel M A, Kim R, Liu L, Hernandez A, Dixon A G O, Ingelbrecht I L. 2007. Characterization of an 18,166 EST dataset for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) enriched for drought-responsive genes. *Plant Cell Reports*, 26 (9): 1605 – 1618.
- Ploetz R C, Pegg K G. 2000. Fusarium wilt // Jones D R. Diseases of banana, abaca and enset. Wallingford, UK: CABI Publishing: 143 – 159.
- Senthil-Kumar M, Hema R, Suryachandra TR, Ramegowda HV, Gopalakrishna R, Rama N, Udayakumar M, Mysore K S. 2010. Functional characterization of three water deficit stress induced genes in tobacco and *Arabidopsis*: An approach based on gene down regulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 35 – 44.
- Suchandra Deb Roy, Mukesh Saxena, Prasanna S Bhomkar, Mikhail Pooggin, Thomas Hohn, Neera Bhalla-Sarin. 2008. Generation of marker free salt tolerant transgenic plants of *Arabidopsis thaliana* using the gly I gene and cre gene under inducible promoters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1: 1-11.
- Veena Reddy V S, Sopory S K. 1999. Glyoxalase I from *Brassica juncea*: Molecular cloning, regulation and its over-expression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. *Plant J*, 17: 385 – 395.
- Wang Yu-rong, Zhang Xue-yan, Liu Chuan-liang, Chen Ya-juan, Li Fu-guang. 2009. Construction and characterization of normalized full-length cDNA library of Asian cotton (*Gossypium arboreum* L.) in the whole-life cycle. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (4): 1158 – 1164. (in Chinese)
- 王玉荣, 张雪妍, 刘传亮, 陈亚娟, 李付广. 2009. 亚洲棉 (*Gossypium arboreum* L.) 全生育期均一化全长 cDNA 文库的构建和鉴定. *中国农业科学*, 42 (4): 1158 – 1164.
- Wiemann S, Mehrle A, Bechtel S, Wellenreuther, Pcpckok K, Poustka A. 2003. cDNAs for functional genomics and proteomics: The German consortium. *Comptes Rendus Biologies*, 326: 1003 – 1009.
- Zhao Jie-Tang, Huang Xia, Chen Ya-Ping, Chen Yun-Feng, Huang Xue-Lin. 2009. Molecular cloning and characterization of an ortholog of NPR1 gene from Dongguan Dajiao (*Musa* spp. ABB) . *Plant Molecular Biology Reporter*, 3, 243 – 249.
- Zhao Sen, Chen Yong-Hua, Chen Hao, Xiao Guo-Ying. 2008. Dynamic analysis of Adh2 gene of rice (*Oryza sativa* L.) under submergence stress using real-time quantitative PCR. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 16 (2): 455 – 458.
- Zhang Zhen-qian, Xiao Gang, Tan Tai-long, Zhou Ke-jin, Guan Chun-yun. 2010. Advances in normalized cDNA library and its applications. *Agricultural Science & Technology*, 11 (4): 1 – 5, 43.
- Zhang Z X, Zhang F D, Tang W H, Pi Y J, Zheng Y L. 2005. Construction and characterization of normalized cDNA library of maize inbred M017 from multiple tissues and developmental stages. *Mol Biol*, 39: 198 – 206.
- Zhulidov P A, Bogdanova E A, Shcheglov A S, Vagner L L, Khaspekov G L, Kozhemyako V B, Matz M V, Meleshkevitch E, Moroz L L, Lukyanov S A, Shagin D A. 2004. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acids Res*, 32: e37.
- Zhu Y Y, Machleder E M, Chenchik A, Li R, Siebert P D. 2001. Reverse transcriptase template switching: A SMART™ approach for full-Length cDNA library construction. *BioTechniques*, 30 (4): 892 – 897